

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Přírodovědecká fakulta

Struktura a dynamické vlastnosti porfyrinových  
agregátů v roztoku

Bakalářská práce

Jitka Vysloužilová

Vedoucí práce: RNDr. Zdeněk Futera, Ph.D.

České Budějovice 2024

Vysloužilová. J, 2024: Struktura a dynamické vlastnosti porfyrinových agregátů v roztoku.[The structure and dynamic properties of porphyrin aggregates in solution. Bc. Thesis, in Czech] Bakalářská práce - 57 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic

### **Annotation**

Motivated by interesting yet puzzling experimental data on 3,4,5-TEG-TPP porphyrin obtained by UV/VIS and NMR measurements, this bachelor thesis focuses on exploring the structure stabilities and dynamical properties of these compounds by means of computer simulations. Besides reviewing the basic molecular mechanical techniques, the accurate models of solvated molecules, their dimers, and aggregates are built, relaxed, and propagated by molecular dynamics simulations. Finally, the optical and magnetic spectra are computed on the sampled trajectories and compared to the experimental data. Overall, the thesis demonstrates the utilization of computational and experimental approaches by investigating the behavior of specific porphyrins in aqueous environments and brings insightful findings related to these systems.

### **Anotace**

Tato bakalářská práce je motivována zajímavými, avšak nejasnými experimentálními daty o 3,4,5-TEG-TPP porfyrinu získanými pomocí UV/VIS a NMR měření a zaměřuje se na zkoumání stability struktury a dynamických vlastností těchto sloučenin pomocí počítačových simulací. Kromě přehledu základních molekulárně mechanických technik jsou pomocí molekulárně dynamických simulací sestaveny, relaxovány a propagovány věrné modely solvovaných molekul, jejich dimerů a agregátů. Nakonec jsou na vzorkovaných trajektoriích vypočtena optická a magnetická spektra a porovnána s experimentálními daty. Celkově práce demonstruje využití výpočetních a experimentálních přístupů při studiu chování konkrétních porfyrinů ve vodném prostředí a přináší podnětné poznatky týkající se těchto systémů.

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracoval(a) pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

České Budějovice, 12. dubna 2024

**Jitka**  
**Vysloužilová**  
.....  
Digitálně podepsal Jitka  
Vysloužilová  
Datum: 2024.04.11  
18:46:27 +02'00'

Jitka Vysloužilová

## **Poděkování:**

Tímto bych ráda poděkovala RNDr. Zdeňku Futerovi, Ph.D. za odborné vedení, poskytnutí zázemí a ochotu pomoci v každé situaci a provedení náročnějších výpočtů nad rámec této práce. Poděkování patří také RNDr. Janu Labutovi, Ph.D. a celému jeho týmu za poskytnutí experimentálních dat a konzultaci výsledků.

Díky patří také mé rodině a přátelům za podporu při studiu a pomoc při korektuře textu. Dále pak spolužákům za podporu a pomoc při řešení chemických otázek pojících se především s problematikou názvosloví.

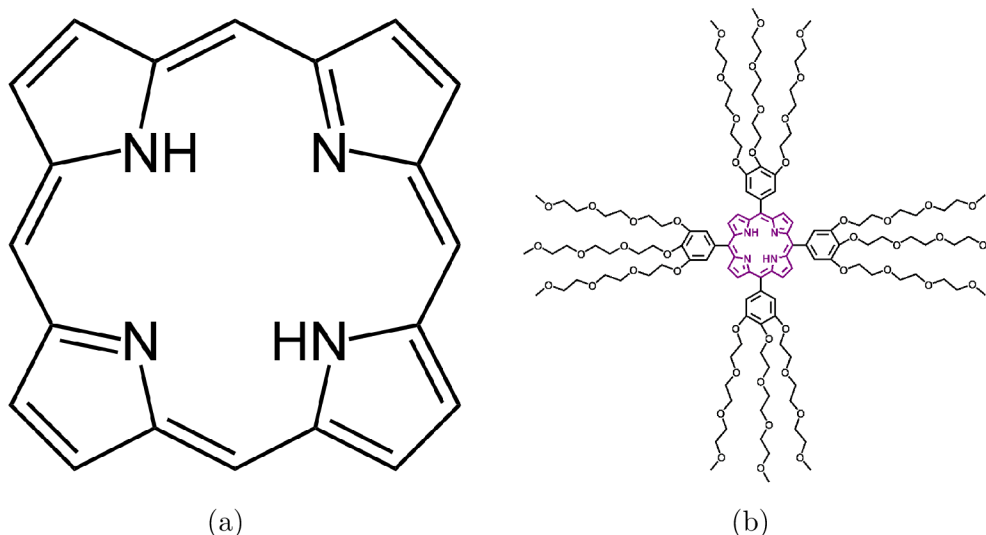
# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Počítačové modelování</b>	<b>4</b>
<b>3</b>	<b>Metodologie</b>	<b>7</b>
3.1	Molekulární mechanika . . . . .	7
3.1.1	Vazebné příspěvky . . . . .	7
3.1.2	Nevazebné příspěvky . . . . .	8
3.1.3	Parametrizace silového pole . . . . .	10
3.2	Geometrická optimalizace . . . . .	11
3.2.1	Steepest descent . . . . .	11
3.2.2	Konjugované gradienty . . . . .	12
3.3	Molekulární dynamika . . . . .	12
3.3.1	Integrační algoritmy . . . . .	13
3.4	Analýzy . . . . .	13
<b>4</b>	<b>Příprava modelu</b>	<b>14</b>
4.1	Parametrizace . . . . .	14
4.1.1	Parametrizace monomeru . . . . .	14
4.1.2	Parametrizace dimeru . . . . .	22
4.1.3	Parametrizace agregátu . . . . .	24
4.2	Příprava solvatovaných modelů . . . . .	24
4.2.1	Solvatace monomerů a dimerů . . . . .	24
4.2.2	Solvatace agregátu . . . . .	27
4.2.3	Ohřívání a stlačování systému . . . . .	28
<b>5</b>	<b>Analýzy trajektorií</b>	<b>32</b>
5.1	Monomery . . . . .	35

5.2	Dimery . . . . .	38
5.3	Agregát . . . . .	40
<b>6</b>	<b>Optická a magnetická spektra</b>	<b>42</b>
6.1	UV/VIS spektra . . . . .	42
6.2	NMR spektra . . . . .	43
<b>7</b>	<b>Porovnání s experimentem</b>	<b>46</b>
7.1	Stabilita dimerů . . . . .	46
7.2	UV/VIS spektra . . . . .	47
7.3	NMR spektra . . . . .	50
<b>8</b>	<b>Závěr</b>	<b>54</b>

