

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Vliv složení membrán na jejich strukturní a funkční vlastnosti

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: **Dominik Martinát**
Studijní program: B1406 Biochemie
Studijní obor: Bioinformatika
Forma studia: Prezenční
Vedoucí práce: **doc. RNDr. Karel Berka, Ph.D.**
Rok: : 2020

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval/a samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byl/a jsem seznámen/a s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne 18. května 2020

.....

Poděkování:

Rád bych poděkoval za cenné rady a připomínky vedoucímu mé bakalářské práce doc. RNDr. Karlu Berkovi, PhD a Mgr. Martinu Šrejberovi. Dále bych rád poděkoval Katedře fyzikální chemie Univerzity Palackého za umožnění použití klastru Ingwe pro výpočet simulací stěžejních pro tuto práci.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Dominik Martinát
Název práce	Vliv složení membrán na jejich strukturní a funkční vlastnosti
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra fyzikální chemie
Vedoucí práce	doc. RNDr. Karel Berka, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2020

Abstrakt

Aby mělo léčivo kýžený efekt, musí se dostat do cílového místa, což často zahrnuje pasivní průchod membránou. Z toho důvodu je zásadní chápat, jak složení membrány ovlivňuje její strukturní vlastnosti a interakce. V této práci byl za použití zhrubných simulací studován vliv složení membrán na jejich strukturní vlastnosti: tloušťka membrány, plocha lipidu, parametry uspořádání a laterální difuze. Simulovány byly membrány fosfoglyceridů v čistém i směsném stavu. Ukázal se vliv složení na všechny sledované strukturní parametry. Takto zjištěné trendy byly posléze porovnány s hodnotami permeabilitních koeficientů doplněných a nyní dostupných v databázi MolMeDB. Ukázalo se, že zhrubné simulace popisují strukturní charakteristiky membrán kvalitativně v pořádku, ale permeabilitní data z různých zdrojů nejsou jednoduše porovnatelná.

Klíčová slova	membrána, permeabilita, plocha lipidu, tloušťka membrány, uspořádanost membrán, MolMeDB
Počet stran	42
Počet příloh	0
Jazyk	český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Dominik Martinát
Title	The Influence of Composition on Membrane Structural and Functional Properties
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Physical Chemistry
Supervisor	doc.RNDr. Karel Berka, Ph.D.
The year of presentation	2020

Abstract

Any drug must reach its target site to have the desired effect, which often involves passive passage through the membrane. Therefore, it is essential to understand how the composition of the membrane affects its structural properties and interactions. In this work, the influence of membrane composition on their structural properties: membrane thickness, lipid area, order parameters and lateral diffusion was studied using coarse grained simulations. Membranes of phosphoglycerides in pure and mixed state were simulated. The influence of composition on all monitored structural parameters was shown. The trends found in this way were then compared with the values of permeability coefficients supplemented and now available in the MolMeDB database. Our results show that coarse grained simulations describe the structural characteristics of membranes qualitatively in order, but the permeability data from different sources are not simply comparable.

Keywords	membrane, permeability, area per lipid, membrane thickness, membrane ordering, MolMeDB
Number of pages	42
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1	Úvod	1
2	Současný stav řešené problematiky	2
2.1	Membrány	2
2.1.1	Fosfolipidy	3
2.1.2	Parametry membrán	4
2.1.2.1	Tloušťka membrány	4
2.1.2.2	Plocha lipidu	6
2.1.2.3	Stupně uspořádanosti	7
2.1.2.4	Laterální difuze	7
2.2	Permeabilita	8
2.3	Simulace	9
2.3.1	Molekulová mechanika a dynamika	9
2.3.2	Silová pole	10
2.3.2.1	Silové pole MARTINI	11
2.4	Biologické databáze	13
3	Praktická část	14
3.1	Použité nástroje	14
3.1.1	Insane	14
3.1.2	GROMACS	15
3.1.3	MolMeDB	15
3.2	Modelové membránové systémy	16
3.3	Metody MD simulací	17
3.4	Analýzy strukturních parametrů membrán	18
3.5	Koeficienty permeability	19
4	Výsledky a diskuse	20
4.1	Parametry membrán v závislosti na jejich složení	20
4.1.1	Tloušťky membrán	20
4.1.2	Plochy lipidů	22
4.1.3	Parametry uspořádanosti	24
4.1.4	Laterální difuze	27
4.2	Permeabilitní koeficienty	29
4.3	Souvislost strukturních parametrů a permeability	32
5	Závěr	35
6	Literatura	36
7	Seznam použitých zkratk	42

Cíle práce

Teoretická část

- Vypracování literární rešerše stavu poznání v oblasti chování biologicky aktivních látek na membránách.
- Prostudování odborné literatury.

Praktická část

- Příprava výchozích struktur a molekulárně dynamické simulace membrán.
- Analýza základních strukturních a dynamických parametrů lipidických dvojvrstev.
- Vyhodnocení permeabilit v závislosti na složení lipidových membrán.

1 ÚVOD

V počáteční fázi vývoje nového léčiva, hnojiva, pesticidu, či jiné substance ovlivňující děje probíhající v živých organismech vždy stojí otázka jakou látku z nepřehledného množství vybrat. Různé molekuly, které je dnes možné syntetizovat se počítají na miliony. Z takto velké množiny látek je třeba vybrat ty, které budou mít kýžený efekt. Existuje mnoho kritérií, které se podílí na hodnocení vhodnosti látky a podle jejího účelu se tato kritéria mohou lišit, ale jedna z vlastností, kterou by měly mít všechny tyto látky společnou, je že se dokážou dostatečně efektivně dostat na místo svého účinku.

Jednou z překážek, které musí tyto molekuly překonávat, jsou lipidové membrány tvořící obaly jednotlivých buněk a organel. Některé látky mohou využívat systémy pro aktivní transport látek, avšak mnoho látek musí procházet přes membrány pasivně. Jak snadno k tomuto přechodu dochází lze určit z afinity k membráně a permeability dané sloučeniny.

Při průchodu membránou, hrají roli její strukturní vlastnosti ovlivněné jejím složením. Experimentální měření těchto parametrů jsou relativně pomalá a nákladná, což znesnadňuje jejich masové použití pro získání přehledu o změnách parametrů membrán v závislosti na změně koncentrace jejich jednotlivých složek. Nicméně rozvoj v oblasti výpočetní techniky a algoritmů v posledních desetiletích umožňuje aspoň částečně tento problém vyřešit pomocí tzv. *in silico* návrhu léčiv.

Avšak výpočet permeabilit pro velké množství kombinací membrán se sloučeninou zůstává nadále výpočetně náročným problémem. Pro shromáždění těchto cenných dat a jejich snadné zpřístupnění vědecké komunitě byla zřízena databáze membránových interakcí MolMeDB (Molecules on Membrane Database). (Juračka *et al.* 2019)

Cílem této práce je za použití výpočetních metod objektivně zhodnotit, jak fosfolipidové složení membrány ovlivňuje její strukturní vlastnosti a za pomoci údajů z databáze MolMeDB zjistit souvislosti mezi těmito vlastnostmi a prostupností membrán.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Membrány

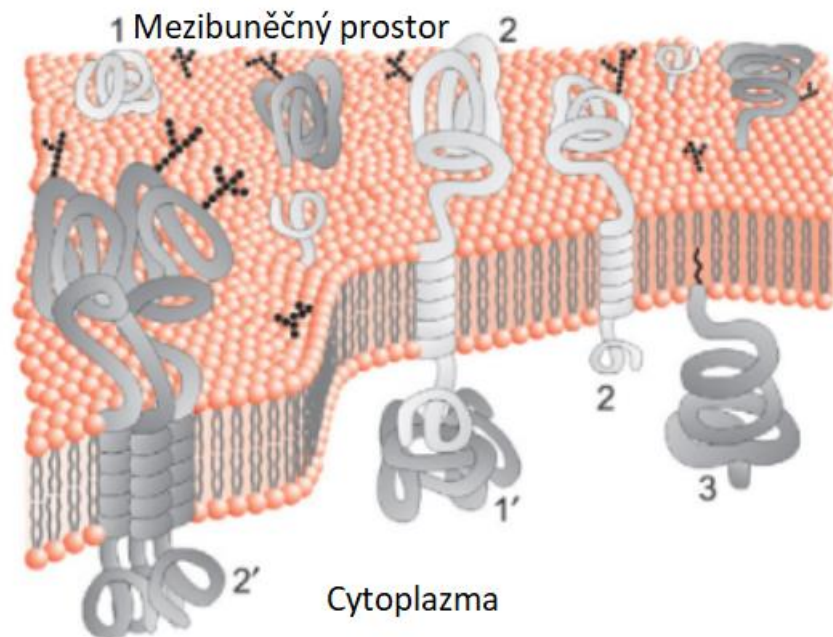
Membrány jsou nedílnou součástí buněk. Všechny buňky disponují cytoplazmatickou membránou, oddělující jejich vnitřní od vnějšího prostředí, a v případě buněk eukaryotických buněk pak tvoří i povrch membránových organel.

Membrány krom samotného rozdělení prostoru na vnější a vnitřní zastávají celou řadu dalších funkcí. Například zajišťují udržení stálého vnitřního prostředí selektivním propuštěním a kotvením proteinů pro aktivní transport, umožňují přenos signálu z vnějšího prostředí do vnitřního a jsou důležité pro identifikaci buňky.

Všechny tyto a další funkce membrán jsou umožňovány jejich strukturou. V současnosti je široce přijímaný model membrány jako dvojvrstvy fosfolipidů, které tvoří jejich nejvýraznější složku. (van Meer *et al.* 2008) Dalšími složkami jsou například cholesterol, glykolipidy a membránové proteiny. Lipidový základ membrán předpokládal již roku 1895 Charles Overton, přičemž vycházel z pozorování, že v tučích rozpustné látky vstupují do buňky daleko snadněji než látky v tučích nerozpustné. (Overton 1895)

Dvojvrstevný charakter membrány pak byl roku 1925 odvozen E. Gorterem a F. Grendelem na základě jejich experimentu srovnání obsahu lipidů z izolovaných membrán červených krvinek s velikostí jejich povrchu. (Gorter a Grendel 1925) Roku 1935 pak byl navržen H. Davsonem aj. Daniellim tzv. sandwichový model, který měl vysvětlovat nižší přilnavost umělých fosfolipidových membrán oproti přírodním, pokrytím povrchu těchto membrán hydrofilními proteiny. (Davson a Danielli 1935)

V roce 1972 byl J. Singerem a G. Nicolsonem navržen alternativní model, tzv. model fluidní mozaiky (Obr. 1), který zůstává široce přijímaný dodnes. (Singer a Nicolson 1972) Podle tohoto modelu, jsou membránové proteiny svými hydrofobními částmi zanořeny do membrány a ven vyčnívají jejich hydrofilní části. Takto zanořené proteiny se pak mohou v membráně díky její polotekuté formě pohybovat. (Cambell a Reece, 2006)



Obr. 1 Struktura biologické membrány dle modelu fluidní mozaiky. 1, periferální protein umístěný u vnější strany; 1', periferální protein připojený k cytoplazmatické doméně integrálního proteinu; 2, integrální protein vnořený do dvojvrstvy transmembránovou α šroubovicí; 2', integrální protein s více transmembránovými segmenty; 3, periferální membránový protein s lipidovou kotvou. Řetězce černých koleček reprezentují oligosacharidy připojené k proteinům nebo lipidům na vnější straně membrány. Převzato a upraveno z ref (Blanco a Blanco 2017).

2.1.1 Fosfolipidy

Nejvíce zastoupeným stavebním prvkem biologických membrán, určující většinu jejich vlastností jsou fosfolipidy. Jde o amfipatické molekuly, kde hydrofilní část tvoří fosfátová hlavička a hydrofobní dva uhlovodíkové řetězce. Tyto řetězce se od sebe mohou lišit délkou, nebo počtem či umístěním dvojných vazeb.

V membránách živočišných buněk jsou pak nejvíce zastoupeny fosfoglyceridy, tvořené glycerinovou páteří, na kterou jsou přes dvě sousední OH skupiny esterovou vazbou navázány mastné kyseliny o délce alifatického řetězce činící 14 – 24 uhlíkových atomů a fosfátem napojeným přes třetí OH skupinu. Na samotný fosfát je pak připojen některý z několika typů hlaviček. V savčích buňkách jde nejčastěji o ethanolaminovou, serinovou, nebo cholinovou hlavičku (Alberts *et al.* 2015).

Tvorba lipidové dvojvrstvy je spontánní proces. Řetězce jsou hydrofobními interakcemi zatlačovány do nitra membrány a hydrofobní hlavičky se naopak orientují směrem do vody. (van Meer *et. al* 2008) Stejně interakce pak vedou ke snaze systému

minimalizovat vystavení povrchu membrány kde by byly řetězce dostupné vodě, což způsobuje tvorbu tzv. liposomů. (Balouch *et al.* 2020)

Pohyb jednotlivých lipidů v rámci dvojvrstvy je velmi dynamický proces. K laterálnímu pohybu dochází relativně často a jde o poměrně rychlý pohyb (řádově v nanosekundách). (Kornberg a McConnell 1971a) K přesunu lipidu z jedné membrány do druhé, tzv. flip-flop pohybu, dochází bez vnějšího zásahu jen vzácně. (Kornberg a McConnell 1971b) V živých buňkách tyto přesuny umožňují specifické transportní proteiny, tzv. flipasy, flopasy a skramblasy. (Daleke 2003)

2.1.2 Parametry membrán

Parametry membrán rozumíme kvantitativní data popisující jejich vlastnosti. Strukturální vlastnosti popisují parametry jako tloušťka membrány a tloušťka lipidu a dynamické vlastnosti popisují parametry jako stupně uspořádanosti a laterální difuze. Data pro určení těchto parametrů se získávají experimentálně, výpočetními metodami, či jejich kombinací. Mimo jiné jsou experimentálně zjištěné parametry využívány k validaci molekulárně dynamických simulací. V případě komplexnějších membránových systémů se využívají výpočetní metody jako doplňkové metody k určení a potvrzení těchto parametrů. (Nagle 2012)

2.1.2.1 Tloušťka membrány

Existuje několik typů tlouštěk membrány, které jsou získávány rozdílnými způsoby a mají různá využití. Příkladem mohou být tloušťka mezi lipidickými hlavičkami tzv. „head to head thickness“ (D_{HH}), Luzzatiho tloušťka (D_B) a hydrofobní tloušťka ($2D_C$) (Obr. 2).