# 1 Úvod

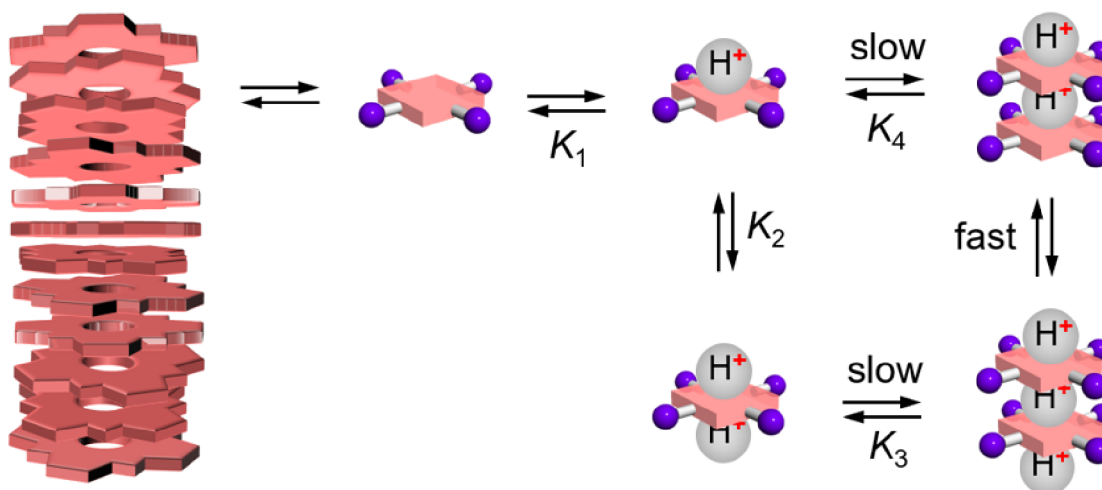
Porfyriny jsou organické sloučeniny odvozené od porfinu (obrázek 1.1a), což je tetrapyrrolový cyklus propojený methionovými můstky. Díky své schopnosti vázat kovy mají nezastupitelnou funkci v nejrůznějších biologických procesech, jako je transport kyslíku v lidském těle nebo třeba fotosyntéza.[1]



Obrázek 1.1: Strukturní vzorec (a) porfinu, (b) 3,4,5-TEG-TPP.

Tato bakalářská práce se věnuje 3,4,5-triethylglykol-tetrafenylporfyrinu (3,4,5-TEG-TPP), jehož strukturní vzorec je na obrázku 1.1b. Jedná se o uměle vytvořenou molekulu, která ve své základní formě netvoří komplex s žádným z kovů. Díky tomu je možné ji protonovat. Tento porfyrin má vlastnosti podobné porfyrinům důležitým pro metabolické procesy, jako je například hem b, chlorofyl nebo vitamín B<sub>12</sub>. Podobně jako ostatní porfyriny, i 3,4,5-TEG-TPP tvoří komplexy s kovovými ionty, čímž získá redoxní charakter. Také absorpance v oblasti viditelného světla je podobná ostatním porfyrinům.

Přítomnost glykolových řetězců přináší jednu zásadní vlastnost, a tou je rozpustnost ve vodě. Přestože je látka rozpustná, má tendenci v roztoku agregovat. Agregáty se v kyselém prostředí destabilizují a dochází k jejich rozpadu. Na základě naměřených dat z nukleární magnetické rezonance (NMR) byla našimi experimentálními spolupracovníky formulována hypotéza, která tvrdí, že v kyselém prostředí dochází k protonaci molekul na okrajích agregátů, čímž dochází k této destabilizaci. Protonovaný agregát se následně rozpadá na různě nabitě monomery nebo dimery. Z monomerů pak vznikají stabilní nabitě dimery. Zvláštností je už jen fakt, že dimery jsou stabilní pouze, pokud jsou dvakrát, či třikrát protonované, tudíž mají silný kladný náboj. Hydrofobní efekty a stackové interakce by tak zde měly převažovat nad elektrostatickou repulzí.



Obrázek 1.2: Kinetický model navržený Dr. J. Labutou na základě experimentálních výsledků.

Výše popsaná hypotéza byla zformulována na základě fitování experimentálních dat na různé kinetické modely (viz obrázek 1.2). Zda opravdu dochází k tomuto ději a jaké jsou strukturní změny takových systémů, není známo. Experimentálně není možné pozorovat celý proces, protože rychlé změny jsou těžko detekovatelné, a proto je zapotřebí využít metod počítačových simulací.



Předmětem této práce je vytvoření počítačových modelů těchto struktur, provedení molekulárně dynamických výpočtů a stanovení základních strukturních a dynamických vlastností agregátů. Dále výpočet NMR spekter na vygenerovaných strukturách a jejich korelace s experimenty. V rámci práce bude také provedena rešerše základních metod simulací malých organických molekul. Osvojení si těchto molekulárně mechanických metod je také jedním z cílů této práce.

## 2 Počítačové modelování

Pro studium struktury, chování a interakcí molekul na atomární úrovni jsou počítačové simulace klíčovým nástrojem. Široký význam mají v různých odvětvích výzkumu od chemie, farmakologie, biologie až po studium materiálů. [2] Simulace umožňují detailně zkoumat strukturu molekul na atomární úrovni, predikovat chování molekul v různých podmínkách, nebo studovat chování biomolekul v tkáních. Všechny tyto aspekty je možné zkoumat. Rovněž můžeme testovat různé scénáře bez fyzického vytváření každého vzorku, které je časově i finančně náročné.

Pro provádění molekulárních simulací existuje celá řada metod. Podle přesnosti a složitosti popisu lze výpočetní metody rozdělit do následujících skupin.

### ***Ab initio* modelování**

Modelování *ab initio* je založeno na kvantově mechanickém popisu chování jader a elektronů jednotlivých atomů v molekule. K popisu chování molekul se používá kvantová pohybová rovnice tzv. Schrödingerova rovnice. Jejím řešením získáme energii a vlnovou funkci dané molekuly. Ze znalosti vlnové funkce můžeme dále v principu získat strukturu a jakékoliv další vlastnosti studovaného systému[3].

Tento přístup popisuje chemické systémy s vysokou přesností. Cenou za přesnost je ale časová a výpočetní náročnost výpočtů. Kvůli náročnosti je *ab initio* modelování použitelné pouze na malé systémy ( $\sim 100$  atomů). Narozdíl od klasického popisu umožňují *ab initio* simulace studium chemických dějů, elektronových přenosů, optických a magnetických vlastností látek, a dalších vlastností, které vyžadují kvantový popis.

## Teorie funkcionálu hustoty - DFT

Alternativní přístup k řešení Schrödingerovy rovnice představuje tzv. teorie hustotních funkcionálů (Density Functional Theory, DFT), která hledá její řešení v podobě elektronové hustoty místo úplné vlnové funkce. Výhodou je menší počet proměnných (hustota závisí pouze na prostorových souřadnicích, vlnová funkce je závislá na polohách a hybnostech všech elektronů).

Lze však ukázat, že tato hustota jednoznačně určuje vlastnosti základního stavu molekuly. Redukce proměnných tak umožňuje kvantový popis mnohem větších systémů než v případě *ab initio* výpočtů. Proto je tento přístup v současné době nejpopulárnější metodou k získávání elektronových vlastností molekul a pevných látek. V literatuře se běžně označuje DFT a jeho modifikace jako *first principles* metoda. [4]

## Semiempirické modelování

Stejně jako u přístupu *ab initio* vychází i tato metoda z výpočtu Schrödingerovy rovnice dané molekuly. V tomto případě jsou ovšem některé složité integrály potřebné k vyčíslení Hamiltoniánu aproximovány hodnotami získanými z korelace s experimentálními daty. Zahrnutím těchto parametrů se výpočty stávají semiempirickými.

Díky zjednodušení jsou semiempirické výpočty  $100\times - 1000\times$  rychlejší než metoda *ab initio* [2]. Metody tohoto typu umožňují výpočet pro větší systémy ( $\sim 1000$  atomů). Tyto metody jsou ale aplikovatelné pouze na systémy, na kterých byla získána experimentální data využívaná k popisu Hamiltoniánu.

## Molekulární mechanika

V molekulární mechanice jsou atomy popsány jako klasické nabitě částice. Vazby mezi atomy jsou zpravidla popsány pomocí harmonických potenciálů, tedy pružin o dané tuhosti. Známe-li náboje na jednotlivých atomech, délky a tuhosti vazeb mezi nimi a úhly, jsme schopni určit potenciální energii na jednotlivých atomech.

Tento popis je značně zjednodušený, neumožňuje studovat chemické děje, ani jiné elektronové vlastnosti. Omezuje se tak na strukturně dynamické parametry. Na druhou stranu jednoduchost klasického přístupu umožňuje simulace velkých systémů zahrnujících až miliony atomů, jako jsou například molekuly v solventech, nebo biomolekulární systémy.

Pro účely této práce byl použit především molekulárně mechanický přístup.

# 3 Metodologie

## 3.1 Molekulární mechanika

Jak již bylo zmíněno v kapitole 2, molekulární mechanika (MM) je klasický a výpočetní přístup určený ke studiu struktur, chování a interakcí molekul na atomární úrovni. Tato metoda je založena na mechanickém popisu molekul jako souboru nabitých koulí (atomů) spojených pružinami (vazbami). [5] Jedná se o harmonickou aproximaci, známou též jako pružinový model.

Systém je v MM charakterizován pomocí potenciální energie, která je součtem párových interakcí. Ty lze rozdělit na vazebné a nevazebné.[6]. Celková potenciální energie se tak skládá z vazebných a nevazebných příspěvků a lze ji matematicky vyjádřit pomocí rovnice

$$E = E_b + E_a + E_t + E_n, \quad (3.1)$$

kde  $E_b$  je energie napínání vazby,  $E_a$  je energie ohýbání úhlu mezi dvěma sousedními vazbami,  $E_t$  je energie torzních úhlů a  $E_n$  je energie nevazebných interakcí (viz obrázek 3.1).

### 3.1.1 Vazebné příspěvky

Jedním ze členů přispívajících k celkové potenciální energii systému je energie napínání vazby, kterou lze v prvním přiblížení popsat harmonickým potenciálem

$$E_b = \frac{1}{2}k_r(r - r_0)^2, \quad (3.2)$$

kde  $k_r$  je tuhost pružiny představující vazbu a  $r_0$  je její vazebná délka.

Jedná se o druhý řád Taylorova rozvoje

$$E(r) \sim E_0 + \frac{dE}{dr}(r - r_0) + \frac{1}{2} \frac{d^2E}{dr^2}(r - r_0)^2 + \dots \quad (3.3)$$

což je první nenulový příspěvek, uvědomíme-li si, že první derivace je v minimu nulová a  $E_0$  je pouze posun minimální hodnoty od nuly. Tuhost  $k_r = \frac{d^2E}{dr^2}$  má tak přímou souvislost s tvarem potenciálu v okolí minima.

Dalším vazebným příspěvkem k potenciální energii je člen popisující ohýbání úhlu mezi vazbami jednotlivých atomů. Tento příspěvek je opět charakterizován harmonickým potenciálem. Příspěvek od ohýbání úhlu je tedy definován jako

$$E_a = \frac{1}{2} k_\alpha (\alpha - \alpha_0)^2, \quad (3.4)$$

kde  $k_\alpha$  představuje silovou konstantu pružnosti a  $\alpha_0$  je optimální úhel vazby.

Posledním vazebným příspěvkem k potenciální energii jsou torzní úhly kolem vazeb. V tomto případě se již nejedná o harmonickou, nýbrž periodickou funkci. Energie torzních úhlů se zpravidla popisuje vztahem

$$E_t = \frac{1}{2} k_\vartheta [1 + \cos(n\vartheta - \vartheta_0)], \quad (3.5)$$

kde  $k_\vartheta$  je výška potenciálu,  $n$  je periodičita a  $\vartheta_0$  je fázový posun. Na rozdíl od napínání vazeb je v tomto případě k aproximaci použit rozvoj do Fourierovy řady.

### 3.1.2 Nevazebné příspěvky

Každé dvě nabitě částice nacházející se v konečné vzdálenosti na sebe elektrostaticky působí nezávisle na tom, zda se nacházejí ve stejné molekule či dvou různých.

Základní typ elektrostatického působení je popsán Coulombovým zákonem. Coulombický příspěvek pro pár atomů lze popsat vztahem

$$E_{Coulomb} = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \sum_{i < j} \frac{q_i q_j}{R_{ij}}, \quad (3.6)$$

kde  $\epsilon_0$  je permitivita vakua  $q_i$  a  $q_j$  jsou náboje jednotlivých atomů a  $R_{ij}$  je vzdálenost mezi atomy.

Dalším typem nevazebných interakcí jsou tzv. van der Waalsovy síly. Jedná se o několik různých typů interakcí, jako je dipól-dipól, dipól-indukovaný dipól a Londonovy síly. Termín je používán pro celek nespécifických atraktivních a odpudivých sil [7]

Celkový přírůstek atraktivních interakcí k potenciálu systému je součtem potenciálu od interakcí dipól-dipól, dipól-indukovaný dipól a Londonových sil. Pro všechny tyto tři interakce klesá potenciál se šestou mocninou vzdálenosti. [8] To můžeme zapsat jako

$$E = -\frac{\sigma}{r^6}, \quad (3.7)$$

kde  $\sigma$  je konstanta popisující konkrétní systém.

Oproti tomu příspěvek k celkové energii od elektronové repulze lze aproximovat vztahem

$$E = \frac{C_n}{r^n}. \quad (3.8)$$

Na základě empirických poznatků se pro modelování v MM používá vztah 3.8 pro  $n = 12$ .

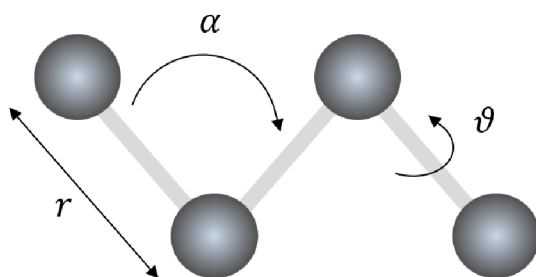
Součet potenciálu atraktivních a repulzních interakcí se nazývá Lennard-Jonesův potenciál a je dán vztahem

$$E_{vdW} = 4\epsilon \left[ \left( \frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma}{r} \right)^6 \right], \quad (3.9)$$

kde  $\epsilon$  je hodnota minima potenciální energie a  $\sigma$  je vzdálenost, ve které má potenciální energie minimum.