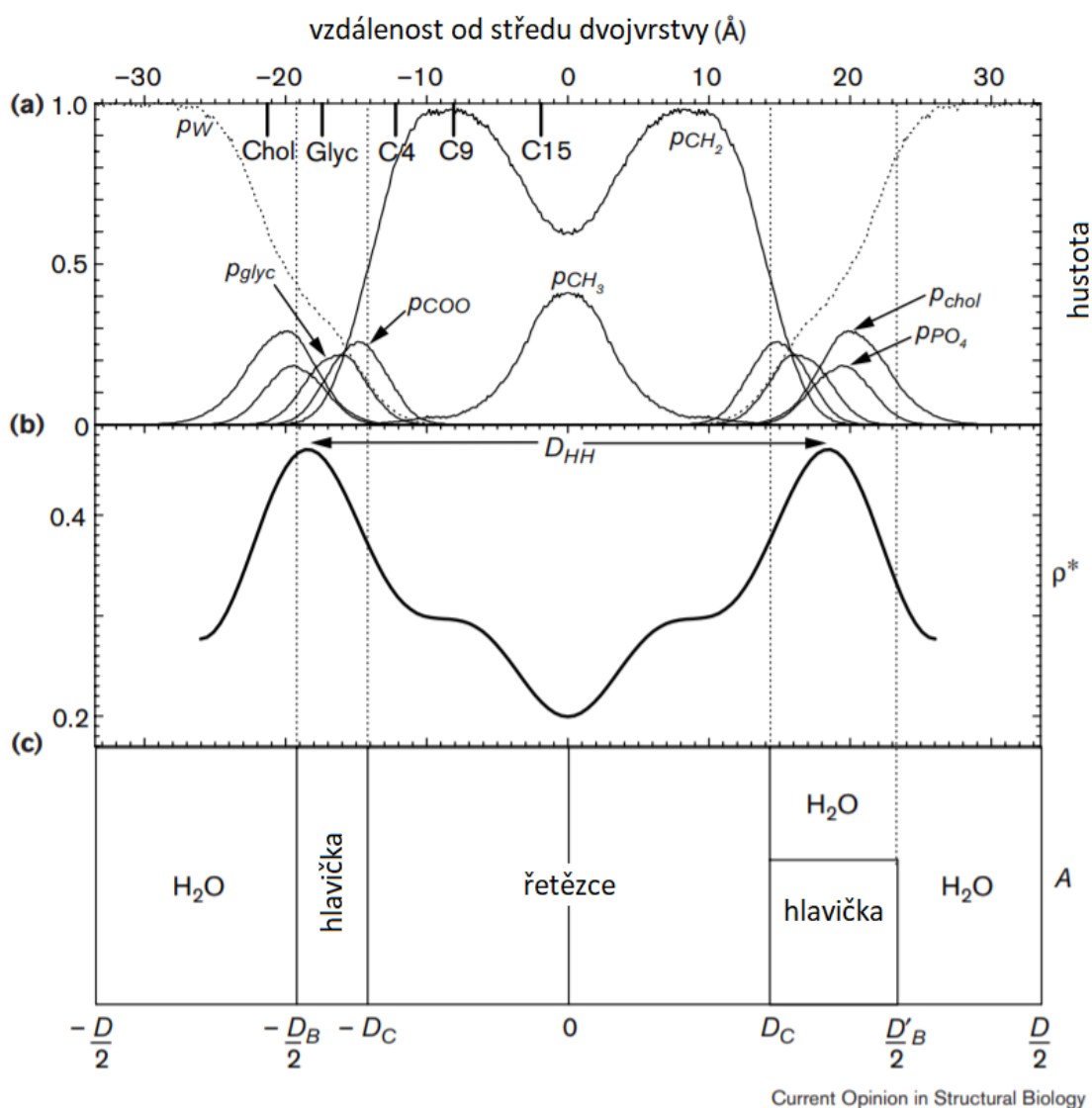
D_{HH} je definována jako vzdálenost polárních hlav lipidové dvojvrstvy. Experimentálně je určována z elektronových hustot napříč membránou, získaných elektronovou difrakcí, kde jsou fosfáty obzvlášť výrazné. (Nagle a Tristram-Nagle 2000a) V případě molekulárně dynamických simulací pak z hustotního profilu zastoupení fosfátové skupiny, kde je většinou kvůli fosfátu nejvyšší elektronová hustota v rámci vrstvy.

Luzzatiho tloušťka (D_B) je definována jako vzdálenost napříč membránou mezi body kde je 50% zastoupení vody. Experimentálně je určována neutronovou difrakcí. D_B je důležitá například pro interakce membrány s biomakromolekulami a využívá se pro určení plochy lipidu. (Kučerka *et al.* 2009)

Hydrofobní tloušťka ($2D_C$) je definována jako dvojnásobek délky alifatických řetězců lipidu, přičemž se do délky nezapočítává karbonylový uhlík. Její hodnotu je možno získat z rovnice

$$D_{H1} = \frac{D_B - D_C}{2} \quad (1)$$

kde D_{H1} je získatelná z měření provedených na membráně v gelové fázi. (Nagle 2012) $2D_C$ je důležitá například pro hydrofobní interakce proteinů s membránou a lze ji také využít pro výpočet plochy lipidu. (Kučerka *et al.* 2009)



Obr. 2 Tři pohledy na strukturu DPPC. a) Hustotní profily zastoupení (p) jednotlivých skupin. Vpravo nahoře tlustě vyznačeny průměrné pozice skupin dle neutronové difrakce. b) Profil elektronové hustoty ρ^* kde D_{HH} značí vzdálenost hlaviček. c) Vyznačení oblastí membrány. Převzato a upraveno z ref (Nagle a Tristram-Nagle 2000b)

2.1.2.2 Plocha lipidu

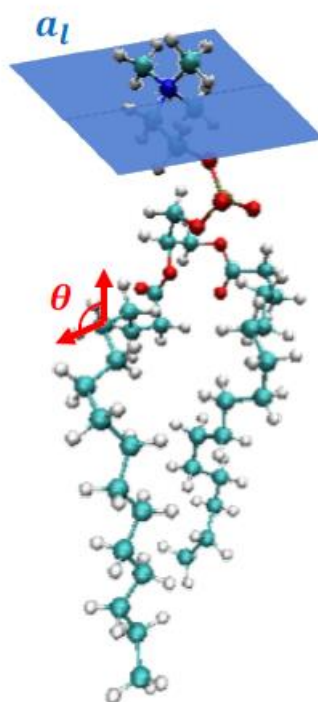
Jako plocha lipidu (**Area per Lipid** - A_L) se označuje prostor na povrchu membrány, který zabírá jedna molekula (Obr. 3). Lze ji získat například výpočtem z rovnic 2 nebo 3 (Kučerka *et al.* 2008):

$$A_L = \frac{2V_L}{D_B} \quad (2)$$

$$A_L = \frac{V_L - V_{HL}}{D_C}, \quad (3)$$

kde V_L zde značí objem, který zaujímá jedna molekula lipidu a jde získat například tzv. neutrální vztakovou metodou a V_{HL} značí objem fosfátové hlavičky, který je možné získat z membrány v gelové fázi. (Nagle a Tristram-Nagle 2000)

Řada těchto strukturních parametrů se často využívá k validaci silových polí pro molekulárně dynamické simulace. (Poger *et al.* 2016) Z nich lze A_L určit jako podíl plochy povrchu simulované membrány a počtu lipidových molekul ve vrstvě.



Obr. 3 Definice plochy lipidu (A_L) a stupňů uspořádanosti. Na atomistické reprezentaci DPPC je modrou plochou vyznačena A_L a červenou barvou úhel podél jednoho z alifatických řetězců využívaný pro výpočet stupňů uspořádanosti. Převzato z ref (Smith *et al.* 2019).

2.1.2.3 Stupně uspořádanosti

Stupně uspořádanosti (S_{CD}) poskytují informace o orientaci vazeb v alifatickém řetězci lipidů a jeho konformacích. Lze je vypočítat vzorcem

$$S_{CD} = \frac{\langle 3\cos^2\theta - 1 \rangle}{2}, \quad (4)$$

kde θ značí úhel vazeb C–H vůči normále membrány (Obr. 3) a výraz v závorce zprůměrované hodnoty napříč souborem atomů. Stupně uspořádanosti mohou nabývat hodnot -0,5 až 1, přičemž 1 znamená shodu orientace C–H vazby s normálou a -0,5 kolmou orientaci vazby vůči normále. (Smith *et al.* 2018) Hodnota 0 pak znamená dokonale neuspořádaný systém nebo konstantní úhel C–H vazby napříč systémem o velikosti 54,74°, který je též označován jako tzv. magický úhel. (Poger *et al.* 2016)

Experimentálně se velikosti θ úhlů získávají nukleární magnetickou rezonancí, za použití značení alifatických řetězců izotopy vodíku ^2H nebo uhlíku ^{13}C . (Poger *et al.* 2016) V případě simulací záleží získání hodnot na detailnosti použitého silového pole. Pokud byla provedena „all-atom“ simulace, tedy byly reprezentovány všechny atomy včetně vodíků, počítají se stupně uspořádanosti přímo. V případě „united-atom“ silových polí, kde jsou nepolární vodíky zahrnuty do struktury těžšího atomu, se hodnoty vypočítávají z predikce pozice vodíkového atomu v závislosti na úhlech mezi vazbami vedlejších uhlíků. (Piggot *et al.* 2017) Další možností je vypočítat S_{CD} pro uhlík i z úhlů které svírá spojnice mezi uhlíky $i-1$ a $i+1$ s osou kolmou na plochu membrány. (Abraham *et al.* 2015)

2.1.2.4 Laterální difuze

Jako laterální difuze se označuje pohyb molekul lipidů v rámci jedné vrstvy membrány. Laterální difuze je určována **difuzním koeficientem** (D_L) a poukazuje na tekutost membrány a je také považována za jeden z vhodných parametrů pro validaci silových polí pro MD simulace membrán. (Poger *et al.* 2016)

Laterální difuze je experimentálně nejčastěji měřena za využití fluorescenčních technik, případně značení fosfátové hlavičky atomy zlata nebo spinovou značkou (např. nitroxidovou skupinou) pro elektronovou spinovou rezonanci. (Alberts *et al.* 2015). Z MD simulací lze D_L vypočítat ze sklonu křivky tzv. mean square displacement – tedy

průměrného posunu molekuly vynesené podél časové osy jako řešení tzv. Einsteinovy rovnice

$$D_L = \lim_{t \rightarrow \infty} \frac{1}{2n} \frac{d}{dt} \langle [r(t + t_0) - r(t_0)]^2 \rangle_{t_0}, \quad (5)$$

kde n značí stupně volnosti (v případě laterální difuze $n = 2$) a r pozici těžiště molekuly lipidu. (Pluhackova *et al.* 2016)

2.2 Permeabilita

Permeabilita udává schopnost látky pasivně procházet membránou. Tato vlastnost je důležitá například pro transport léčiv k cíli působení. Její míru udává tzv. koeficient permeability (**P**).

Z MD simulací lze permeabilitu látky zjistit za využití tzv. modelu nehomogenní rozpustnosti a difuze. (Diamond a Katz 1974) Tento model umožňuje vypočítat permeabilitu z nasimulované křivky potenciálu střední síly ($G(z)$) a lokální difuzivity ($D(z)$) podél normály membrány (z) působící na procházející molekulu výpočtem rovnice (Marrink a Berendsen 1994)

$$P^{-1} = \int dz \frac{\exp[\beta G(z)]}{D(z)}, \quad \beta = \frac{1}{k_B T}. \quad (6)$$

Samotný průchod probíhá obvykle v rámci milisekund což je pro klasické MD simulace příliš dlouhý časový rámec a na úrovni simulovaného systému s jednou molekulou nemusí k pozorovanému průchodu dojít vůbec. Tento problém se řeší použitím metod s posílením vzorkováním např. „deštníkové“ vzorkování nebo metadynamiky. (Di Meo *et al.* 2016)

Experimentálně je permeabilita měřena pomocí technik využívající osmotických jevů (Price a Thompson 1969), NMR (Alger a Prestegard 1979), či dalších.

Permeabilita jsou ovlivňována parametry membrány. Z modelu nehomogenní rozpustnosti a difuze vyplývá její snižování při zvýšení tloušťky membrány, neboť molekula musí překonat delší úsek. Větší plocha lipidu naopak ponechává více prostoru pro vmezeření molekuly do membrány, a tak permeabilitu ulehčuje. Uspořádanější řetězce jsou spojeny s menšími plochami lipidů, a to vede k výraznější energetické penalizaci přechodu (Xiang a Anderson 1997, Paloncýová *et al.* 2014). Nižší koeficienty laterální difuze (D_L) vedou ke zpomalení penetrace molekul do membrány (Paloncýová *et al.* 2014), což také způsobuje snížení koeficientů permeability.

2.3 Simulace

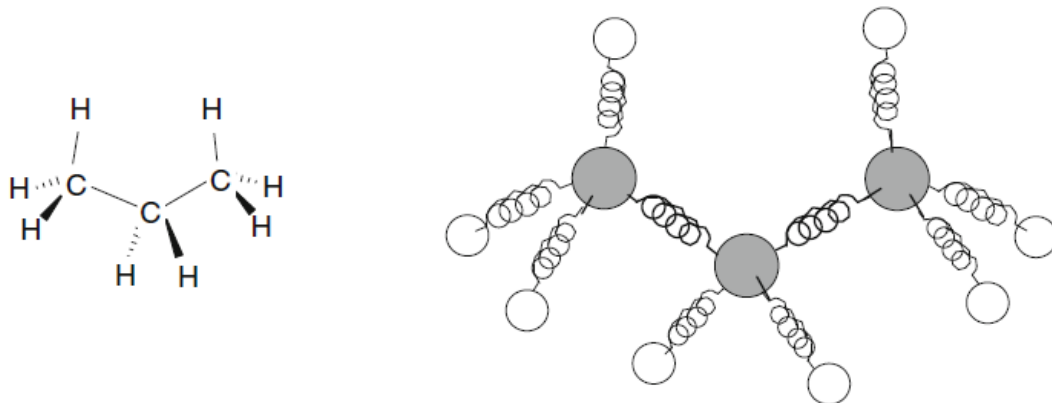
Nástroje teoretické chemie umožňují studovat vlastnosti a funkce systému v atomovém rozlišení, v jakém nejsou experimentálními prostředky pozorovatelné. Jde o aplikaci známé, či předpokládané teorie ke zkonstruování modelu zkoumaného systému a následnému výpočtu vývoje stavu tohoto systému. Simulace takto mohou například pomoci objasnit průběh procesů a vliv různých faktorů na výsledky experimentálních pozorování, jako je např. vliv membránových parametrů na permeability látek.

2.3.1 Molekulová mechanika a dynamika

Molekulová mechanika (MM) využívá k popisu systému funkci potenciální energie, jejíž hodnota je vypočítávána z pozic jednotlivých atomů v systému. Atomy jsou aproximovány jako kuličky, vazby mezi nimi jako pružinky (Obr. 4) a nevazebné interakce jako vzájemné přitahování a odpuzování, přičemž příspěvek elektronů se zanedbává. Potenciální energie vyjadřuje míru odporu v systému a tím energetickou nevýhodnost jeho prostorového uspořádání. Přesná forma funkce potencionální energie a parametry příslušné částicím v systému a jejich interakcím určuje tzv. silové pole. (Lewars 2016)

Obecně lze chápat funkci potenciální energie jako součet odděleně vypočítatelných hodnot pro délky vazeb (V_b), vazebné úhly (V_a), dihedrální (V_d) a nepravé dihedrální úhly (V_{id}) a nevazebné interakce v podobě Van der Waalsových (V_{LJ}) a elektrostatických sil (V_c), viz rovnice 7.

$$V = \sum_{\text{vazby}} V_b + \sum_{\text{úhly}} V_a + \sum_{\text{dihedrál ní úhly}} V_d + \sum_{\text{nepravé dih.úh.}} V_{id} \quad (7)$$
$$+ \sum_{\text{VdW interakce}} V_{LJ} + \sum_{\text{elektrostatické interakce}} V_c$$



Obr. 4 Atomistická reprezentace molekuly propanu v molekulární mechanice. Atomy jsou reprezentovány jako kuličky a vazby mezi nimi jako pružiny. Převzato z ref (Lewars 2016).

Hodnoty konstant v členech funkce potenciální energie udává silové pole. Některá silová pole mohou vypočítávat hodnotu těchto členů z odlišných rovnic, nebo mohou také do výpočtu zahrnout další členy. (Lewars 2016)

Molekulová dynamika (MD) aplikuje MM k simulaci vývoje systému v čase. Z funkce potenciální energie se její negativní derivací podle polohy určuje síla působící na každý atom simulovaného systému, která je poté s pomocí Newtonových zákonů převedena na zrychlení. Rovnice má tvar:

$$-\frac{\partial V}{\partial r_i} = F_i = \frac{\partial^2 r_i}{\partial t^2} m_i, \quad (8)$$

kde t značí čas, V funkci potenciální energie, r polohu a m_i hmotnost atomu i .

Pozice a rychlosti všech atomů simulovaného systému jsou vypočítávány v diskrétních časových krocích, které musí být kratší, než je délka nejrychlejšího simulovaného děje. Nový stav systému pak slouží jako výchozí stav při dalším simulačním kroku. Počet kroků závisí na délce simulace. V pravidelných intervalech se koriguje stav systému pro udržení konstantní teploty a tlaku. Také se pravidelně zaznamenávají pozice atomů do výstupního souboru, kterým je trajektorie systému.

2.3.2 Silová pole

Silová pole určují přesnou formu funkce potenciální energie a konstanty nutné pro její výpočet. Mimo to silová pole obsahují seznam atomových typů s jejich předepsanými vlastnostmi pro vazebné a nevazebné interakce mezi atomy a pro vlastnosti jednotlivých atomových typů (např. hmotnost atomu). Tento systém umožňuje například použít různé typy atomů pro reprezentaci atomů stejného prvku s odlišnými vlastnostmi, nebo naopak

zjednodušení, kdy se rozdílné částice s podobnými vlastnostmi reprezentují atomem stejného typu. Kombinací těchto parametrů můžeme získat topologie popisující molekuly.