Celková energetická rovnice charakterizující systém v MM vznikne dosazením vztahů 3.2, 3.4, 3.5, 3.6 a 3.9 do rovnice 3.1.

$$E = \frac{1}{2} \sum_{vazby} k_r (r - r_0)^2 + \frac{1}{2} \sum_{uhly} k_\alpha (\alpha - \alpha_0)^2 + \frac{1}{2} \sum_{torze} k_\vartheta [1 + \cos(n\vartheta - \vartheta_0)] + \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \sum_{i < j} \frac{q_i q_j}{R_{ij}} + \sum_{i < j} 4\epsilon_{ij} \left[ \left( \frac{\sigma_{ij}}{R_{ij}} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma_{ij}}{R_{ij}} \right)^6 \right]. \quad (3.10)$$



Obrázek 3.1: Grafické znázornění vazebných parametrů: vazebná vzdálenost  $r$ , vazebné úhly  $\alpha$ , torzní úhly  $\vartheta$ .

Někdy se k potenciálové funkci 3.10 přidávají další příspěvky, například pro popis vodíkových můstků či torzních korekcí na kostře proteinových struktur. Ty jsou však specifické pro konkrétní systémy a v této práci nejsou upotřebeny. V celkové rovnici pro potenciální energii vystupuje mnoho parametrů. Soubor těchto parametrů se nazývá silové pole neboli *force field*. Pro simulaci systému je důležité určit vhodné parametry, aby potenciálová funkce co nejvěrněji reprezentovala studovaný systém.

### 3.1.3 Parametrizace silového pole

Parametrizace je proces, při kterém pro daný systém definujeme parametry nutné k co nejpřesnějšímu výpočtu potenciálového pole podle rovnice 3.10. Parametry získáváme fitováním potenciálové funkce za pomoci struktury (popř. jiných vlastností) na experimentální nebo *ab initio* / DFT data. V této práci je použit druhý z těchto přístupů.

Pro tvorbu silového pole pro molekulární systémy v Amberu se využívají parametry z předem definovaného obecného silového pole Amberu (General Amber Force Field) známého jako GAFF2. Jeho parametry obsahují informace, které se snaží pokrýt širokou škálu chemických struktur. Vždy je však nutné ověřit jejich aplikovatelnost na konkrétním systému a popřípadě je zpřesnit.



Pro určení náboje na jednotlivých atomech v molekulární struktuře používá Amber metodu známou pod zkratkou RESP (Restrained Electrostatic Potential). Jedná se o metodu, která na základě známého elektrostatického potenciálu v okolí molekuly, který je nutné spočítat pomocí kvantových metod, rozděluje elektrický náboj na jednotlivé atomy tak, aby tento potenciál dobře reprezentovaly. [9]

Kombinací silového pole GAFF2 a metody RESP lze v principu sestavit silové pole pro velkou škálu organických molekul a molekulárních systémů.

## 3.2 Geometrická optimalizace

Je-li určeno silové pole, lze provést optimalizaci systému. Jedná se o proces hledání prostorového uspořádání atomů s nejnižší potenciální energií. Nejčastěji používanými metodami k optimalizaci velkých systémů jsou steepest descent a metoda konjugovaných gradientů. Ty jsou založeny pouze na gradientu. Na rozdíl od přesnějších, ale výpočetně náročnějších metod nepoužívají druhé derivace energie.

### 3.2.1 Steepest descent

Pro určení stabilní konformace systému je nejprve spočítán gradient energie prvotního modelu. Aby došlo ke snížení energie systému, v dalším kroku se atomy posunou proti směru gradientu, tedy ve směru působících sil. Tento postup se opakuje, dokud není dosaženo předem stanoveného kritéria. Tímto kritériem může být pokles hodnoty gradientu pod stanovenou hranici, nebo předem stanovený počet iterací. Struktura v n-tém kroku optimalizace je tedy

$$\vec{r}_{n+1} = \vec{r}_n - \alpha_n \nabla E(\vec{r}_n) \quad (3.11)$$

kde  $\vec{r}$  značí souřadnice všech atomů a  $\alpha$  je škálovací koeficient. Tato metoda je však velmi neefektivní v blízkosti minima, kde je gradient  $\nabla E$  velmi malý.

### 3.2.2 Konjugované gradienty

Metoda konjugovaných gradientů funguje na podobném principu jako steepest descent. Pro určení energeticky výhodnější struktury opět používá gradient energie. Pro výpočet nových poloh atomů je však využito také gradientu z předchozí iterace, což vede k rychlejší konvergenci a nalezení výsledné struktury. Struktura v  $n$ -tém kroku optimalizace je tedy

$$\vec{r}_{n+1} = \vec{r}_n - \alpha_n \left[ \nabla E(\vec{r}_n) - \beta_n \vec{d}_{n-1} \right] \quad (3.12)$$

kde  $\alpha$  a  $\beta$  jsou škálovací koeficienty a  $\vec{d}_{n-1}$  je posun v předchozím kroku.

### 3.3 Molekulární dynamika

Molekulární dynamika je výpočetní metoda vycházející z molekulární mechaniky. Řídí se zákony klasické mechaniky a k výpočtům chování molekul využívá potenciálové funkce 3.10.

Za předpokladu, že potenciální energie  $E$  je v celém systému spojitá a diferencovatelná v každém bodě, což funkce 3.10 je, je síla působící na částici určena vztahem

$$\vec{F} = -\nabla E. \quad (3.13)$$

V klasické mechanice je poloha částice v určitém čase spojena s působící silou druhým Newtonovým zákonem

$$\vec{F} = m\ddot{\vec{r}} \quad (3.14)$$

kde  $\ddot{\vec{r}}$  značí  $\frac{d^2\vec{r}}{dt^2}$  a  $m$  je hmotnost částice.

Pro integraci pohybových rovnic je nutné zadat počáteční podmínky. Vstupními podmínkami pro řešení jsou obvykle znalosti poloh a rychlostí všech částic. Řešením soustavy pohybových rovnic je funkce popisující průběh poloh částic v určitém čase – tzv. *trajektorie*.

### 3.3.1 Integrační algoritmy

Výpočet trajektorie pro mnohočasticové systémy není analyticky řešitelný, proto je zapotřebí využít numerických metod integrace pohybových rovnic. Verletův algoritmus numerické integrace vychází z Taylorova rozvoje funkcí poloh v čase  $(t + \Delta t)$  a  $(t - \Delta t)$ . Pokud rozvedeme tyto funkce a následně je sečteme a upravíme, získáme rovnici

$$\vec{r}(t + \Delta t) = 2\vec{r}(t) - \vec{r}(t - \Delta t) + \vec{a}(t)(\Delta t)^2. \quad (3.15)$$

Pomocí tohoto předpisu se počítají nové polohy, zatímco rychlosti zůstávají neurčeny.