Při návrhu nového silového pole, nebo při jeho rozšiřování je třeba určit jeho parametry v procesu tzv. parametrizace. Některé parametry je možné určit *ab initio* výpočty z kvantové mechaniky, avšak výpočetně náročnější parametry se určují empirickými nebo semi-empirickými metodami.

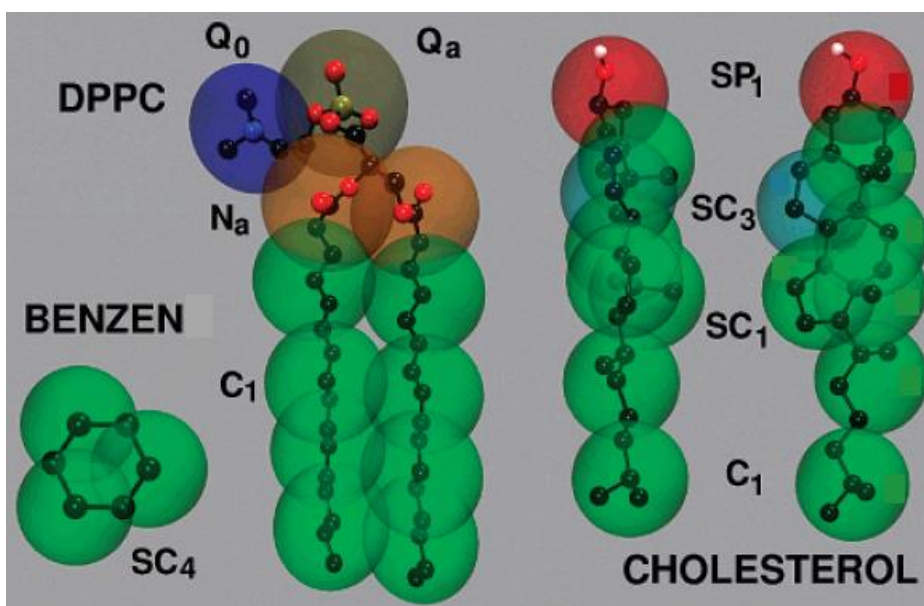
Silová pole také určují, v jakém rozlišení budou výpočty probíhat. Atomistická (all atom) silová pole zahrnují do výpočtů každý atom simulovaného systému. Tzv. sjednocená atomistická (united atom) pole zahrnují těžký atom a jeho sousední vodíky do jednoho „pseudoatomu“, čímž se snižuje množství potřebných výpočtů. O krok dále ještě zacházejí tzv. hrubozrná (coarse grained) silová pole, která sjednocují několik těžkých atomů i s jejich sousedními vodíky do korálek (bead) umožňující simulace větších systémů. Je možná i vyšší míra abstrakce, nebo je možné kombinovat různé míry rozlišení pro různé součásti simulovaného systému.

Obecně platí, že hrubší rozlišení vede k zjednodušení výpočtů což umožňuje simulovat větší systémy nebo delší časové úseky. Nicméně dochází ke ztrátě informace na jemnějších úrovních, což ale může vést i k menšímu počtu zanesených chyb odchylkami výpočtů.

2.3.2.1 Silové pole MARTINI

MARTINI je CG silové pole, původně vytvořené pro simulaci lipidových systémů v širokém rozmezí stavů. Model je založený na reprezentaci čtyř těžkých atomů do jednoho většího beadu. Pro aromatické systémy se do jednoho beadu mapují těžké atomy dva nebo tři.

Pro jednoduchost jsou typy beadů rozděleny do 4 skupin reprezentující polární (P), smíšeně polární (N), apolární (C) a nabitě (Q) skupiny. V rámci skupin jsou pak typy beadů rozděleny podle jejich dalších vlastností, jako je míra polarizability, nebo role při tvorbě vodíkových můstků. Tento systém umožňuje reprezentovat různé chemické skupiny se podobnými vlastnostmi stejným typem beadu. Kombinací beadů různých typů pak lze reprezentovat rozmanité molekuly. (Obr. 5)



Obr. 5 CG reprezentace benzenu, DPPC a cholesterolu. Q značí nabité, P polární, N částečně polární a C nepolární beady. S značí příslušnost beadu k aromatickému systému. Číslo u značky beadu značí míru polarity (rostoucí 1 až 5), a značí akceptor vodíkové vazby a beady označené 0 vodíkové vazby netvoří. Převzato a upraveno z ref (Marrink et al. 2007).

K výpočtu nevazebných interakcí se využívá posunutého Lennard-Jonesova (LJ) a Coulombického potenciálu. Posunutý LJ potenciál je ve tvaru:

$$V_{LJ}(r_{ij}) = 4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right], \quad (9)$$

kde r značí aktuální vzdálenost, σ nejbližší vzdálenost mezi částicemi a ϵ je silová konstanta pro jejich interakci. Hodnota σ je pevně určena na 0,47 nm pro všechny páry s výjimkou nabité Q částice se silně apolárními částicemi, kde $\sigma = 0,62$ nm. Hodnoty ϵ jsou určeny maticí interakcí mezi typy beadů. Hodnota relativní permeability pro výpočet Coulombického potenciálu je stanovena na $\epsilon_r = 15$ Oproti běžným atomistickým silovým polím, jsou nevazebné interakce vypočítávány mezi částicemi spojenými přes jeden sousední atom a v případě elektrostatických interakcí, i pro sousední beady. Pro výpočet příspěvku délky vazby mezi částicemi se počítá s rovnovážnou délkou $b = 0,47$ nm a silovou konstantou $k^b = 1250$ kJ mol⁻¹ nm⁻². Pro reprezentaci tuhosti řetězců se využívá harmonický potenciál v cosinové formě:

$$V_a(\theta_{ijk}) = \frac{1}{2} k^\theta [\cos(\theta_{ijk}) - \cos(\theta_0)]^2, \quad (10)$$

kde je silová konstanta pro alifatické řetězce stanovena na $k^\theta = 25 \text{ kJ mol}^{-1}$ a rovnovážný úhel jako $\theta_0 = 180^\circ$. V případě cis dvojných vazeb jsou tyto hodnoty stanoveny na $k^\theta = 45 \text{ kJ mol}^{-1}$ a $\theta_0 = 120^\circ$. Pro trans dvojně vazby $k^\theta = 45 \text{ kJ mol}^{-1}$ a $\theta_0 = 180^\circ$. Odlišné hodnoty konstant jsou použity pro beady v aromatických skupinách a pro beady v aromatickém kruhu nejsou vypočítávány LJ potenciály. Pro udržení geometrie komplikovanějších aromatických systémů se vypočítává příspěvek nepravého dihedrálního úhlu.

CG silová pole obecně kvůli hladším energetickým přechodům zrychlují simulované procesy oproti AA silovým polím. Pro silové pole MARTINI dochází u různých procesů ke dvou až desetinásobnému zrychlení. Obecně se počítá se zrychlením o faktoru čtyř. (Marrink *et al.* 2007)

2.4 Biologické databáze

S velkým množstvím dat produkovaných moderními vědeckými metodami vyvstal problém, jak tato data uchovávat, spravovat a komunikovat širší vědecké obci. Tento problém řeší biologické databáze.

Databáze můžeme rozdělit například podle jejich obsahu a využití. Například sekvenční databáze obsahují informace v podobě alfanumerických sekvencí reprezentující proteiny a geny, zatímco strukturní databáze obsahují o komplexních molekulách a jejich strukturách (např. proteinových), funkcích a potenciálních interakcích. Dalším druhem typem databází jsou databáze interakcí, shromažďující informace o komplexních molekulových interakcích (např. protein – protein). (Cannataro *et al.* 2014).

Data jsou obecně přechovávána v jednotných strojově čitelných formátech. Moderní databáze často poskytují nástroje usnadňující práci v datovém prostoru, jako jsou například komparátory, nástroje pro vyhledávání sekvenčních motivů atd.

3 PRAKTICKÁ ČÁST

3.1 Použité nástroje

Pro MD simulace bylo použito silové pole MARTINI (Marrink *et al.* 2007). Systémy byly vygenerovány softwarem Insane (Wassenaar *et al.* 2015) a výpočet probíhal na počítačovém clusteru Univerzity Palackého Ingwe za použití softwarového balíku GROMACS 4.5.1 (Pronk *et al.* 2013). Výstupy MD simulací byly analyzovány za pomoci GROMACS 2018.1 (Abraham *et al.* 2015). Koeficienty permeability byly vyhledány v databázi MolMeDB - www.molmedb.upol.cz (Juračka *et al.* 2019).

3.1.1 Insane

Insane (INSert membrANE) je nástroj pro generování modelových systémů v CG rozlišení obsahujících lipidové dvojvrstvy. Primárně byl vytvořen pro práci se silovým polem MARTINI. Program umožňuje i generovat systémy s makromolekulami jako např. transmembránovými proteiny nebo různými specifikacemi membrán, jako jsou například póry, nebo liposomy.

Po vytyčení simulačního boxu jsou programem podél os x a y umístěny dvě mřížky tvořené buňkami přibližně o ploše, kterou lipid v dvojvrstvě zaujímá. Poté je pro každou buňku vypočítán prostor obsazený atomy makromolekul, případně póry, a pokud její obsazení dosáhne určité míry, je tato buňka označena jako nevhodná pro umístění lipidu. Následuje „zamíchání“ pořadí zbývajících buněk a vložení po jednom lipidu v nastaveném poměru. Podobným způsobem je do systému vložen solvent s tím rozdílem, že se využívá trojrozměrná mřížka o velikosti buněk odpovídající průměru částice solventu.

Po vytyčení simulačního boxu je podél os x a y umístěny dvě mřížky tvořené buňkami přibližně o ploše rovné průměrné ploše lipidu ve vrstvě membrány. Poté je pro každou buňku vypočítán prostor obsazený atomy makromolekul, případně děrami, a pokud její obsazení dosáhne určité míry, je tato buňka označena jako nevhodná pro umístění lipidu. Následuje „zamíchání“ pořadí zbývajících buněk a vložení po jednom lipidu v nastaveném poměru. Podobným způsobem je do systému vložen solvent s tím rozdílem, že se využívá trojrozměrná mřížka o velikosti buněk odpovídající průměru částice solventu.

Takto vytvořené membrány jsou charakteristické pravidelným uspořádáním částic. Aby se zajistila rychlá ztráta tohoto uspořádání, je každá částice náhodně vychýlena. Tím je do systému dodáno napětí, které se rozšíří a napomůže mísení a ekvilibraci. (Wassenaar *et al.* 2015)

3.1.2 GROMACS

GROMACS je volně dostupný softwarový balík pro provádění MD simulací, který nabízí širokou škálu nástrojů např. pro generování a přípravu systémů pro simulaci, převod formátu struktur nebo pro analýzu výsledných trajektorií a umožňuje využívat celou škálu silových polí. (Abraham *et al.* 2015).

3.1.3 MolMeDB

MolMeDB (Molecule on Membrane Database) je otevřená, manuálně spravovaná databáze interakcí látek s membránami. Zahrnující informace interakcí látek s membránami formou partičních a permeačních koeficientů, popřípadě energetických profilů průchodu látek membránami. Data v MolMeDB byla získána z vědeckých článků v recenzovaných časopisech a vlastních výpočtů za využití metody COSMOmic (Klamt *et al.* 2008). Databáze podporuje vyhledávání podle názvu sloučeniny, jejího SMILES zápisu, membrány, metody či zdroje. Přítomny jsou i odkazy na příslušné záznamy v dalších databázích, jako je PDB, nebo PubChem. Jednotlivá data je možno stáhnout ve větších celcích jako tabulky ve formátu csv.

Krom samotného výčtu interakcí látka/membrána, MolMeDB nabízí jednoduchý nástroj pro komparaci interakcí mezi více metodami a/nebo metodami. Webová verze této databáze je dostupná na adrese <http://molmedb.upol.cz>. (Juračka *et al.* 2019)

MolMeDB databáze k datu 15. 5. 2020 obsahuje záznamy o 14181 interakcích 11153 látek na 31 různých typech modelových membrán.

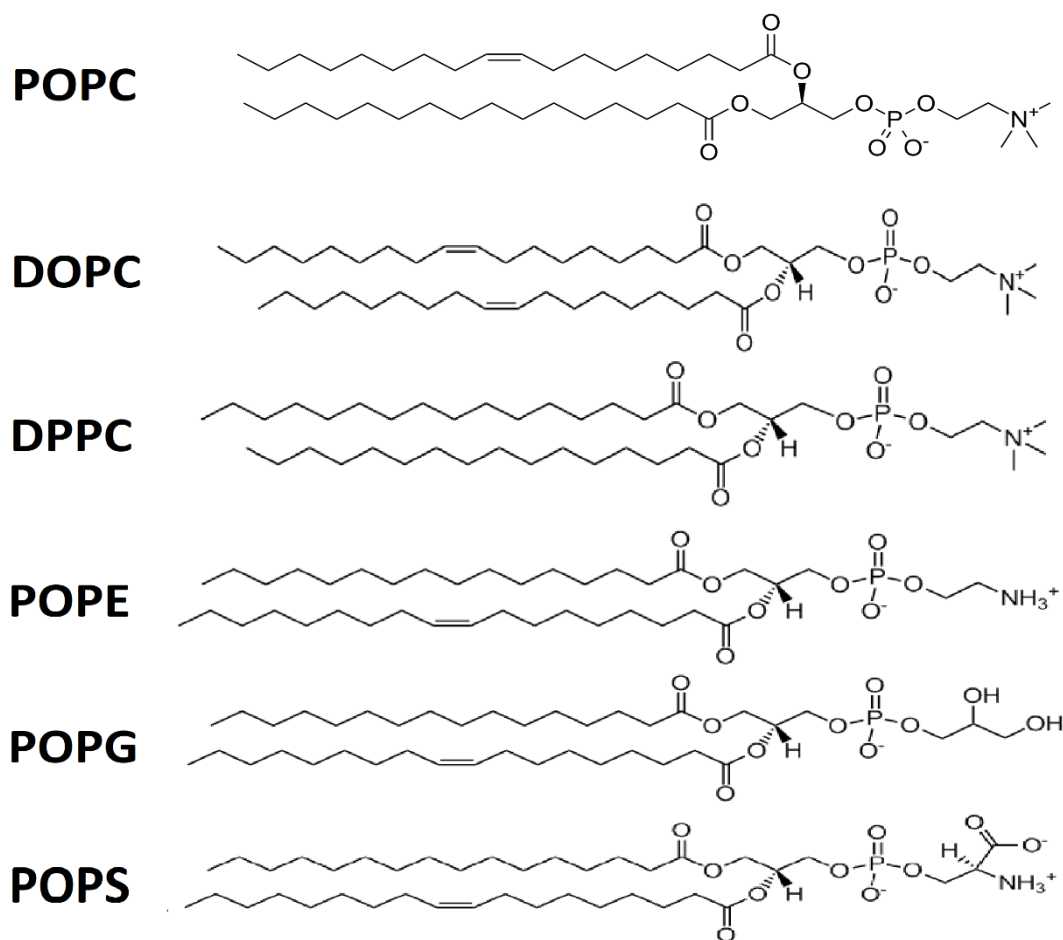
3.2 Modelové membránové systémy

Prvním fosfolipidem vybraným pro stavbu modelových membrán byl palmitoyloleoylfosfatidylcholin (POPC), se kterým byl srovnáván vliv ostatních fosfolipidů. Tento neutrální fosfoglycerid má nasycený palmitoylový řetězec (C 16:0) na pozici sn1 a nenasycený oleoylový řetězec (C18:1 Δ^9). Pro srovnání vlivu podílu nasycených a nenasycených řetězců byly zvoleny dioleoylfosfatidylcholin (DOPC) se dvěma nenasycenými řetězci a dipalmitoylfosfatidylcholin (DPPC) se dvěma nasycenými řetězci.

Pro srovnání vlivu fosfátové hlavičky byly zvoleny palmitoyloleoylfosfatidylethanolamin (POPE), s rovněž nenabitou polární hlavičkou, nicméně náchylnější na tvorbu vodíkových vazeb, a palmitoyloleoylfosfatidylglycerol (POPG) a palmitoyloleoylfosfatidylserin (POPS), oba se záporně nabitými fosfátovými hlavičkami. (Obr. 6)

Softwarem Insane byl vygenerován systém s membránou čistého POPC a poté byly generovány systémy se zvyšujícím se podílem dalšího fosfolipidu po 10 % až po membrány skládající se jen z příměsi. Směsné membrány s 60% až 90% výskytem POPE, POPG a POPS byly vynechány, protože se ve fyziologických podmínkách v takovýchto koncentracích nevyskytují. Všechny membrány měly symetrické složení v obou vrstvách. Systémy obsahující POPG a POPS byly doplněny o kladně nabitě částice pro zachování elektroneutality systému. Jedna částice odpovídá jednoatomovému iontu s jeho nejbližší hydratační vrstvou. (Marrink *et al.* 2009) Systémy byly v simulačních boxech solvatovány modelem vody, kde jeden bead reprezentuje 4 molekuly vody (Marrink *et al.* 2007) v přibližném poměru 13 beadů solventu na 1 lipid. 10 % částic solventu bylo nahrazeno tzv. antifreeze částicemi, zabraňující nefyzikálnímu zamrznutí systému.

Celkem takto bylo vygenerováno 6 systémů s čistými a 33 systémů se směsnými membránami. Velikost simulačního boxu byla zvolena 10x10x10 nm, což vedlo k vytvoření membrán o velikosti 168 lipidů na vrstvu pro smíšené a 169 lipidů na vrstvu pro čisté membrány. Rozdíl je způsoben postupem programu Insane při vkládání lipidů do systému.



Obr. 6 Strukturální vzorce fosfolipidů, ze kterých se skládají modelové membrány.

3.3 Metody MD simulací

Topologie pro silové pole MARTINI byly získány z webu <http://cgmartini.nl/index.php/force-field-parameters>. Konkrétně byly použity soubory *martini_v2.2.itp*, *martini_v2.0_lipids_all_201506.itp* a *martini_v2.0_ions.itp* pro definice CG částic, lipidů a iontů. Výpočty pro modelové systémy pak byly prováděny programem gmx mdrun softwarového balíku GROMACS 4.5.1 na počítačovém clusteru Ingwe poskytnutým Katedrou fyzikální chemie Univerzity Palackého.

Na modelových systémech byly nejprve provedeny minimalizace energie systému metodou nejstrmějšího sestupu. Maximální délka procesu byla nastavena na délku 400 ps se simulačním krokem o délce 0.04 ps. Koordináty a rychlosti částic byly zapisovány do výstupu každých 200 ps. Každých Na konci byly zaznamenávány energie systému do .log souboru a každé 4 ps do .edr souboru. Trajektorie byly ukládány každých 40 ps do .xtc souboru. Sousední částice pro výpočet nevazebných interakcí byly zjišťovány pomocí

mřížky každých 0.4 ps. Periodické podmínky byly nastaveny pro všechny směry. Nevazebné interakce byly vypočítány za pomoci Coulumbického a posunutého LJ potenciálu. Cut-off pro LJ byl nastaven na 1,2 nm s postupným snižováním síly na nulu od 0.9 nm. Dalekodosahové interakce byly počítány do vzdálenosti 1,2 nm.

Minimalizované systémy byly ekvilibrovány metodou leap-frog integrátoru po dobu 200 ns o se simulačním krokem délce 0,002 ps. Každých 20 ps byly zaznamenávány energie do .log a .edr souboru a trajektorie do .xtc souboru. Záznamy energií v .edr soubory byly rozděleny do skupin podle typu molekuly. Ekvilibrace proběhla za stálého tlaku 1 baru a stálé teploty 310 K. Korekce teploty proběhla každou pikosekundu za pomoci v-rescale termostatu využívajícím stochastického škálování rychlosti. Korekce tlaku proběhla každých 12 ps barostatem parrinello-rahman. Použito bylo semiisotropní prostředí s kompresibilitou $3 \cdot 10^{-4} \text{ bar}^{-1}$.

S ekvilibrovanými systémy byla provedena výsledná simulace trvající 1000 ns se simulačním krokem o délce 0,01 ps. Ostatní parametry simulace byly totožné s parametry ekvilibrace.

3.4 Analýzy strukturních parametrů membrán

Na výstupech výsledných simulací byly provedeny analýzy membránových parametrů. Všechny nástroje použité pro analýzy jsou součástí softwarového balíku GROMACS 2018.1. Pro výpočet tloušťky membrány, plochy lipidu a parametrů uspořádání byly výsledné simulace rozděleny na 10 částí po 100 ns. Poté byla každá část samostatně analyzována a výsledné hodnoty byly stanoveny jako průměry a odchylky souhrnu těchto parciálních analýz.

Tloušťky membrán (D_{HH}) byly vypočteny z profilů elektronové hustoty vzhledem k ose kolmé na plochu membrány. Tyto hodnoty byly získány nástrojem gmx density z trajektorií. D_{HH} pak byly určeny jako vzdálenost maxim elektronových hustot pro PO4 beady (reprezentující fosfátovou skupinu).

Průměrné plochy lipidu (A_L) byly stanoveny jako průměrná velikost plochy simulačního boxu podél os x y (což odpovídá orientaci plochy membrány) během simulace vydělené počtem fosfolipidů na vrstvu. Rozměry simulačního boxu byly získány programem gmx energy.

Parametry uspořádání (S_{CD}) acylových řetězců byly získány pomocí programu gmx order. Tento program určuje parametr uspořádání pro částici i z úhlu která svírá spojnice mezi částicemi $i+1$ a $i-1$ vzhledem k ose kolmé na plochu membrány. (Abraham *et al.* 2015)

Difuzní koeficienty (D_L) byly určeny z křivek tzv. mean square displacement na ploše orientované podle plochy membrány. Tyto křivky byly zvlášť pro každý druh lipidu v systému získány programem gmx msd. Poté byla z těchto křivek vyčleněna data pro prvních 7000 ps výsledné simulace. Tato data pak byla rozdělena na kratší časové úseky, pro které byly zjištěny hodnoty D_L programem lineární regresi provedenou programem gmx analyze. Takto získané hodnoty bylo nutné vynásobit čtyřmi, kvůli zrychlení difuzních dějů v silovém poli MARTINI.

3.5 Koeficienty permeability

Permeabilitní koeficienty byly získány z databáze MolMeDB. Data byla vybrána pro sloučeniny, kde jsou dostupné koeficienty permeability z experimentů a výpočtů pro dvě a více z modelových membrán. Dalším kritériem byla teplota při experimentu či simulovaného systému v rozmezí 295 až 315 K. Užší rozmezí by vedlo k nedostatku dat pro srovnání, přičemž širší by už zahrnovalo struktury ve stavu příliš odlišném tomu při simulované teplotě 310 K.

Pro srovnání propustností různých membrán byly vypočítány průměrné hodnoty a určen rozsah udávaných hodnot. Experimentální a vypočtené hodnoty byly srovnávány zvlášť.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Parametry membrán v závislosti na jejich složení

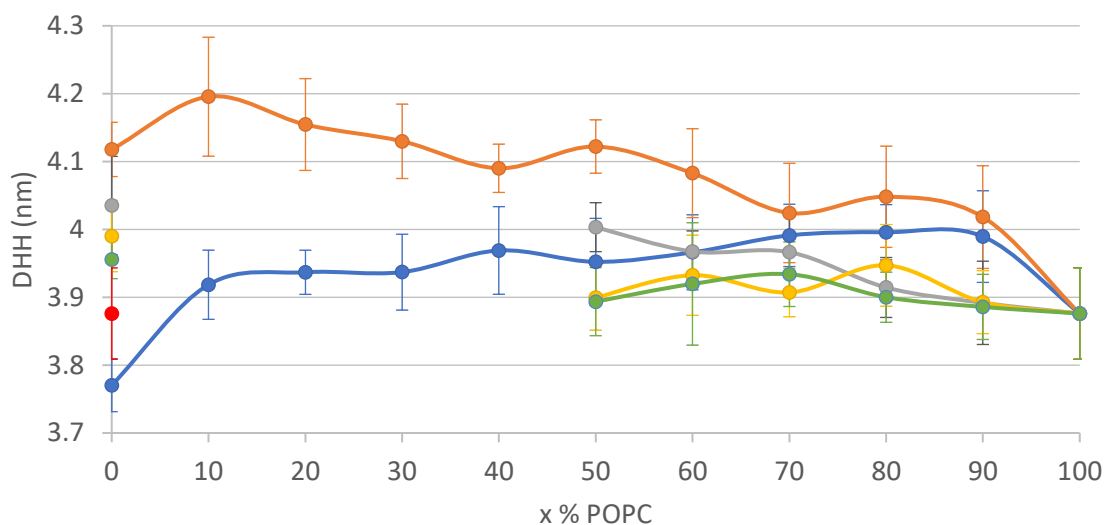
Jak již bylo popsáno výše, u jednotlivých simulovaných membrán jsme sledovali následující parametry – tloušťky membrán, plochu lipidů, parametry uspořádanosti a laterální difuzi

4.1.1 Tloušťky membrán

Data pro tloušťky membrán (D_{HH}) se vyznačují výraznými směrodatnými odchylkami. Změny směsných poměrů membrán také nevedly k jednoznačnému trendu ve změně D_{HH} (Obr. 7). Tyto nejednoznačnosti jsou zřejmě způsobeny relativně výraznou fluktuací jednotlivých fosfolipidů v rámci vrstvy membrány nebo příliš hrubým přiblížením použitého výpočetního modelu. Přesto lze vysledovat trend, projevující se u membrán složených z cholinových lipidů, kdy se po zavedení příměsi do POPC membrány v podstatě libovolného dalšího sledovaného lipidu se D_{HH} zvětší, ale čisté DOPC a DPPC membrány mají opět menší tloušťky než jejich směsi s POPC. Tento trend je zřejmě způsoben nesouladem v geometriích acylových řetězců.

Mimo to lze z dat pro čisté membrány poměrně s jistotou určit, že ne/nasycenost vazeb řetězců má výraznější vliv na D_{HH} než druh hlavičky. Z dat plyne pořadí od největší D_{HH} po nejmenší jako: DPPC, POPx, DOPC. Zřejmě jde o efekt cis dvojných vazeb v oleoylovém řetězci, které jej ohýbají, což vede ke zúžení membrány. Tyto výsledky ale nereflktují kratší délku palmitoylových řetězců oproti oleoylovým, protože silové pole MARTINI oba reprezentuje čtyřmi beady. Nicméně jak ukazuje srovnání s literaturou, přesnost predikce D_{HH} pomocí CG simulací je srovnatelná s AA simulací (Tab. 1).

Hlavičky mají vliv sice menší, ale přesto pozorovatelný – tloušťka u POPx se zmenšuje v pořadí POPE > POPG ~ POPS > POPC. POPE má ethanolaminovou hlavičku, která je schopna vytvářet vodíkové můstky s vodami, přičemž tato hydratace zřejmě membránu nabobtná a zvýší tloušťku. Následují negativně nabitě lipidy POPG a POPS, které mají v podstatě podobné tloušťky a zřejmě tedy podobné hydratační chování – ale protože se navzájem negativně nabitě hlavičky odpuzují, tak se „bobtnání“ projevuje spíše zvětšením plochy lipidů (viz následující kapitola). Cholinová hlavička u POPC pak zřejmě není natolik hydratována, a proto oproti jiným lipidovým hlavám tvoří méně tlusté membrány.



Obr. 7 Vývoj tloušťky membrán (D_{HH}) v nm při změně podílu POPC. Nalevo jsou zaznačeny čisté membrány složené z jednoho druhu fosfolipidu a směrem doprava stoupá podíl POPC. Modrá barva označuje směs DOPC:POPC, oranžová DPPC:POPC, šedá POPE:POPC, žlutá POPG:POPC, zelená POPS:POPC, červená POPC.

Tab. 1 Srovnání tloušťky čistých membrán (D_{HH}) v nm z naší CG simulace, AA simulací a experimentů. Kde bylo zjištěno více hodnot, je uvedena maximální minimální zjištěná hodnota.

membrána	CG simulace	experiment	AA simulace
DOPC	$3,77 \pm 0,04$	$3,53^* - 3,71^\dagger$	$3,57^{***} - 3,79^{\dagger\dagger}$
DPPC	$4,12 \pm 0,04$	$3,78^\ddagger - 3,96^\S$	$3,60^{\dagger\dagger\dagger} - 3,67^{\S\S\S}$
POPC	$3,88 \pm 0,07$	$3,7^{**}$	$3,66^{****} - 3,93^{\dagger\dagger\dagger\dagger}$
POPE	$4,04 \pm 0,07$	$4,00^{\dagger\dagger}$	$4,11 - 4,46^{\dagger\dagger\dagger\dagger}$
POPG	$3,99 \pm 0,05$	$3,73 - 3,74^{\ddagger\dagger}$	–
POPS	$3,96 \pm 0,03$	$4,22^{\S\S}$	$4,06^{\S\S}$

*Tristram-Nagle *et al.* 1998, † Liu a Nagle 2004, ‡ Kučerka *et al.* 2006a, § Nagle *et al.* 1996, ** Kučerka *et al.* 2009, †† Rappolt *et al.* 2003, ‡† Kučerka *et al.* 2012, §§ Pan *et al.* 2014a, *** Ercan *et al.* 2016, ††† Reigada 2013, ‡†† Kruczek *et al.* 2017, §§§ Pandit *et al.* 2008, **** Pandit *et al.* 2004, †††† Pluhackova *et al.* 2016

Jak ukazuje Tabulka 1, ve srovnání s experimentem udávají CG simulace systematicky vyšší D_{HH} . Výjimkou je POPS, kde je ale udávána relativně výrazně vyšší experimentálně změřená tloušťka než v jiných případech. V tomto případě se také CG simulace od experimentu liší nejvíce, ale AA simulace i v tomto případě udávají porovnatelné výsledky. K nevýraznějšímu nadhodnocení vůči experimentu pak došlo u DPPC, kde hraje roli již zmíněná CG reprezentace.

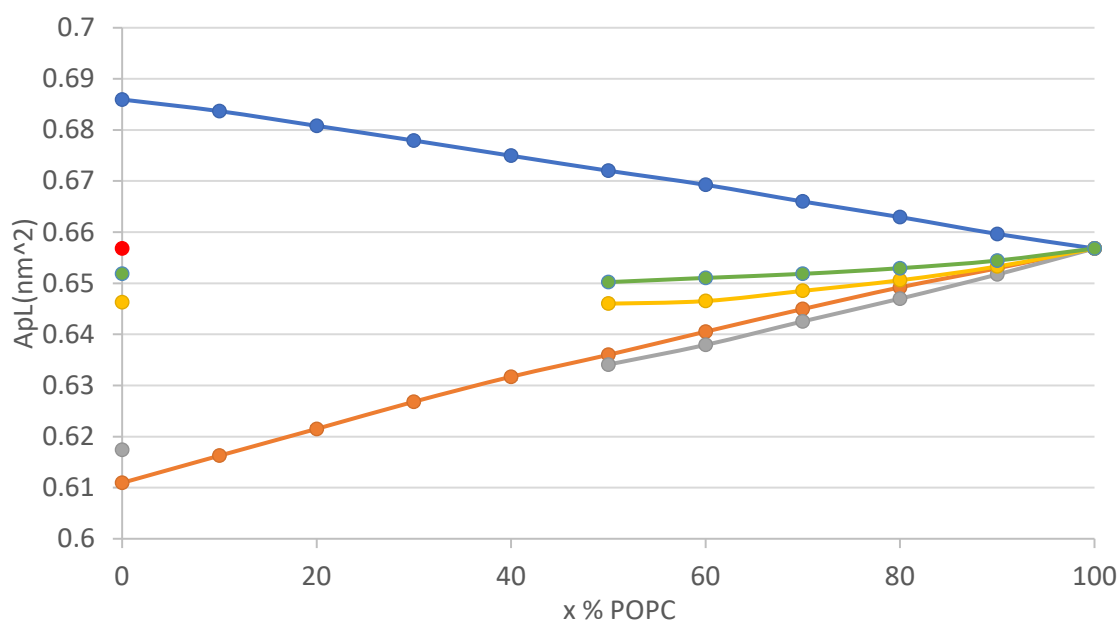
4.1.2 Plochy lipidů

Data pro plochy lipidu (A_L) vykazují na rozdíl od tloušťek D_{HH} při změně směsných poměrů jednoznačné lineární trendy (Obr. 8). Výrazně největší A_L je možno pozorovat pro DOPC, kde se A_L se zvyšováním podílu POPC zmenšuje. Opačný trend pak nastává pro DPPC. Z toho je možno usoudit že významnou roli hraje podíl ne/nasycených acylových řetězců v membráně. Dvojná vazba v řetězci zřejmě vede k nepravidelnosti v uspořádání, čímž se zvětšuje prostor nutný k umístění fosfolipidu. Nasycené řetězce naopak umožňují těsnější uspořádání.