Alternativní variantou výpočtu je algoritmus zvaný *Leapfrog*. Tuto metodu používá např. softwarový balík Gromacs. [10] Výpočet poloh a rychlostí probíhá podle vztahu

$$\vec{r}(t + \Delta t) = \vec{r}(t) + \vec{v}\left(t + \frac{\Delta t}{2}\right) \Delta t \quad (3.16a)$$

$$\vec{v}\left(t + \frac{\Delta t}{2}\right) = \vec{v}\left(t - \frac{\Delta t}{2}\right) + \vec{a}(t)\Delta t \quad (3.16b)$$

Další možností numerické integrace, která narozdíl od Leapfrogu nepočítá veličiny v polovičních časových krocích, je *rychlostní Verletův algoritmus*. Tento způsob výpočtu využívá například softwarový balík Amber. [11]. Matematický zápis pro algoritmus je

$$\vec{r}(t + \Delta t) = \vec{r}(t) + \vec{v}(t)\Delta t + \frac{1}{2}\vec{a}(t)(\Delta t)^2 \quad (3.17a)$$

$$\vec{v}(t + \Delta t) = \vec{v}(t) + \frac{1}{2}[\vec{a}(t + \Delta t) + \vec{a}(t)] \Delta t. \quad (3.17b)$$

## 3.4 Analýzy

Výsledkem simulací jsou trajektorie. Jedná se o soubory dat, v nichž jsou zaznamenány souřadnice jednotlivých atomů v systému v určitém čase. Popisují tedy vývoj struktury v čase. Pro interpretaci trajektorie je zapotřebí provést kvalitní analýzy ať už strukturní, nebo dynamické. Mezi strukturní analýzy řadíme například detekci geometrických parametrů, jako jsou vzdálenosti atomů, úhly mezi atomy, dihedrální úhly mezi třemi vazbami, nebo délky vazeb. Dalším nástrojem analýzy je radiální distribuční funkce nebo poloměr setrvačnosti. Z těchto údajů jsou dále odvozovány strukturní parametry systémů.

Detaily jednotlivých analýz jsou vysvětleny dále v textu, kde jsou aplikovány na studovaný systém.

# 4 Příprava modelu

Pro jakékoli molekulárně dynamické simulace je nejprve zapotřebí nalézt vhodné parametry pro výpočet energetické funkce. Pro určité druhy struktur jako například proteiny nebo nukleové kyseliny jsou tyto parametry dostupné ve veřejných databázích. To však není případ systému studovaného v této práci. Veškeré výpočty za účelem parametrizace molekuly byly provedeny v softwarovém balíku Amber. Zde vycházíme z obecného silového pole GAFF2, jak bylo popsáno v kapitole 3.1.3.

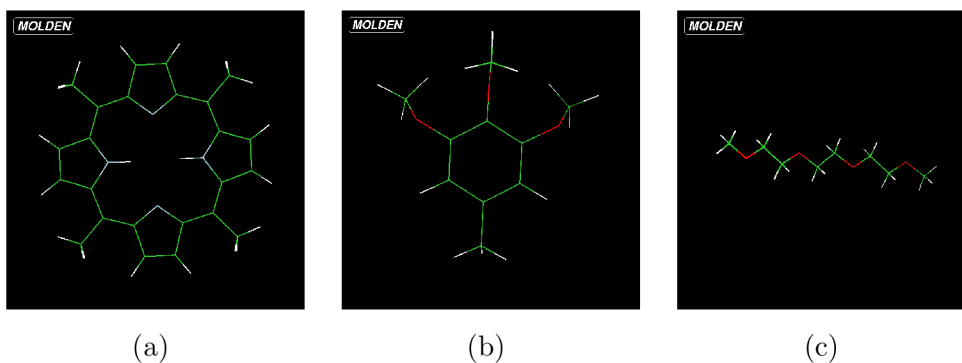
## 4.1 Parametrizace

### 4.1.1 Parametrizace monomeru

Molekula 3,4,5-TEG-TPP je poměrně velká a složitá. Její parametrizace jako celku by byla výpočetně velmi náročná. Proto byla pro účely parametrizace využita symetrie a molekula byla rozdělena na menší fragmenty.

Ze strukturního vzorce na obrázku 1.1b lze vidět, že molekula se skládá ze tří různých částí. Základem je porfinový kruh uprostřed, na které se váží benzenová jádra. Poslední částí je ethylenglykolový řetězec. Proto byla pro parametrizaci molekula rozdělena na tyto 3 části, ze kterých bude následně složena celá struktura.

Při rozdělování byly v místech vazeb k dalším částem připojeny substituenty, které vhodně napodobují chemický charakter původní vazby. Proto parametrizované molekuly byly 5,10,15,20-tetramethyl-21,23-dihydroporfyryl (struktura na obrázku 4.1a), 3,4,5-trimethoxytoluen (obrázek 4.1b) a 2,5,8,11-tetraoxadodekan (obrázek 4.1c).



Obrázek 4.1: Struktury jednotlivých parametrizovaných molekul.[13]

Molekuly: (a) 5,10,15,20-tetramethyl-21,23-dihydroporfyrin, (b) 3,4,5-trimethoxytoluen a (c) 2,5,8,11-tetraoxadodekan.

Před samotnou parametrizací byla provedena DFT optimalizace každé z molekul pomocí programu Gaussian. [14] Výstupní soubor byl překonvertován do formátu PDB. Jedná se o standardizovaný formát pro popis struktur biologických struktur, který v sobě nese informace o polohách atomů a jejich rozdělení do molekulárních fragmentů.[15] Tím byla určena struktura relaxovaných fragmentů.

Optimalizovaná molekula byla vstupem pro výpočet RESP nábojů na jednotlivých atomech. Potřebný elektrostatický potenciál byl spočten *ab initio* pomocí programu Gaussian s následujícími vstupními parametry

```
#p hf/6-31g(d) scf(tight) pop(mk) iop(6/33=2,6/41=10,6/42=17)
```

Výpis 4.1: Hlavička vstupního souboru pro Gaussian se specifikací metody výpočtu náboje.

Hartree-Fockova metoda (HF) je zde použita kvůli konzistenci se silovými poli, které využívá program Amber.

Následně byl z výstupního souboru z Gaussianu vytvořen soubor ve formátu PREP pomocí nástroje antechamber z balíku AmberTools.

Dalším krokem bylo manuální odstranění uměle připojených substituentů a přepočítání náboje na jednotlivé atomy. Z PREP souboru byly zkopírovány souřadnice, atomové typy a náboje jednotlivých atomů do tabulkového editoru. Bylo zjištěno, že na symetrických atomech nebyly napočítány stejné náboje, a proto byla nejprve provedena manuální symetrizace. Z řetězce byly vybrány skupiny atomů,

jejichž náboj by měl být stejný. Tento náboj byl určen jako průměrná hodnota napočítaných nábojů. Po symetrizaci byly odstraněny řádky popisující přidané substituenty. Dále byly náboje na zbývajícím residuu přeškálovány, aby byl celkový náboj nulový, případně 1 nebo 2 pro protonované porfyrinové cykly. V případě porfyrinových kruhů musely být manuálně opraveny topologické značky. Takto přepočítané hodnoty byly vloženy zpět do PREP souboru.

```

0      0      2

This is a remark line
molecule.res
PGB   XYZ  0
CHANGE      OMIT DU   BEG
0.0000
  1  DUMM  DU   M       999.000    999.0    -999.0    .00000
  2  DUMM  DU   M       999.000   -999.0    999.0    .00000
  3  DUMM  DU   M      -999.000    999.0    999.0    .00000
  4  C1    ca   M       3.511000    4.271000    0.589000    0.292488
  5  C2    ca   M       3.538000    3.410000   -0.510000   -0.527011
  6  H2    ha   E       2.900000    2.531000   -0.486000    0.162319
  7  C3    ca   M       4.348000    3.682000   -1.619000    0.266158
  8  C4    ca   M       5.156000    4.825000   -1.593000   -0.527011
  9  H1    ha   E       5.804000    5.071000   -2.429000    0.162319
 10  C5    ca   M       5.138000    5.693000   -0.500000    0.292488
 11  C6    ca   E       4.309000    5.426000    0.601000   -0.121749

LOOP
  C1    C6

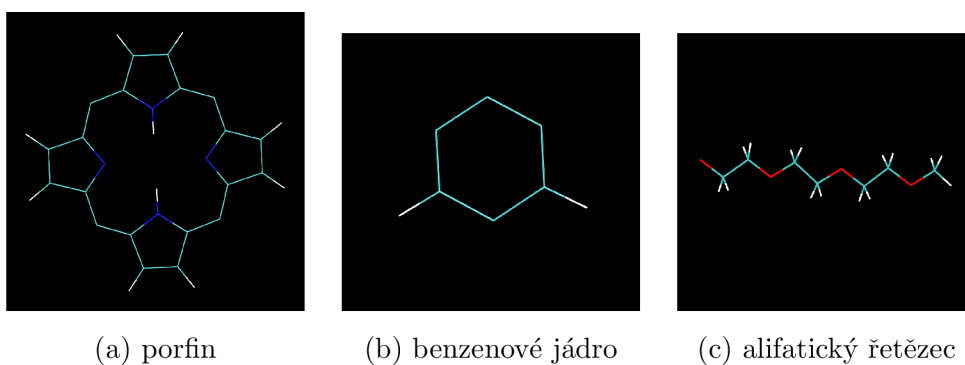
IMPROPER
  C3    C1    C2    H2
  C3    C5    C4    H1

DONE
STOP

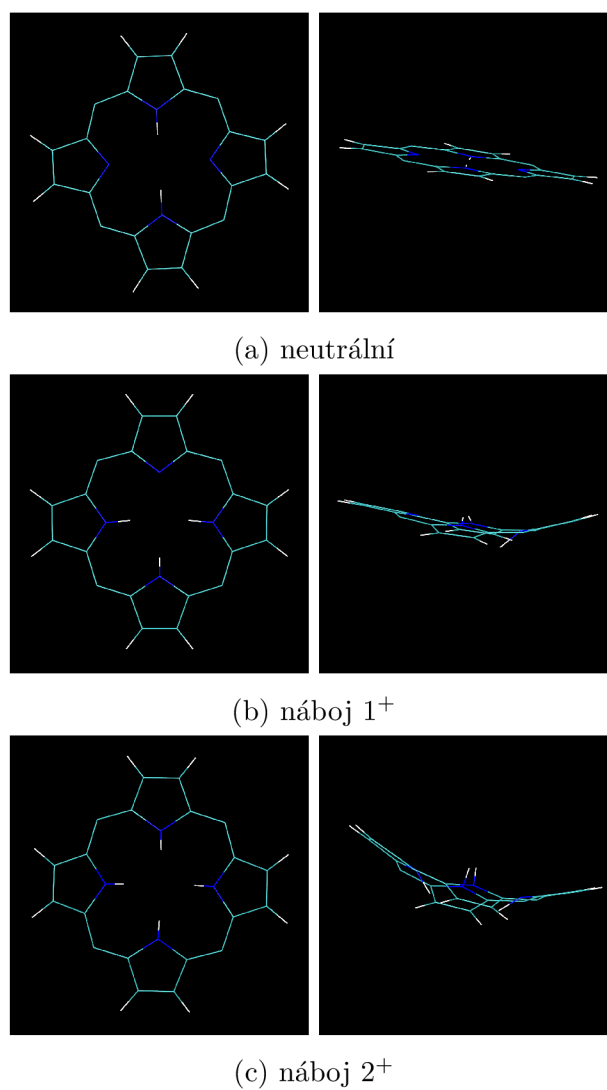
```

Výpis 4.2: Ukázka výpisu z PREP souboru. Soubor popisující trimethoxytoluen po odstranění methoxy skupin.

Dále byl z PREP souboru získán soubor s parametry potřebnými k určení topologie. Topologie je textový soubor popisující atomy, vazby a úhly v daném systému.



Obrázek 4.2: Vizualizace jednotlivých částí neutrálního monomeru po parametrizaci.[16]



Obrázek 4.3: Vizualizace různě protonovaných porfinových jader po parametrizaci.[16]

Soubor s parametry a PREP se staly vstupy pro program tLEaP z Amberu, jehož výstupními soubory jsou topologie a souřadnice parametrizované struktury. Tímto procesem prošlo všech 5 různých struktur graficky vyobrazených na obrázcích 4.2 a 4.3.

Po parametrizaci jednotlivých samostatných částí bylo provedeno sjednocení těchto struktur v jednu. Prvním krokem bylo seřazení řádků v PDB souboru popisujícím celou molekulu 3,4,5-TEG-TPP tak, aby bylo možné oddělit atomy z jednotlivých částí do oddílů. Tyto oddíly byly manuálně odděleny klíčovým heslem TER. Jednotlivé oddíly byly manuálně přejmenovány tak, aby tzv. jméno rezidua popisující molekulu odpovídala zkratce správné parametrizované části. Oddíly byly sekvenčně očíslovány. V rámci každého oddílu byly řádky seřazeny tak, aby jejich pořadí odpovídalo pořadí v souborech PREP popisujících jednotlivé části. Toto řazení bylo opět prováděno manuálně.

Byl vytvořen vstupní soubor pro tLEaP pro získání topologie.

```
source leaprc.gaff2
#PREP soubory
loadamberprep benzen.prep
loadamberprep ethylenglykol.prep
loadamberprep porfin.prep

#soubory s parametry
loadamberparams benzen.prm
loadamberparams ethylenglykol.prm
loadamberparams porfin.prm

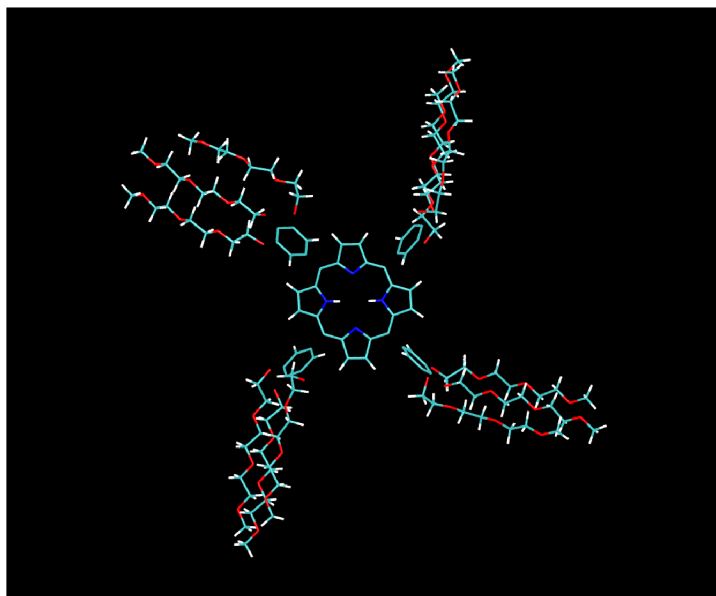
x = loadpdb porphyrin.pdb

saveamberparm x porphyrin.top porphyrin.crd

quit
```

Výpis 4.3: Vstupní soubor tLEaPu pro získání topologie porfyriu.





Obrázek 4.4: Vizualizace struktury z tLEaPu po provedení příkazů vypsaných v kódu 4.3. V této struktuře ještě nejsou definovány vazby mezi jednotlivými fragmenty.