Výrazně malé A_L lze pozorovat u POPE, kde je těsné uspořádání zřejmě způsobeno ethanolaminovou hlavičkou, kde aminová skupina může sloužit jako donor pro vodíkovou vazbu. Při zvyšování podílu POPC klesá tento vliv na A_L pomaleji než vliv vysokého podílu nasycených vazeb. V případě POPG a POPS je tento trend výrazně snížen odpuzování kvůli shodnému parciálnímu náboji fosfolipidů, přesto A_L membrán obsahující tyto lipidy zůstává menší než pro membránu z čistého POPC, ale jak víme z předchozí kapitoly, dochází u nich ke zvětšování tloušťky membrány.

Překvapivě nízká míra směrodatných odchylek (v řádech 10^{-4} nm²) může být způsobena CG reprezentací omezující možnosti prostorového uspořádání lipidu. Nicméně i přes toto omezení jsou hodnoty A_L získané CG simulacemi srovnatelné s daty z AA simulací, co se týká přiblížení se experimentům (viz Tab. 2).

V případě DOPC, POPG a POPC spadají A_L vypočítané CG simulacemi do rozmezí experimentálních hodnot. U DPPC došlo k mírnému podhodnocení a v ostatních případech k mírnému nadhodnocení oproti experimentu.



Obr. 8 Vývoj plochy lipidu (A_L) v nm^2 při změně podílu POPC. Nalevo jsou zaznačeny čisté membrány složené z jednoho druhu fosfolipidu a směrem doprava stoupá podíl POPC. Modrá barva označuje směs DOPC:POPC, oranžová DPPC:POPC, šedá POPE:POPC, žlutá POPG:POPC, zelená POPS:POPC, červená POPC.

Tab. 2 Srovnání plochy lipidu čistých membrán (A_L) v nm^2 z CG simulací, AA simulací a experimentů. Kde bylo zjištěno více hodnot, je uvedena maximální minimální zjištěná hodnota.

membrána	CG simulace	experiment	AA simulace
DOPC	$0,686 \pm 0,0004$	$0,669^* - 0,724^\dagger$	$0,64^{\text{§§§}} - 0,702^{\text{****}}$
DPPC	$0,611 \pm 0,0004$	$0,629^\ddagger - 0,643^\S$	$0,571^{\text{†††}} - 0,654^{\text{††††}}$
POPC	$0,657 \pm 0,0005$	$0,593^{**} - 0,683^{\text{††}}$	$0,605^{\text{§§§§}} - 0,680^{\text{****}}$
POPE	$0,617 \pm 0,0005$	$0,580^{\text{††}} - 0,590^{\text{§§}}$	$0,502 - 0,564^{\text{§§§§}}$
POPG	$0,646 \pm 0,0005$	$0,643^{\text{***}} - 0,663^{\text{†††}}$	–
POPS	$0,652 \pm 0,0005$	$0,627^{\text{†††}}$	$0,620^{\text{†††}}$

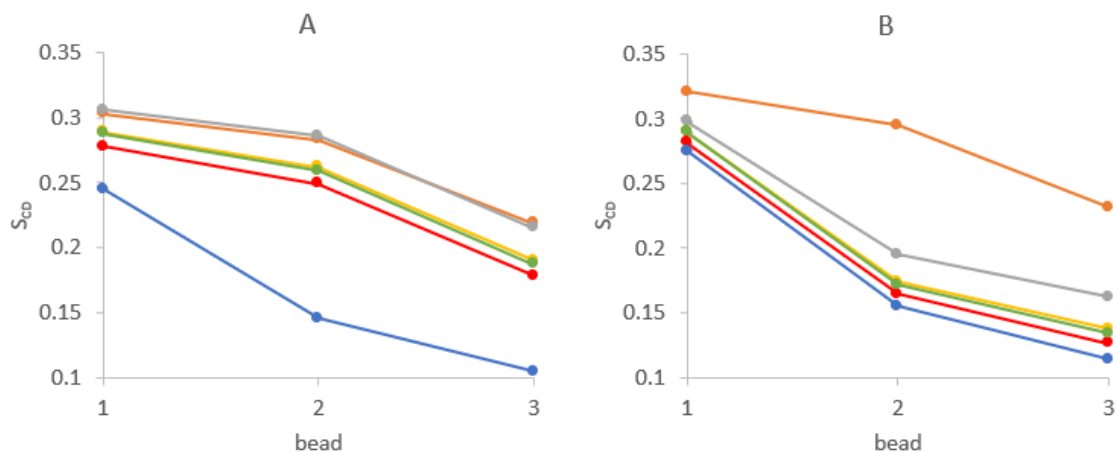
*Kučerka *et al.* 2009, †Kučerka *et al.* 2006b, ‡Nagle *et al.* 1996, §Kučerka *et al.* 2006a, **Leftin *et al.* 2014, ††Kučerka *et al.* 2009, ††† Kučerka *et al.* 2015, †††† Rappolt *et al.* 2003, ***Pan *et al.* 2014b, †††††Kučerka *et al.* 2012, †††††Pan *et al.* 2014a, †††††Pandit *et al.* 2008, †††††Ercan *et al.* 2016, †††††Kargan *et al.* 2017, †††††Dai *et al.* 2010, †††††Pluhackova *et al.* 2016, †††††Hénin *et al.* 2008.

4.1.3 Parametry uspořádanosti

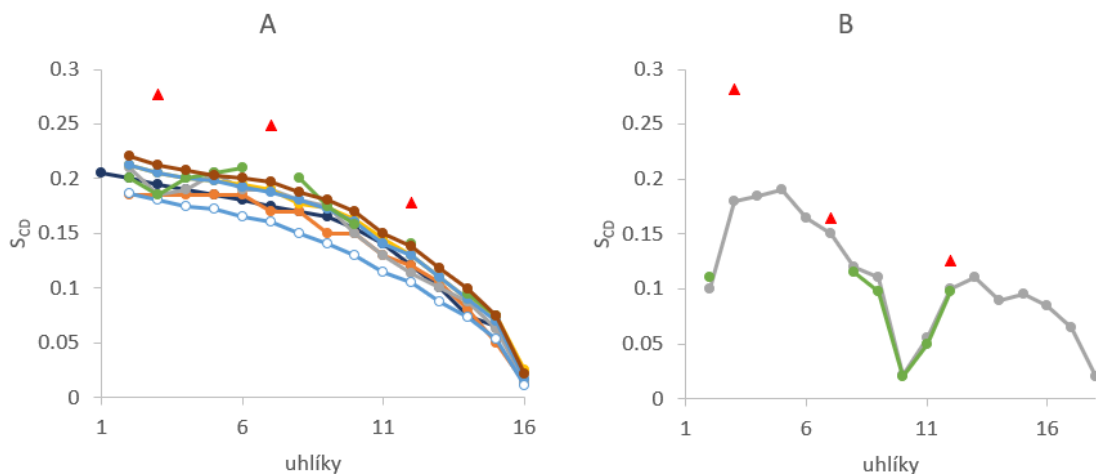
Parametry uspořádanosti (S_{CD}) byly vypočítány vždy pro první tři beady řetězce ve směru od hlavičky, což přibližně odpovídá prvním patnácti uhlíkům ve stejném směru. Společným trendem je klesání S_{CD} ve směru do středu membrány což reflektuje neuspořádanost řetězců v této oblasti (Obr. 9). U všech oleoylových řetězců byl zaznamenán prudký pokles S_{CD} na druhém beadu, zahrnujícím uhlíky 9 a 10 odpovídající přítomnosti cis dvojně vazby. Tyto trendy velmi dobře korespondují s daty zjištěnými experimentálními metodami (Obr. 10) a AA simulacemi (Obr. 11). Nicméně CG simulace mají tendenci uvádět hodnoty S_{CD} vyšší což plyne ze snížení stupňů volnosti kvůli zhrubení systému, a tedy jeho vyšší organizovanosti (která odpovídá i dobře známému posunu teploty fázového přechodu u silového pole MARTINI). Ze stejného důvodu byly zjištěny i minimální směrodatné odchylky (maximálně v řádech 10^{-3}).

Při srovnání jednosložkových membrán byly zjištěny nejvyšší hodnoty S_{CD} pro DPPC a nejnižší pro DOPC, což plyne z povah jejich řetězců. Cis dvojně vazby způsobují ohyb řetězců, což vede k nižšímu uspořádání v systému. Vysoký podíl nasycených řetězců má efekt opačný. Nicméně S_{CD} nenasyčeného sn1 řetězce POPE dosahuje přibližně stejných hodnot jako DPPC (pro první a druhý bead dokonce nepatrně větších). Relativně vysoká míra uspořádání POPE zahrnuje i oleoylový sn2 řetězec. Zřejmě je to způsobeno interakcemi mezi beady fosfátových hlaviček a dříve zmíněnou menší plochou tohoto lipidu, která si vynucuje těsnější uspořádání lipidů a tím napomáhají pravidelnější orientaci lipidu v rámci vrstvy. S_{CD} POPG a POPS je také vyšší než pro POPC, ale vzájemné odpuzování tuto pravidelnost zřejmě narušuje.

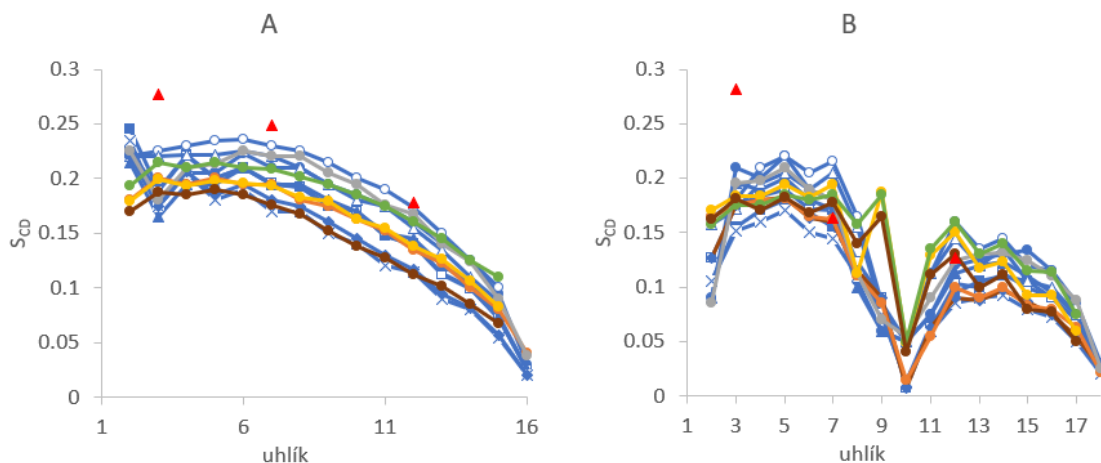
V případě smíšených membrán, měla přítomnost druhé složky na S_{CD} POPC relativně malý vliv. (Obr. 12) Nicméně je vidět že přítomnost složky s tendencí k vyšší míře uspořádání vede k vyšším hodnotám S_{CD} POPC a naopak.



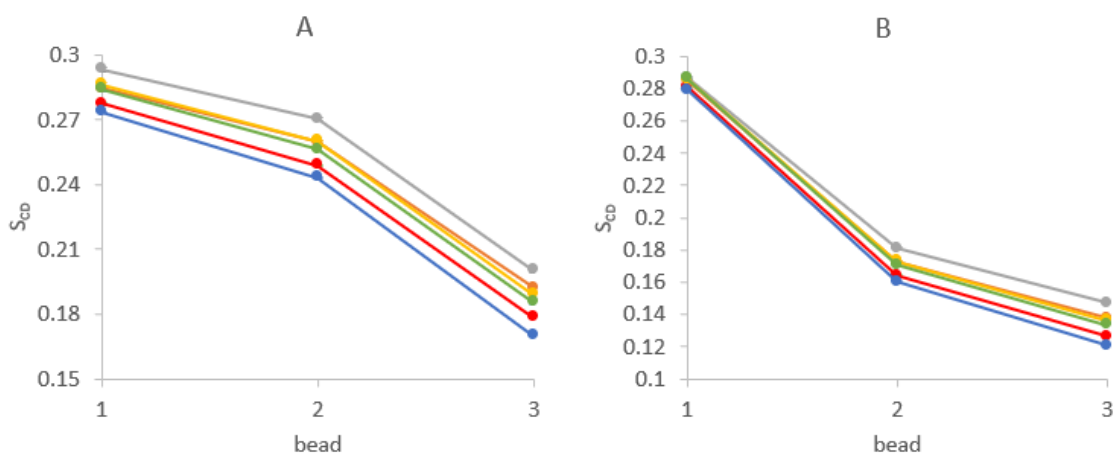
Obr. 9 Parametry uspořádaní (S_{CD}) sn1 řetězců (A) a sn2 řetězců (B) lipidů jednosložkových membrán. Modrá barva značí DOPC, oranžová DPPC, šedá POPE, žlutá POPG, zelená POPS a červená POPC membránu.



Obr. 10 Srovnání parametrů uspořádaní (S_{CD}) sn1 řetězců (A) a sn2 řetězců (B) POPC jednosložkové membrány zjištěných CG simulací a experimentálními metodami. Červené trojúhelníky jsou hodnoty z našich CG simulací. Experimentální značky barvy: tmavě modrá ref (Abu-Baker *et al.* 2007), oranžová ref (Salnikov *et al.* 2009), šedá ref (Ferreira *et al.* 2013), žlutá ref (Lafleur *et al.* 1990a), světle modrá ref (Lafleur *et al.* 1990b), zelená ref (Seelig a Waespe-Sarcevic 1978) a hnědá ref (Lafleur *et al.* 1989).



Obr. 11 Srovnání parametrů uspořádání (S_{CD}) sn1 řetězců (A) a sn2 řetězců (B) POPC jednosložkové membrány zjištěných CG simulací a AA simulacemi. Červené trojúhelníky jsou hodnoty z našich CG simulací. Hodnoty AA simulací značeny barevně: modrá ref (Pluhackova *et al.* 2016), oranžová ref (Ferreira *et al.* 2013), šedá ref (Janosi a Gorfe 2010), žlutá ref (Zhao *et al.* 2007), zelená ref (Loura *et al.* 2013), hnědá ref (Elmore 2005).



Obr. 12 Parametry uspořádání (S_{CD}) sn1 řetězců (A) a sn2 řetězců (B) POPC ve smíšených membránách s 50 % koncentrací DOPC (modře), DPPC (oranžově), POPE (šedě), POPG (žlutě), POPS (zeleně). Červeně jsou pro srovnání uvedena data pro jednosložkovou POPC membránu.

4.1.4 Laterální difuze

V závislosti na čase odběru křivky středního posunu lipidu (MSD) se lišila i hodnota difúzního koeficientu D_L a tato hodnota s časem klesala (Obr. 13). Byly zjištěny relativně výrazné rozdíly v laterálních difuzích jednosložkových cholinových membrán (Obr. 13). S klesajícím podílem nenasycených řetězců jednoznačně klesá D_L v membráně – uspořádanější membrány jako DPPC méně difundují. Geometrie cis dvojných vazeb dvojných řetězců zjevně vede ke ztížení nalezení energeticky výhodnějšího uspořádání v rámci vrstvy membrány. Změna cholinových hlaviček za ethanolaminové, glycerolové a serinové vedla k ještě většímu snížení D_L oproti POPC. Pravděpodobně to bylo způsobeno vyšší mírou silnějších nevazebných interakcí mezi hlavičkami a v případě POPG a POPS i vzájemným odpuzováním kvůli parciálnímu náboji hlaviček. Tyto nevazebné interakce takto omezily možnosti pohybů jednotlivých molekul v rámci vrstvy membrány.

čas (ps)	DOPC	DPPC	POPC	POPE	POPG	POPS
0	4.90E-06	4.38E-06	4.69E-06	4.24E-06	4.44E-06	4.38E-06
100	2.45E-06	2.11E-06	2.31E-06	2.05E-06	2.13E-06	2.11E-06
200	1.93E-06	1.67E-06	1.82E-06	1.62E-06	1.67E-06	1.66E-06
300	1.66E-06	1.44E-06	1.57E-06	1.40E-06	1.43E-06	1.42E-06
400	1.48E-06	1.29E-06	1.41E-06	1.25E-06	1.28E-06	1.27E-06
500	1.35E-06	1.18E-06	1.29E-06	1.15E-06	1.17E-06	1.16E-06
600	1.27E-06	1.10E-06	1.20E-06	1.07E-06	1.10E-06	1.09E-06
700	1.20E-06	1.05E-06	1.13E-06	1.02E-06	1.04E-06	1.03E-06
800	1.14E-06	1.00E-06	1.09E-06	9.69E-07	9.90E-07	9.79E-07
900	1.09E-06	9.57E-07	1.04E-06	9.33E-07	9.50E-07	9.34E-07
1000	1.05E-06	9.15E-07	9.87E-07	8.87E-07	9.06E-07	8.95E-07
1200	9.91E-07	8.72E-07	9.43E-07	8.44E-07	8.67E-07	8.44E-07
1400	9.58E-07	8.37E-07	9.02E-07	8.09E-07	8.27E-07	8.10E-07
1600	9.26E-07	8.11E-07	8.74E-07	7.84E-07	8.01E-07	7.79E-07
1800	8.99E-07	7.84E-07	8.53E-07	7.63E-07	7.79E-07	7.57E-07
2000	8.69E-07	7.51E-07	8.23E-07	7.33E-07	7.48E-07	7.29E-07
2500	8.32E-07	7.20E-07	7.89E-07	7.01E-07	7.20E-07	7.00E-07
3000	8.07E-07	6.98E-07	7.62E-07	6.80E-07	6.94E-07	6.81E-07
3500	7.87E-07	6.79E-07	7.51E-07	6.65E-07	6.79E-07	6.66E-07
4000	7.71E-07	6.68E-07	7.43E-07	6.58E-07	6.68E-07	6.50E-07
4500	7.60E-07	6.60E-07	7.31E-07	6.57E-07	6.64E-07	6.41E-07
5000	7.53E-07	6.60E-07	7.25E-07	6.52E-07	6.61E-07	6.35E-07
5500	7.50E-07	6.54E-07	7.17E-07	6.42E-07	6.54E-07	6.27E-07
6000	7.50E-07	6.52E-07	7.12E-07	6.39E-07	6.48E-07	6.24E-07
6500	7.48E-07	6.50E-07	7.09E-07	6.35E-07	6.48E-07	6.25E-07

Obr. 13 Míry laterální difuze (D_L) lipidů v $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ pro jednosložkové membrány v prvních 7 ns výsledné simulace. Zelená barva značí vyšší míru D_L a směrem k červené klesá.

čas (ps)	DOPC	DPPC	POPC	POPE	POPG	POPS
0	4.77E-06	4.57E-06	4.69E-06	4.47E-06	4.51E-06	4.50E-06
100	2.37E-06	2.24E-06	2.31E-06	2.17E-06	2.21E-06	2.21E-06
200	1.87E-06	1.77E-06	1.82E-06	1.71E-06	1.75E-06	1.75E-06
300	1.61E-06	1.51E-06	1.57E-06	1.46E-06	1.50E-06	1.50E-06
400	1.44E-06	1.35E-06	1.41E-06	1.30E-06	1.34E-06	1.35E-06
500	1.32E-06	1.24E-06	1.29E-06	1.20E-06	1.23E-06	1.24E-06
600	1.23E-06	1.16E-06	1.20E-06	1.12E-06	1.15E-06	1.16E-06
700	1.16E-06	1.10E-06	1.13E-06	1.06E-06	1.09E-06	1.09E-06
800	1.12E-06	1.04E-06	1.09E-06	1.01E-06	1.05E-06	1.04E-06
900	1.07E-06	9.97E-07	1.04E-06	9.71E-07	1.00E-06	1.00E-06
1000	1.02E-06	9.51E-07	9.87E-07	9.23E-07	9.57E-07	9.45E-07
1200	9.65E-07	9.04E-07	9.43E-07	8.80E-07	8.98E-07	8.93E-07
1400	9.28E-07	8.68E-07	9.02E-07	8.43E-07	8.56E-07	8.58E-07
1600	8.94E-07	8.40E-07	8.74E-07	8.21E-07	8.30E-07	8.29E-07
1800	8.72E-07	8.22E-07	8.53E-07	8.01E-07	8.05E-07	8.01E-07
2000	8.38E-07	7.88E-07	8.23E-07	7.77E-07	7.76E-07	7.65E-07
2500	8.08E-07	7.56E-07	7.89E-07	7.46E-07	7.55E-07	7.37E-07
3000	7.86E-07	7.33E-07	7.62E-07	7.27E-07	7.30E-07	7.17E-07
3500	7.74E-07	7.21E-07	7.51E-07	7.08E-07	7.20E-07	7.03E-07
4000	7.59E-07	7.07E-07	7.43E-07	6.95E-07	7.12E-07	6.86E-07
4500	7.50E-07	6.97E-07	7.31E-07	6.89E-07	6.96E-07	6.72E-07
5000	7.45E-07	6.92E-07	7.25E-07	6.87E-07	6.91E-07	6.62E-07
5500	7.36E-07	6.85E-07	7.17E-07	6.79E-07	6.89E-07	6.58E-07
6000	7.31E-07	6.84E-07	7.12E-07	6.82E-07	6.88E-07	6.55E-07
6500	7.33E-07	6.82E-07	7.09E-07	6.77E-07	6.86E-07	6.48E-07

Obr. 14 Míry laterální difuze (D_L) POPC v $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ pro membrány s 50% podílem druhé složky prvních 7 ns výsledné simulace. Pro srovnání jsou uvedeny hodnoty jednosložkové membrány složené z POPC. Zelená barva značí vyšší míru D_L a směrem k červené se snižuje.

V případě smíšených membrán byl pozorován trend, kdy přítomnost složky, jejíž čistá membrána se vyznačovala vyššími hodnotami D_L , vedla ke zvýšení D_L druhé složky a naopak. Tento trend ilustrují změny chování POPC v 50% koncentraci druhé příměsi (Obr. 14).

Ve srovnání s experimentem (Tab. 3) udávají data z CG simulací několikanásobně vyšší hodnoty D_L , ale trend snížení D_L při snížení podílu nasycených vazeb udávají správně.

Tab. 3 Srovnání laterální difuze (D_L) čistých cholinových membrán v $\times 10^{-8} \text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ z naší CG simulace a experimentu.

membrána	CG simulace	experiment
DOPC	75.5 ± 0.9	16*
DPPC	65.7 ± 0.7	7,6†
POPC	72.3 ± 1.3	$12,9 \pm 1,2‡$

*Filippov *et al.* 2003, †Naqvi *et al.* 1974, ‡Landha *et al.* 1996

4.2 Permeabilitní koeficienty

Z databáze MolMeDB byly získány koeficienty permeability (logP) pro látky, kde existoval záznam o koeficientu permeability pro více než jednu modelovou membránu získané experimentem (Tab. 4) nebo výpočetními metodami (Tab. 5). Pro POPS nebyla nalezena data žádná.

Tab. 4 Hodnoty logP (cm·s⁻¹) získané experimentem.

permeant	DOPC	DPPC	POPC
voda	-2,38* -4,15† -4,32‡ -3,60§	-3,08**	-1,87††
amoniak	–	0,38‡‡	-1,44§§
močovina	–	-5,46‡‡	-5,89§§
acetamid	–	-4,19‡‡	-4,28§§
glycerol	–	-6,00‡‡	-7,77***

*Olbrich *et al.* 2000, †Rawicz *et al.* 2008, ‡Yoshitani a Yomazaki, § Huster *et al.* 1997, **Winter a Schatz 2010, ††Hill *et al.* 1999, ‡‡Koenig *et al.* 1992, §§Lande *et al.* 1995, ***Peterlin *et al.* 2009

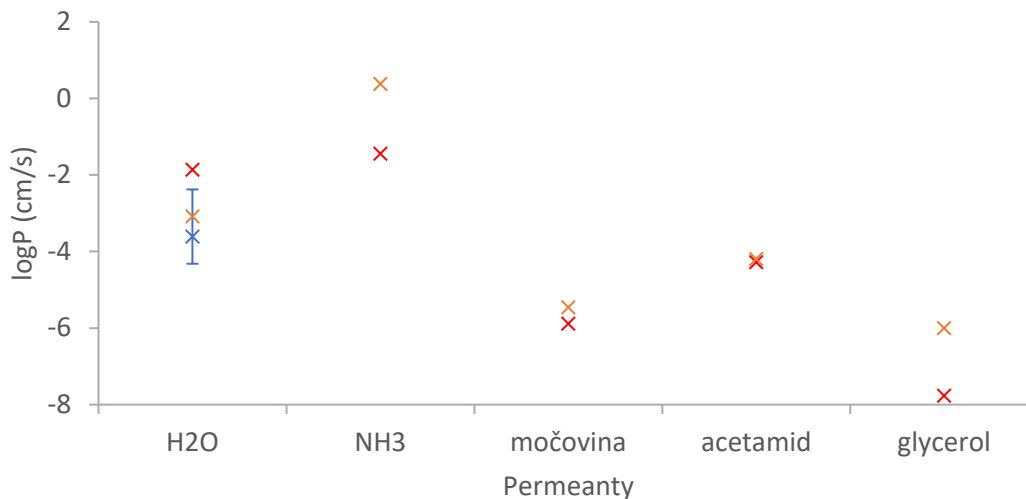
V případě že bylo zjištěno více hodnot, byl vypočítán průměr a rozsah hodnot (Obr. 15, Obr. 16). V některých případech rozsahy permeabilitních koeficientů (naměřených i vypočtených) pro různé membrány jsou tak široké, že navzájem překrývají. Už jen z tohoto důvodu lze o metodě srovnávání průměru mluvit přinejlepším jako o hrubém odhadu. Také je nutno přihlídnout k faktu, že hodnoty nebyly získány všechny za stejných teplot.

Experimentální údaje o permeabilitách byly získány jen pro cholinové membrány. Z těchto dat se zdá že DPPC je propustnější než POPC. Pro DOPC byly zjištěny jen permeability vody, kde se DOPC jeví paradoxně jako nejméně propustná z cholinových membrán. Nicméně naměřené hodnoty permeability vody pro DOPC mají široký rozsah, kvůli čemuž je třeba ji brát s určitou rezervou.

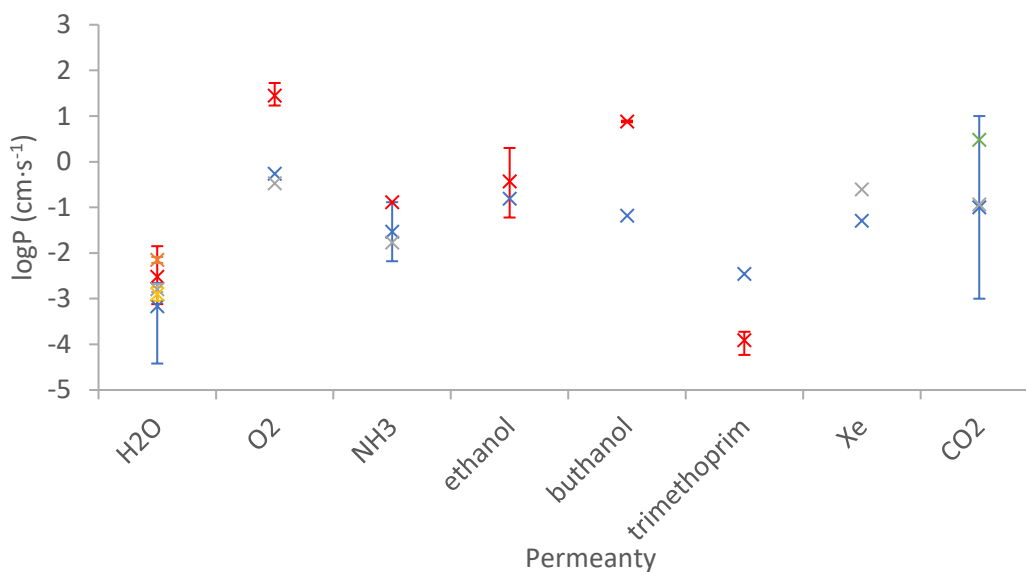
Tab. 5 Výpočetně získané hodnoty logP (cm·s⁻¹).

permeant	DOPC	DPPC	POPC	POPE	POPG	POPE:POPC
H ₂ O	-2,66*	-2.08*	-2,85*	-2.85*	-3,05*	–
	-2,89*	-2.21*	-2,92*	-2.82*	-2,74*	
	-2,82*	-2.17*	-2,89*	-2.82*	-2,80*	
	-2,79*	-2.13*	-2,68*	-2.67*	-3,00*	
	-3,40 [†]		-2,19 ^{‡‡}			
	-4,42 [‡]		-2,17 ^{‡‡}			
			-1,85 ^{‡‡}			
			-2,12 ^{‡‡}			
			-2,48 ^{‡‡}			
			-2,09 ^{‡‡}			
			-2,36 ^{§§}			
			-3,12 ^{§§}			
			-3,06 ^{§§}			
	O ₂	-0,27 [§]	–	1,23*	-0,47 [§]	–
			1,41*			
			1,72 ^{***}			
			1,41 ^{†††}			
NH ₃	-2,18 [†]	–	-0,89 ^{‡‡‡}	-1,77 ^{‡‡‡}	–	–
	-0,89 ^{**}					
ethanol	-0,81 [†]	–	-0,09 ^{§§§}	–	–	–
			-0,07 ^{§§§}			
			0,30 ^{****}			
			-1,07 ^{††††}			
			-1,22 ^{††††}			
buthanol	-1,18 ^{††}	–	0,86 ^{§§§}	–	–	–
			0,90 ^{§§§}			
trimethoprim	-2,46 ^{††}	–	-3,76 ^{‡‡‡‡}	–	–	–
			-3,72 ^{‡‡‡‡}			
			-4,23 ^{‡‡‡‡}			
Xe	-1,29 [§]	–	–	-0,61 [§]	–	–
CO ₂	-3 [§]	–	–	-0,94 [§]	–	0.48 ^{‡‡‡}
	1 [†]					

*Venable *et al.* 2019, [†]Palaiokostas *et al.* 2018, [‡]Orsi *et al.* 2010, [§]Doniza *et al.* 2015, ^{**}Zocher *et al.* 2013, ^{††}MolMeDB, ^{‡‡}Carpenter *et al.* 2014, ^{‡‡}Comer *et al.* 2014a, ^{§§}Sajadi a Rowley 2018, ^{***}Dotson a Pias 2018, ^{†††}Ghysels *et al.* 2017, ^{‡‡‡}Hub *et al.* 2010, ^{§§§}Comer *et al.* 2017, ^{****}Comer *et al.* 2014b, ^{††††}Ghaemi *et al.* 2012, ^{‡‡‡‡}Sun *et al.* 2018



Obr. 15 Průměrné míry permeability ($\log P$) zjištěné experimentálními metodami. Vyznačen je i rozsah získaných hodnot. Modře DOPC, oranžově DPPC, červeně POPC.



Obr. 16 Průměrné míry permeability ($\log P$) zjištěné výpočetními metodami. Vyznačen je i rozsah získaných hodnot. Modře DOPC, oranžově DPPC, červeně POPC, šedě POPE, žlutě POPG, zeleně 50 % směs POPE:POPC. Ibuprofen -1 značí záporně nabitý iont.

Z nalezených experimentálních měření (Obr. 15) vyplývá poněkud překvapivý fakt, že membrána DPPC se zdá být propustnější než fluidnější membrány POPC a DOPC. U výpočetních metod (Obr. 16) je situace pestřejší, ale i zde se vyskytují případy, kdy je zorganizovanější POPC membrána řádově více propustná než nejčastější fluidní DOPC.