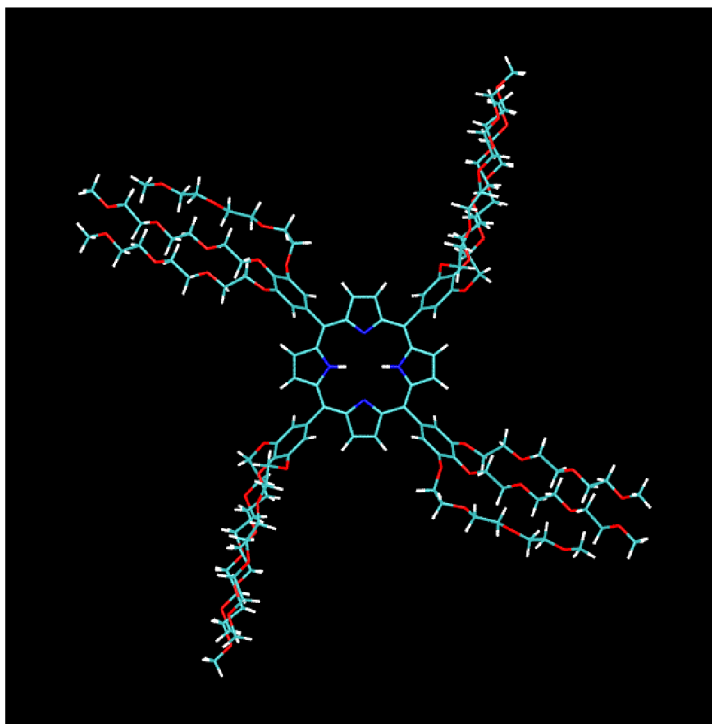
Z obrázku 4.4 je patrné, že parametrizovaná struktura není propojena v jednu molekulu. Vazby mezi jednotlivými fragmenty musely být manuálně přidány do vstupního souboru tLEaPu pomocí následujících příkazů

```
#nova vazba je definovana cisly rezidui a konkretnimi atomy  
bond x.1.C5 x.2.C3 # atomy C5 z rezidua 1 a C3 z rezidua 2  
bond x.1.C13 x.14.C3  
bond x.1.C19 x.10.C3  
...
```

Výpis 4.4: Vstupní soubor tLEaPu pro získání topologie porfyriu s definovanými vazbami mezi fragmenty.

Číslo značí sekvenční ID fragmentu a za ním je pak jméno atomu, který bude spojen vazbou. Výsledná neutrální struktura 3,4,5-TEG-TPP je zobrazena na obrázku 4.5.

Soubor s parametry pro celou strukturu byl vytvořen manuálně. Byl zkopírován již existující soubor parametrů. Chybějící parametry byly doplněny manuálně ze souboru parametrů silového pole GAFF2.

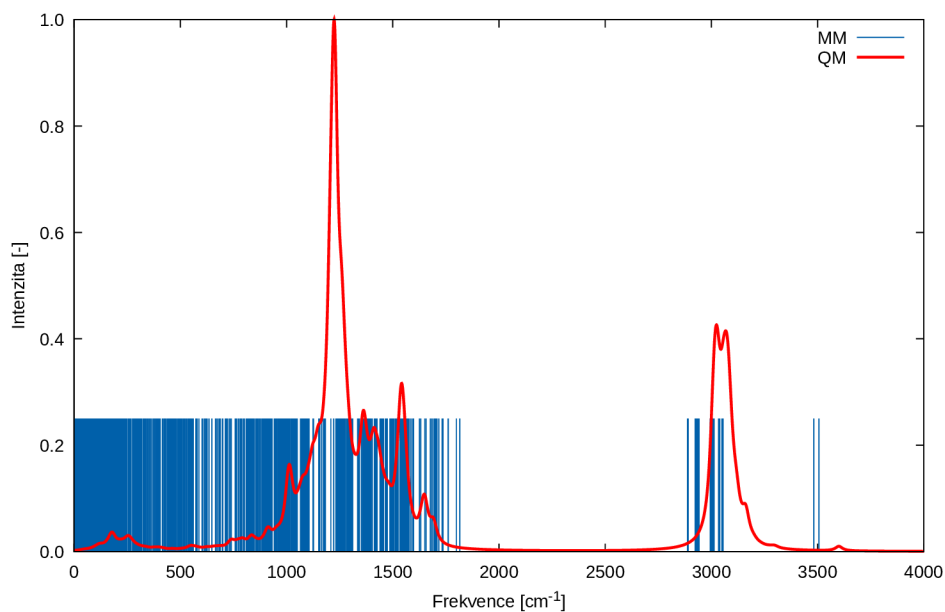


Obrázek 4.5: Vizualizace struktury z tLEaPu po provedení příkazů vypsanych v kódu 4.4.

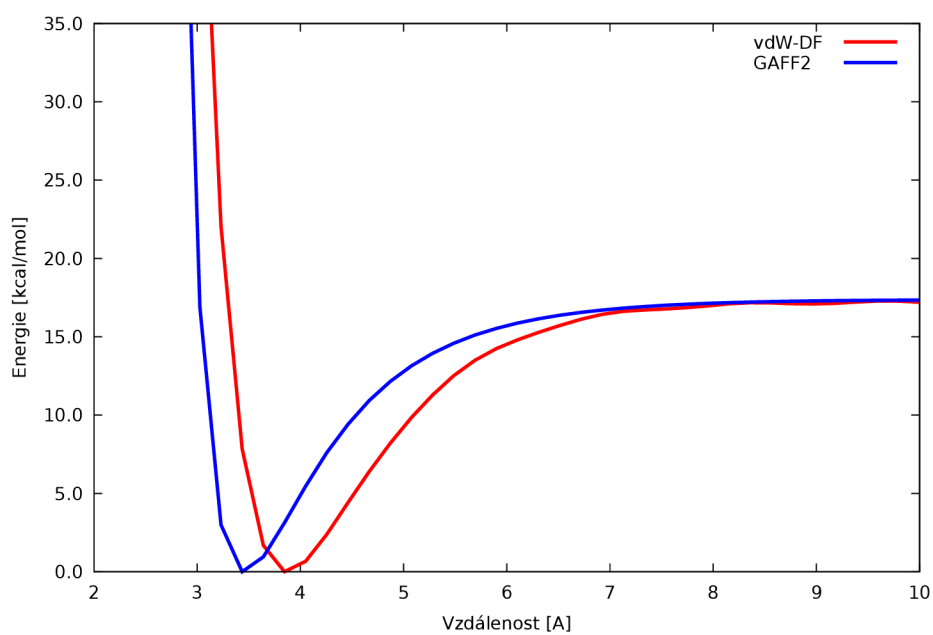
Topologie nabitých struktur byly vytvořeny modifikací PREP souboru přidáním vodíků na pyrolové dusíky. Rozdíl byl proveden ve vstupním souboru pro tLEaP. Místo parametrů pro neutrální porfyrinové jádro byly načteny parametry pro nabitě.

Pro validaci získaných parametrů byla školitelem provedena DFT optimalizace a výpočty vibračních spekter pomocí druhých derivací energie. Vibrace molekuly jsou totiž dány zakřivením harmonických potenciálů popisující jejich vazby a valenční úhly, tedy hodnotami silových konstant  $k_r$  a  $k_\alpha$ . Pro model vytvořený molekulární mechanikou lze určit pouze polohy peaků ve spektru bez jejich intenzity. Vibrační spektra jsou na obrázku 4.6.