4.3 Souvislost strukturních parametrů a permeability

Získané permeability byly srovnány s vypočtenými vlastnostmi simulovaných membrán. V následujícím textu zkusíme porovnat předpokládané trendy strukturních parametrů s pozorovaným trendem permeabilitních koeficientů. Lze předpokládat, že by látky měly procházet přes membrány tehdy pokud:

- jsou tenčí (min. D_{HH}) – neboť se tak snižuje délka, přes kterou musí látka projít,
- mají dostatek prostoru kolem hlaviček (max A_L) – neboť v takovém případě se snadněji látka vmezeří do membrány,
- jsou neuspořádanější (min S_{CD}) – neboť pak se snáze vytvoří prostor v membráně pro průchod látky,
- jsou mobilnější (max D_L) – neboť se tak rychleji mohou dostat přes membránu.

Proto jsme podle těchto trendů porovnali jednotlivé parametry pro membrány vůči POPC membráně. Podobně jsme srovnali permeabilitní koeficienty a tam, kde jsme neměli data pro POPC (CO_2 , Xe) jsme použili srovnání s průměrným rozdílem DOPC od POPC (Obr. 17).

Podle klesající tloušťky lze seřadit čisté cholinové membrány: DPPC, POPC, DOPC, což je v přímém rozporu s předpokladem, že by se permeability měly s rostoucí D_{HH} snižovat. Je možné že toto pozorování samo o sobě není průkazné, vzhledem ke CG aproximaci délky palmitoylového řetězce, avšak stejná situace nastává i při srovnání ostatních parametrů s těmito daty. Vyšší míra uspořádanosti, menší plocha lipidů a nižší míra laterální difuze DPPC, to vše by dle předpokladů mělo vést k nižším mírám permeability, což ale ne vždy pozorujeme.

V případě vypočtených dat se situace opakuje. DPPC opět vykazuje nejvyšší míru permeability, tentokrát pro vodu. Z ostatních fosfolipidů POPE a POPG vykazují nižší permeability než POPC, což už koreluje s předpoklady o souvislostech membránových parametrů s permeabilitami, protože POPC vykazuje větší A_L a relativně výrazně vyšší míru laterální difuze než POPE a POPG, nicméně může jít i o projev nevazebných interakcí s charakterem vodíkových vazeb, které mohou ztěžovat průchod molekuly přes fosfátové hlavičky. Pro POPE však můžeme pozorovat relativně nízké permeability i u permeantů, které vodíkové vazby netvoří, jako jsou molekuly kyslíku a CO_2 .

	DOPC	DPPC	POPC	POPE	POPG	POPS
ΔD_{HH} (nm)	-0.1	0.2	0	0.2	0.1	0.1
ΔA_L (nm ²)	0.03	-0.05	0	-0.04	-0.01	0
ΔS_{CD}	-0.04	0.06	0	0.03	0.01	0.01
ΔD_L ($\times 10^{-8}$ cm ² ·s ⁻¹)	3.2	-6.6	0	-7.6	-6.6	-8.9
$\Delta \log P$ (cm·s ⁻¹)						
H ₂ O (exp)	-1.7	-1.2	0			
NH ₃ (exp)		1.8	0			
močovina (exp)		0.4	0			
acetamid (exp)		0.1	0			
glycerol (exp)		1.8	0			
H ₂ O	-0.6	0.4	0	-0.3	-0.4	
O ₂	-1.7		0	-1.9		
NH ₃	-0.6		0	-0.9		
ethanol	-0.4		0			
buthanol	-2.1		0			
trimethoprim	1.4		0			
CO ₂	-0.7		0	-0.6		
Xe	-0.7		0	0		

Obr. 17 Srovnání průměrných hodnot strukturálních parametrů jednosložkových membrán a permeabilit (logP) vzhledem k POPC. Zelená barva značí u parametrů příznivost hodnot vzhledem k permeabilitě a směrem k červené se snižuje. V případě permeabilit značí zelená barva vyšší míry permeability a směrem k červené se snižují.

Jediný zjištěný záznam pro prostupnost směsné membrány se nám podařilo zajistit pro oxid uhličitý na membráně POPC : POPE se směsným poměrem 1:1. Ta oproti membráně z čistého POPE vykazuje výrazně vyšší permeabilitu ($\Delta \log P = 1,42$) což by opět odpovídalo předpokladům o souvislosti struktury membrány a permeability.

Výsledky celkového srovnání membránových parametrů z CG simulace s permeabilitními koeficienty z literatury tedy neodpovídají předpokladům o souvislosti membránových parametrů a permeability. Tento závěr však ani předpoklady nevyvrací. CG silové pole MARTINI reprodukuje membránové parametry poměrně přesně, ale jak ukazují kombinace sloučenin a membrán, pro které bylo získáno více koeficientů permeability, srovnávání permeabilitních dat získaných různými metodami je velice problematické. Obzvláště viditelný je tento problém při srovnání maximálních a minimálních hodnot permeabilitních koeficientů (Obr. 18). Je velmi pravděpodobné, že tato různorodost metod vedla ke zkreslení výsledků a pro validní srovnávání bude tedy zapotřebí získat data získávaná jednotným způsobem na více membránách.

	DOPC		DPPC		POPC			POPE		POPG		POPS	
	max	min	max	min	max	avg	min	max	min	max	min	max	min
ΔD_{HH} (nm)	0	-0.2	0.3	0.2	0.1	0	-0.1	0.3	0.04	0.2	0.03	0.1	0
ΔA_L (nm ²)	0.03	0.03	-0.04	-0.05	0	0	0	-0.04	-0.04	-0.01	-0.01	0	-0.01
ΔS_{CD}	-0.04	-0.04	0.06	0.06	0	0	0	0.03	0.03	0.01	0.01	0.01	0.01
ΔD_L ($\times 10^{-8}$ cm ² ·s ⁻¹)	3.2	3.2	-6.6	-6.6	0	0	0	-7.6	-7.6	-6.6	-6.6	-8.9	-8.9
$\Delta \log P$ (cm·s ⁻¹)													
H ₂ O (exp)	-0.5	-0.5	-1.2	-1.2	0	0	0						
NH ₃ (exp)			1.8	1.8	0	0	0						
močovina (exp)			0.4	0.4	0	0	0						
acetamid (exp)			0.1	0.1	0	0	0						
glycerol (exp)			1.8	1.8	0	0	0						
H ₂ O	-0.1	-1.9	0.4	0.3	0.7	0	-0.6	-0.2	-0.3	-0.2	-0.5		
O ₂	-1.7	-1.7			0.3	0	-0.2	-1.9	-1.9				
NH ₃	0	-1.3			0	0	0	-0.9	-0.9				
ethanol	-0.4	-0.4			0.7	0	-0.4						
buthanol	-2.1	-2.1			0	0	0						
trimethoprim	1.4	1.4			0.2	0	-0.3						
CO ₂	-0.7	-0.7			0	0	0	-2.6	1.4				
Xe	-0.7	-0.7			0	0	0	0	0				

Obr. 18 Srovnání maximálních a minimálních hodnot strukturálních parametrů jednosložkových membrán a permeabilit (logP) vzhledem k POPC. Zelená barva značí u parametrů příznivost hodnot vzhledem k permeabilitě a směrem k červené se snižuje. V případě permeabilit značí zelená barva vyšší míry permeability a směrem k červené se snižují.

Řešením by tak bylo provést vlastní simulace, či experimenty u širokého setu molekul na membránách o různém složení, což by ale bylo kvůli rozsáhlosti takového projektu velmi výpočetně náročné.

5 Závěr

V této práci byly za vyžití metody molekulových simulací studovány strukturní a dynamické vlastnosti membrán v závislosti na jejich složení a poté byly za pomoci dat o permeabilitách z databáze MolMeDB, vyhodnocovány souvislosti mezi parametry a propustností membrán. Nejprve byly simulovány modelové systémy pro čisté a smíšené membrány, pro které byly analyzovány strukturní parametry.

Vyšší podíl nenasycených řetězců vedl poměrně výrazně k větším plochám lipidu, nižší míře uspořádanosti a vyšší míře laterální difuze. Systémy s nižším podílem nenasycených řetězců vykazovaly opačné chování. Membrány s vysokým obsahem dvojných vazeb také vykazovaly menší membránovou tloušťku než ty s nízkým, ale velké odchylky při měření neumožnily pozorovat jednoznačný trend při postupné změně směsných poměrů, nicméně již při nejmenším 10% přídavku dalšího typu lipidu došlo k zvětšení tloušťky směsné membrány. Tento trend je zřejmě způsoben nesouladem v geometriích acylových řetězců.

Pro ethanolaminové, serinové a glycerolové hlavičky byly zjištěny tendence k menší ploše lipidu, vyšší míře uspořádání a významně nižší míře laterální difuze s jejich zvyšujícím se poměrem vůči hlavičkám cholinovým. Tyto jevy jsou zřejmě způsobeny silnějšími ne vazebnými interakcemi mezi hlavičkami. Zmenšení plochy lipidu a zvýšení míry uspořádání byly obzvláště výrazné pro POPE. U ostatních byly tyto trendy umenšeny nejspíše vzájemnou repulzí, kvůli shodnému náboji. Kvůli výrazným odchylkám nelze určit vliv různých hlaviček na tloušťku membrány.

Pro korelaci parametrů a prostupnosti membrán byla vypracována pracovní hypotéza pracující s předpoklady že větší tloušťka a vyšší míra uspořádání prostupnosti snižuje a větší plocha lipidu a míra laterální difuze prostupnost naopak zvyšuje. Analýza koeficientů permeabilit získaných z databáze MolMeDB však tuto hypotézu neprokázala. Nemusí to však znamenat nesprávnost hypotézy. Použité koeficienty byly měřeny a vypočítány různými metodami a jak se ukázalo, některé výsledky pro stejnou kombinaci permeantu a membrány se mohou výrazně lišit. To zřejmě vedlo ke zkreslení výsledků.

Řešením by bylo určit permeability pro velké množství kombinací membrán o různém složení a permeantů stejnou metodikou, což by však byl velice náročný projekt dalece přesahující rozsah této bakalářské práce.

6 Literatura

- Abraham M.J., Murtola T., Schulz R., Páll S., Smith J.C., Hess B., Lindahl E. (2015): GROMACS: High performance molecular simulations through multi-levelparallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX* **1-2**, 19 – 25.
- Abu-Baker S., Qi X., Lorigan G.A. (2007): Investigating the Interaction of Saposin C with POPS and POPC Phospholipids: A Solid-State NMR Spectroscopic Study. *Biophysical Journal* **93**:10, 3480 – 3490.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Morgan D., Raff M., Robers K., Walter P., Wilson J., Hunt T. (2015): *Molecular Biology of the Cell*. Sixth edition, Garland Science, New York, USA, 1463 stran.
- Alger J.R., Prestegard J.H. (1979): Nuclear Magnetic Resonance Study of Acetic Acid Permeation of Large Unilamellar Vesicle Membranes. *Biophysical Journal* **28**, 1 – 13.
- Balouch M, Srejber M., Soltys M., Janska P., Stepanek F., Berka K. (2020): In-silico screening of drug candidates for thermoresponsive liposome formulations. *bioRxiv*, <https://doi.org/10.1101/2020.05.11.087742>.
- Blanco A., Blanco G. (2017): *Medical Biochemistry*. Academic Press, 826 stran
- Campbell N.A., Reece J.B. (2006): *Biologie*. Vydání první, Computer Press, Brno, Česká republika, 1332 stran.
- Cannataro M., Guzzi P.H., Tradigo G., Veltri P. (2014): Biological Databases. In: *Springer Handbook of Bio-/Neuroinformatics* (Kasabov N.), Springer, Berlin, Heidelberg, 431 – 440.
- Carpenter T.S., Kirshner D.A., Lau E.Y., Wong S.E., Nilmeier J.P., Lightstone F.C. (2014): A Method to Predict Blood-Brain Barrier Permeability of Drug-Like Compounds Using Molecular Dynamics Simulations. *Biophysical Journal* **107**:3, 630 – 641.
- Comer J., Schulten K., Chipot C. (2014a): Calculation of Lipid-Bilayer Permeabilities Using an Average Force. *Journal of Chemical Theory and Computation* **10**:2, 544 – 564.
- Comer J., Schulten K., Chipot C. (2014b): Diffusive Models of Membrane Permeation with Explicit Orientational Freedom. *Journal of Chemical Theory and Computation* **10**:7, 2710 – 2718.
- Comer J., Schulten K., Chipot C. (2017): Permeability of a Fluid Lipid Bilayer to Short-Chain Alcohols from First Principles. *Journal of Chemical Theory and Computation* **13**:6, 2523 – 2532.
- Dai J., Alwarawrah M., Huang J. (2010): Instability of Cholesterol Clusters in Lipid Bilayers and The Cholesterol's Umbrella Effect. *The Journal of Physical Chemistry B* **114**:2, 840 – 848
- Daleke D.L. (2003): Regulation of transbilayer plasma membrane phospholipid asymmetry. *The Journal of Lipid Research* **44**, 233 – 242.
- Danielli J.F., Davson H. (1935): A contribution to the theory of permeability of thin films. *Journal of Cellular and Comparative Physiology* **5**:4, 495 – 508.
- Di Meo F., Fabre G., Berka K., Ossman T., Chantemargue B., Paloncýová M., Parquet P., Otyepka M., Trouillas P. (2016): In silico pharmacology: Drug membrane partitioning and crossing. *Pharmacological Research* **111**, 471 – 486.
- Diamond J.M., Katz Y. (1974): Interpretation of nonelectrolyte partition coefficients between dimyristoyl lecithin and water. *The Journal of Membrane biology* **17**, 121 – 154.

- Doniza K., Ong H.L., Villagracia A.R., Ubando A., David M., Arboleda Jr. N., Culaba A. Kasai H. (2015): A Molecular Dynamics Study on the Permeability of Oxygen, Carbon Dioxide and Xenon on dioleoyl-phosphatidylcholine (DOPC) and 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (POPE) Double Lipid Bilayer. *Proceedings of the DLSU Research Congress Vol. 3 2015*. De La Salle University, Manila, Philippines.
- Dotson R.J., Pias S.C. (2018): Reduced Oxygen Permeability upon Protein Incorporation Within Phospholipid Bilayers. In: *Oxygen Transport to Tissue XL*. (Thews O., LaManna J.C., Harrison D.K., eds), Springer, Cham, 405 – 411.
- Elmore D.E. (2005): Molecular dynamics simulation of a phosphatidylglycerol membrane. *FEBS letters* **580**:1, 144 – 148.
- Ercan N.I., Stroeve P., Tringe J.W., Faller R. (2016): Understanding the Interaction of Pluronics L61 and L64 with a DOPC Lipid Bilayer: An Atomistic Molecular Dynamics Study. *Langmuir* **32**:39, 10026 – 10033.
- Ferreira T.M., Coreta-Gomes F., Ollila O.H.S., Moreno M.J., Vaz W.L.C., Topgaard D. (2013): Cholesterol and POPC segmental order parameters in lipid membranes: solid state ^1H - ^{13}C NMR and MD simulation studies. *Physical Chemistry Chemical Physics* **15**, 1976 – 1989.
- Filippov A., Orädd G., Lindblom G. (2003): Influence of Cholesterol and Water Content on Phospholipid Lateral Diffusion in Bilayers. *Langmuir* **19**:16, 6397 – 6400.
- Ghaemi Z., Minozzi M., Carloni P., Laio A. (2012): A Novel Approach to the Investigation of Passive Molecular Permeation through Lipid Bilayers from Atomistic Simulations. *The Journal of Physical Chemistry B* **116**:29, 8714 – 8721.
- Ghysels A., Venable R.M., Pastor R.W., Hummer G. (2017): Position-Dependent Diffusion Tensors in Anisotropic Media from Simulation: Oxygen Transport in and through Membranes. *Journal of Chemical Theory and Computation* **13**:6, 2962 – 2976.
- Gorter E., Grendel F. (1925): On bimolecular layers of lipoids on the chromocytes of the blood. *Journal of Experimental Medicine* **41**:4, 439 – 443.
- Hénin J., Shinoda W., Klein M.L. (2008): United-Atom Acyl Chains for CHARMM Phospholipids. *The Journal of Physical Chemistry B* **112**:23, 7008 – 7015.
- Hill W.G., Rivers R.L., Zeidel M.L. (1999): Role of Leaflet Asymmetry in the Permeability of Model Biological Membranes to Protons, Solutes, and Gases. *Journal of General Physiology* **114**:3, 405 – 414.
- Hub J.S., Winkler F.K., Merrick M., Groot B.L. (2010): Potentials of Mean Force and Permeabilities for Carbon Dioxide, Ammonia, and Water Flux across a Rhesus Protein Channel and Lipid Membranes. *Journal of the American Chemical Society* **132**:38, 13251 – 13263.
- Huster D., Jin A.J., Arnold K., Gawrisch K. (1997): Water permeability of polyunsaturated lipid membranes measured by ^{17}O NMR. *Biophysical Journal* **73**:2, 855 – 864.
- Janosi L., Gofe A.A. (2010): Simulating POPC and POPC/POPG Bilayers: Conserved Packing and Altered Surface Reactivity. *Journal of Chemical Theory and Computation* **6**:10, 3267 – 3273.
- Juračka J., Šrejber M., Melíková M., Bazgier V., Berka K. (2019): MolMeDB: Molecules on Membrane Database. *Database*: **2009**, baz078.
- Kargan F., Emadi S., Fazli H. (2017): The molecular behavior of a single β -amyloid inside a dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer at three different temperatures: An atomistic

- simulation study: A β interaction with DPPC: Atomistic simulation. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **85**:7, 1298 – 1310.
- Klamt A., Huniar U., Spycher S., Keldenich J. (2008): COSMOmic: A Mechanistic Approach to the Calculation of Membrane–Water Partition Coefficients and Internal Distributions within Membranes and Micelles. *The Journal of Physical Chemistry B* **112**:38, 12148 – 12157.
- Koenig S.H., Ahkong Q.F., Brown R.D., Lafleur M., Spiller M., Unger E., Tilcock C. (1992): Permeability of liposomal membranes to water: Results from the magnetic field dependence of T₁ of solvent protons in suspensions of vesicles with entrapped paramagnetic ions. *Magnetic Resonance in Medicine* **23**:2, 275 – 286.
- Kornberg R.D., McConnell H.M. (1971a): Lateral Diffusion of Phospholipids in a Vesicle Membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **68**:10, 2564 – 2568.
- Kornberg R.D., McConnell H.M. (1971b): Inside-outside transitions of phospholipids in vesicle membranes. *Biochemistry* **10**:7, 1111 – 1120.
- Kruczek J., Saunders M., Khosla M., Tu Y., Pandit S.A. (2017): Molecular dynamics simulations of ether- and ester-linked phospholipids. *Biochimica et Biophysica Acta* **1859**:12, 2297 – 2307.
- Kučerka N., Gallová J., Uhríková D., Balgavý P., Bulacu M., Marrink S., Katsaras J. (2009): Areas of Monounsaturated Diacylphosphatidylcholines. *Biophysical Journal* **97**, 1926 – 1932.
- Kučerka N., Holland W.B., Gray C.G., Tomberli B., Katsaras J. (2012): Scattering Density Profile Model of POPG Bilayers As Determined by Molecular Dynamics Simulations and Small-Angle Neutron and X-ray Scattering Experiments. *The Journal of Physical Chemistry B* **116**:1, 232 – 239.
- Kučerka N., Nagle J.F., Sachs J.N., Feller S.E., Pencer J., Jackson A., Katsaras J. (2008): Lipid Bilayer Structure Determined by the Simultaneous Analysis of Neutron and X-Ray Scattering Data. *Biophysical Journal* **95**, 2356 – 2367.
- Kučerka N., Tristram-Nagle S., Nagle J.F. (2006a): Closer Look at Structure of Fully Hydrated Fluid Phase DPPC Bilayers. *Biophysical Journal* **90**:11, L83 – L86.
- Kučerka N., Tristram-Nagle S., Nagle J.F. (2006b): Structure of Fully Hydrated Fluid Phase Lipid Bilayers with Monounsaturated Chains. *The Journal of Membrane Biology* **208**, 193 – 202.
- Kučerka N., van Oosten B., Pan J., Heberle F.A., Harroun T.A., Katsaras J. (2015): Molecular Structures of Fluid Phosphatidylethanolamine Bilayers Obtained from Simulation-to-Experiment Comparisons and Experimental Scattering Density Profiles. *The Journal of Physical Chemistry B* **119**:5, 1947 – 1956.
- Lafleur M., Bloom M., Cullis P.R. (1990a): Lipid polymorphism and hydrocarbon order. *Biochemistry and Cell Biology* **68**:1, 1 – 8.
- Lafleur M., Cullis P.R., Bloom M. (1990b): Modulation of the orientational order profile of the lipid acyl chain in the L _{α} phase. *European Biophysics Journal* **19**, 55 – 62.
- Lafleur M., Fine B., Sternin E., Cullis P.R., Bloom M. (1989): Smoothed orientational order profile of lipid bilayers by 2H-nuclear magnetic resonance. *Biophysical Journal* **56**:5, 1037 – 1041.
- Lande M.B., Donovan J.M., Zeidel M.L. (1995): The relationship between membrane fluidity and permeabilities to water, solutes, ammonia, and protons. *Journal of General Physiology* **106**:1, 67 – 84.
- Landha S., Mackie A.R., Harvey L.J., Clark D.C., Lea E.J., Brullemans M., Duclouhier H. (1996): Lateral diffusion in planar lipid bilayers: a fluorescence recovery after

- photobleaching investigation of its modulation by lipid composition, cholesterol, or alamethicin content and divalent cations. *Biophysical Journal* **71**:3, 1364 – 1373.
- Leftin A., Molugu T.R., Job C., Beyer K., Brown M.F. (2014): Area Per Lipid and Cholesterol Interactions in Membranes From Separated Local-Field (13)C NMR Spectroscopy. *Biophysical Journal* **107**:10, 2274 – 2286.
- Lewars E.G. (2016): *Computational Chemistry: Introduction to the Theory and Applications of Molecular and Quantum Mechanics*. 2nd ed, Springer, Cham, Germany, 584 stran.
- Liu Y., Nagle J.F. (2004): Diffuse scattering provides material parameters and electron density profiles of biomembranes. *Physical Review E* **69**:4, <https://journals.aps.org/pre/abstract/10.1103/PhysRevE.69.040901>.
- Loura L.M.S., do Canto A.M.T.M., Martins J. (2013): Sensing hydration and behavior of pyrene in POPC and POPC/cholesterol bilayers: A molecular dynamics study. *Biochimica et Biophysica Acta* **1828**:3, 1094 – 1101.
- Marrink S.J., Berendsen H.J.C. (1994): Simulation of Water Transport through a Lipid Membrane. *The Journal of Physical Chemistry* **98**:15, 4155 – 4168.
- Marrink S.J., Risselada H.J., Yefimov S., Tieleman D.P., de Vries A.H. (2007): The MARTINI Force Field: Coarse Grained Model for Biomolecular Simulations. *The Journal of Physical Chemistry B* **111**:27, 7812 – 7824.
- Martini: Coarse Grain Force Field for Biomolecules: <http://cgmartini.nl/> (8. 5. 2020)
- MolMeDB <https://molmedb.upol.cz/> (15. 5. 2020)
- Nagle J.F., Zhang R., Tristram-Nagle S., Sun W., Petrache H.I., Suter R.M. (1996): X-Ray Structure Determination of Fully Hydrated L_α Phase Dipalmitoylphosphatidylcholine Bilayers. *Biophysical Journal* **70**:3, 1419 – 1431.
- Nagle J.F. (2012): Introductory Lecture: Basic quantities in model biomembranes. *Faraday Discussions* **161**, 11 – 29.
- Nagle J.F., Tristram-Nagle S. (2000a): Structure of lipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta* **1469**:3, 159 – 195.
- Nagle J.F., Tristram-Nagle S. (2000b): Lipid Bilayer Structure. *Current Opinion in Structural Biology* **10**:4, 474 – 480.
- Naqvi K.R., Behr J., Chapman D. (1974): Methods for probing lateral diffusion of membrane components: triplet—triplet annihilation and triplet—triplet energy transfer. *Chemical Physics Letters* **26**:3, 440 – 444.
- Olbrich K., Rawicz W., Needham D., Evans E. (2000): Water Permeability and Mechanical Strength of Polyunsaturated Lipid Bilayers. *Biophysical Journal* **79**:1, 321 – 327.
- Orsi M., Michael J., Essex J.W. (2010): Coarse-grain modelling of DMPC and DOPC lipid bilayers. *Journal of Physics: Condensed Matter* **22**, 155106.
- Overton C.E. (1895): Über die osmotischen Eigenschaften der lebenden Pflanzen-und Tierzelle. *Vierteljahrsschrift der Naturforschenden Gesellschaft in Zürich* **40**, 159 – 201.
- Palakoistas M., Ding W., Shahane G., Orsi M. (2018): Effects of lipid composition on membrane permeation. *Soft Matter* **14**, 8496 – 8508.
- Palonc'ová M., DeVane R.H., Murch B.P., Berka K., Otyepka M. (2014): Rationalization of Reduced Permeation of Drugs through Ceramide Gel Phase Membrane. *Langmuir* **30**:46, 13942 – 13948.

- Pan J., Cheng X., Monticelli L., Heberle F.A., Kučerka N., Tieleman D.P., Katsaras J. (2014a): The molecular structure of a phosphatidylserine bilayer determined by scattering and molecular dynamics simulations **10**, 3716 – 3725.
- Pan J., Marquardt D., Heberle F.A., Kučerka N., Katsaras J. (2014b): Revisiting the bilayer structures of fluid phase phosphatidylglycerol lipids: Accounting for exchangeable hydrogens. *Biochimica et Biophysica Acta* **1838**:11, 2966 – 2969.
- Pandit S.A., Chiu S., Jakobsson E., Grama A., Scott H.L. (2008): Cholesterol Packing around Lipids with Saturated and Unsaturated Chains: A Simulation Study. *Langmuir* **24**:13, 6858 – 6865.
- Pandit S.A., Jakobsson E., Scott H.L. (2004): Simulation of the Early Stages of Nano-Domain Formation in Mixed Bilayers of Sphingomyelin, Cholesterol, and Dioleoylphosphatidylcholine. *Biophysical Journal* **87**:5, 3312 – 3322.
- Peterlin P., Jaklič G., Pisanski T. (2009): Determining membrane permeability of giant phospholipid vesicles from a series of videomicroscopy images. *Measurement Science and Technology* **20**, 055801
- Piggot T.J., Allison J.R., Sessions R.B., Essex J.W. (2017): On the Calculation of Acyl Chain Parameters from Lipid Simulations. *Journal of Chemical Theory and Computation* **13**:11, 5683 – 5696.
- Pluhackova K., Kirsch S.A., Han J., Sun L., Jiang Z., Unruh T., Böckmann R.A. (2016): A Critical Comparison of Biomembrane Force Fields: Structure and Dynamics of Model MDPC, POPC and POPE Bilayers. *The Journal of Physical Chemistry B* **120**:16, 3888 – 3903.
- Poger D., Bertrand C., Mark A.E. (2016): Validating lipid force fields against experimental data: Progress, challenges and perspectives. *Biochimica et Biophysica Acta* **1858**:7, 1556 – 1565.
- Price H.D., Thompson T.E. (1969): Properties of liquid bilayer membranes separating two aqueous phases: Temperature dependence of water permeability. *Journal of Molecular Biology* **41**:3, 443 – 457.
- Pronk S., Páll S., Schulz R., Larsson P., Bjelkmar P., Apostolov R., Shirts M.R., Smith J.C., Kasson P.M., van der Spoel D., Hess B., Lindhal E. (2013): GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. *Bioinformatics* **29**:7, 845 – 854.
- Rappolt M., Hickel A., Bringezu F., Lohner K. (2003): Mechanism of the Lamellar/Inverse Hexagonal Phase Transition Examined by High Resolution X-Ray Diffraction. *Biophysical Journal* **84**:5, 3111 – 3122.
- Rawicz W., Smith B.A., McIntosh T.J., Simon S.A., E. Evans (2008): Elasticity, Strength, and Water Permeability of Bilayers that Contain Raft Microdomain-Forming Lipids. *Biophysical Journal* **94**:12, 4725 – 4736.
- Reigada R. (2013): Atomistic Study of Lipid Membranes Containing Chloroform: Looking for a Lipid-Mediated Mechanism of Anesthesia. *PLoS One* **8**:1, e52631.
- Sajadi F., Rowley C.N. (2018): Simulations of lipid bilayers using the CHARMM36 force field with the TIP3P-FB and TIP4P-FB water models. *PeerJ – the Journal of Life and Environmental Sciences* **6**, e5472.
- Salnikov E.S., Mason A.J., Bechinger B. (2009): Membrane order perturbation in the presence of antimicrobial peptides by 2H solid-state NMR spectroscopy. *Biochimie* **91**:6, 734 – 743.
- Seelig J., Waespe-Sarcevic N. (1978): Molecular order in cis and trans unsaturated phospholipid bilayers. *Biochemistry* **17**:16, 3310 – 3315.

- Singer S.J., Nicolson G.L. (1972): The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. *Science* **175**:4023, 720 – 731.
- Smith J.S., Klauda J.B., Sodt A.J. (2019): Simulation Best Practices for Lipid Membranes [Article v1.0]. *Living Journal of Computational Molecular Sciences* **1**:1, 5966.
- Sun R., Han Y., Swanson J.M.J., Tan J.S., Rose J.P., Voth G.A. (2018): Molecular transport through membranes: Accurate permeability coefficients from multidimensional potentials of mean force and local diffusion constants. *The Journal of Chemical Physics* **149**:7, 072310.
- Tristram-Nagle S., Petrache H.I., Nagle J.F. (1998): Structure and Interactions of Fully Hydrated Dioleoylphosphatidylcholine Bilayers. *Biophysical Journal* **75**, 917 – 925.
- van Meer G., Voelker D.R., Feigenson G.W. (2008): Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **9**, 122 – 124.
- Venable R.M., Krämer A., Pastor R.W. (2019): Molecular Dynamics Simulations of Membrane Permeability. *Chemical Reviews* **119**:9, 5954 – 5997.
- Wassenaar A.T., Ingólfsson H.I., Böckmann R.A., Tieleman D.P., Marrink S.J. (2015): Computational Lipidomics with *insane*: A Versatile Tool for Generating Custom Membranes for Molecular Simulations. *Journal of Chemical Theory and Computation* **11**:5, 2144 – 2155.
- Winter N.D., Schatz G.C. (2010): Coarse-Grained Molecular Dynamics Study of Permeability Enhancement in DPPC Bilayers by Incorporation of Lysolipid. *The Journal of Physical Chemistry B* **114**:15, 5053 – 5060.
- Xiang T.X., Anderson B.D. (1997): Permeability of Acetic Acid across Gel and Liquid-Crystalline Lipid Bilayers Conforms to Free-Surface-Area Theory. *Biophysical Journal* **72**, 223-237.
- Yoshitani T., Yamazaki M. (2008) Water permeability of lipid membranes of GUVs and its dependence on actin cytoskeletons inside the GUVs. *2008 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science*, Nagoya, 130 – 134.
- Zhao W., Róg T., Gurtovenko A.A, Vattulainen I., Karttunen M. (2007): Atomic-Scale Structure and Electrostatics of Anionic Palmitoyloleoylphosphatidylglycerol Lipid Bilayers with N⁺ Counterions. *Biophysical Journal* **92**:4, 1114 – 1124.
- Zocher F., van der Spoel D., Pohl P., Hub J.S. (2013): Local Partition Coefficients Govern Solute Permeability of Cholesterol-Containing Membranes. *Biophysical Journal* **105**:12, 2760 – 2770.

7 Seznam použitých symbolů a zkratek

- AA – atomistické „all-atom“ simulace
- A_L – plocha lipidu
- CG – „coarse grain“ hrubozrné rozlišení
- D_B – Luzzatiho tloušťka
- 2D_C – hydrofobní tloušťka
- D_{HH} – „head to head thickness“ – vzdálenost lipidických hlaviček
- D_L – laterální difuze
- DOPC – dioleoylfosfatidylcholin
- DPPC – dipalmitoylfosfatidylcholin
- LJ – Lennard-Jonesův potenciál
- MD – molekulární dynamika
- MM – molekulární mechanika
- P – permeabilita
- POPC – palmitoyloleoylfosfatidylcholin
- POPE – palmitoyloleoylfosfatidylethanolamin
- POPG – palmitoyloleoylfosfatidylglycerol
- POPS – palmitoyloleoylfosfatidylserin
- POP_x – palmitoyloleoylfosfatidyl s libovolnou hlavičkou
- S_{CD} – parametr uspořádanosti