Polohy peaků obou vibračních spekter se nacházejí ve velmi podobných frekvenčních pásmech, což indikuje, že silové konstanty z GAFF2 jsou vhodné k popisu této molekuly. Polohy minim interakční energie jsou vzájemně posunuty přibližně o 0,5 Å, ale hodnota energie ve velkých vzdálenostech konverguje ke stejné hodnotě. Přesnost byla pro účely této práce vyhodnocena jako dostatečná a parametry nebyly dále měněny.



Obrázek 4.6: Srovnání vibračních spekter modelů vytvořených molekulární mechanikou (modrá) a kvantovými výpočty (červená).



Obrázek 4.7: Srovnání křivek interakční energie mezi porfyrinovými kruhy získaných z DFT výpočtů (červeně) a molekulární mechaniky (modře).

## 4.1.2 Parametrizace dimeru

Ze tří různě nabitých monomerů lze vytvořit celkem 6 různých dimerů (neutrální–neutrální, neutrální–1<sup>+</sup>, neutrální–2<sup>+</sup>, 1<sup>+</sup>–1<sup>+</sup>, 1<sup>+</sup>–2<sup>+</sup> a 2<sup>+</sup>–2<sup>+</sup>). Postup parametrizace byl stejný jako u monomeru. Pro tLEaP bylo zapotřebí vytvořit PDB soubor popisující strukturu daného dimeru. Pro vytvoření potřebného PDB souboru byl vytvořen jednoduchý skript. Jeho výpis je označen jako 4.5.

```
#!/bin/bash

coordshift -G -z -2.5 unit.pdb -o mono-1.pdb
coordshift -G -t 50.0 -z 2.5 unit.pdb -o mono-2.pdb

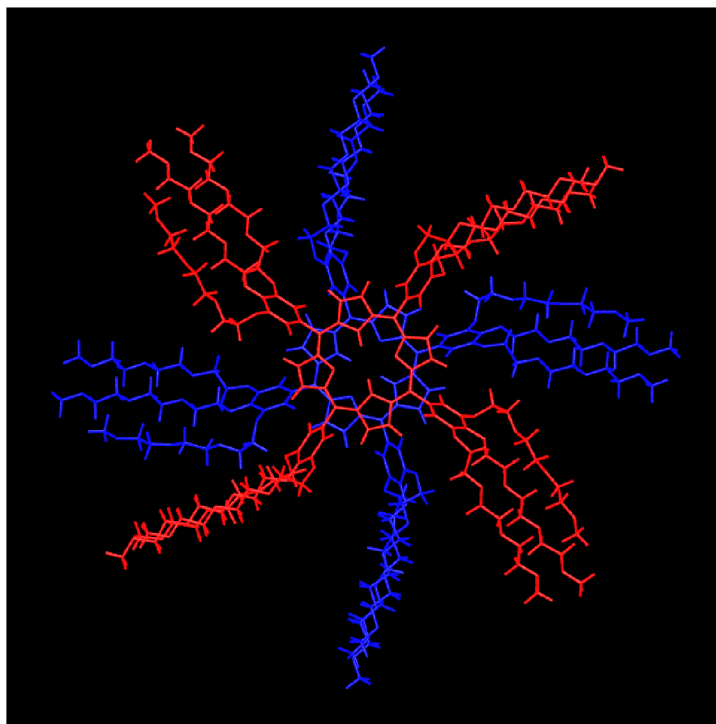
echo "TITLE    Dimer" > dimer.pdb
grep -v TITLE mono-1.pdb | grep -v END >> dimer.pdb
grep -v TITLE mono-2.pdb | grep -v END >> dimer.pdb

pdbrenum dimer.pdb > dimer.tmp
mv dimer.tmp dimer.pdb
```

Výpis 4.5: Zdrojový kód programu pro vytvoření PDB souboru popisujícího strukturu dimeru. "Coordshift" a "pdbrenum" jsou kódy vyvinuté školitelem pro manipulacemi se souřadnicovými soubory.

Použitý soubor *unit.pdb* je soubor popisující neutrální monomer. Výsledný soubor *dimer.pdb* popisuje strukturu neutrálního dimeru vizualizovanou na obrázku 4.8. Jednotlivé molekuly jsou vůči sobě otočeny o 50° a posunuty o 5 Å.

Po vytvoření PDB souboru byla pomocí tLEaPu vytvořena topologie pro neutrální dimer. Vstupní soubor byl vytvořen úpravou vstupního souboru pro parametrizaci monomeru. Úprava zahrnovala změnu názvu PDB souboru a přidání řádků s vazbami mezi fragmenty druhé molekuly.



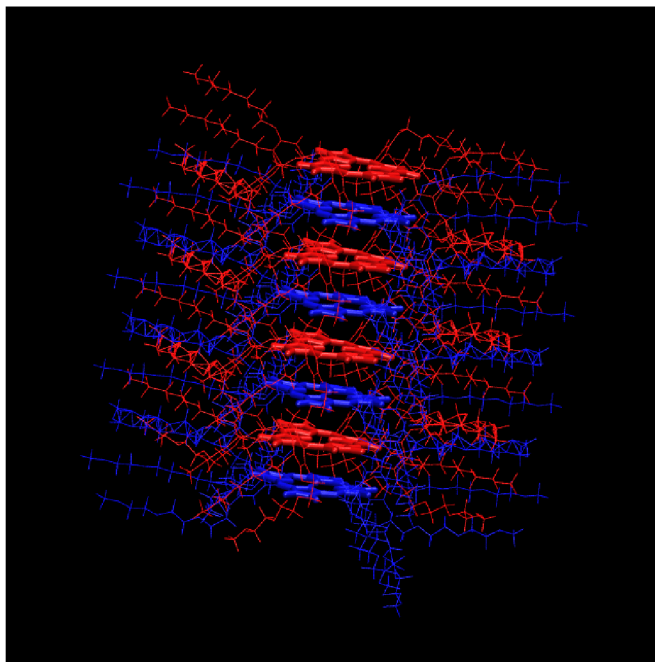
Obrázek 4.8: Vizualizace neutrální struktury popsané v souboru *dimer.pdb*

Pro topologie různě nabitých dimerů bylo zapotřebí v PDB souboru upravit jméno residua (fragmentu) u porfyrinových jader, aby bylo možné je od sebe rozeznat. V načítaných PREP souborech pro strukturu různě nabitých porfyrinových cyklů byly manuálně změněny zkratky v hlavičce tak, aby odpovídaly různým názvům jader v molekulách.

Takto byly vytvořeny topologie pro všech 6 různých variant dimerů.

### 4.1.3 Parametrizace agregátu

Ke stavbě agregátu byl použit stejný přístup jako při tvorbě dimerů. Agregát byl sestaven z osmi neutrálních molekul. Tyto molekuly byly vzájemně otočeny vždy o  $50^\circ$  a posunuty o 4 Å. Vizualizace struktury agregátu je zobrazena na obrázku 4.9.



Obrázek 4.9: Vizualizace počáteční struktury agregátu. Centrální porfyrinové kruhy jsou zvýrazněny tučně.

## 4.2 Příprava solvatovaných modelů

### 4.2.1 Solvatace monomerů a dimerů

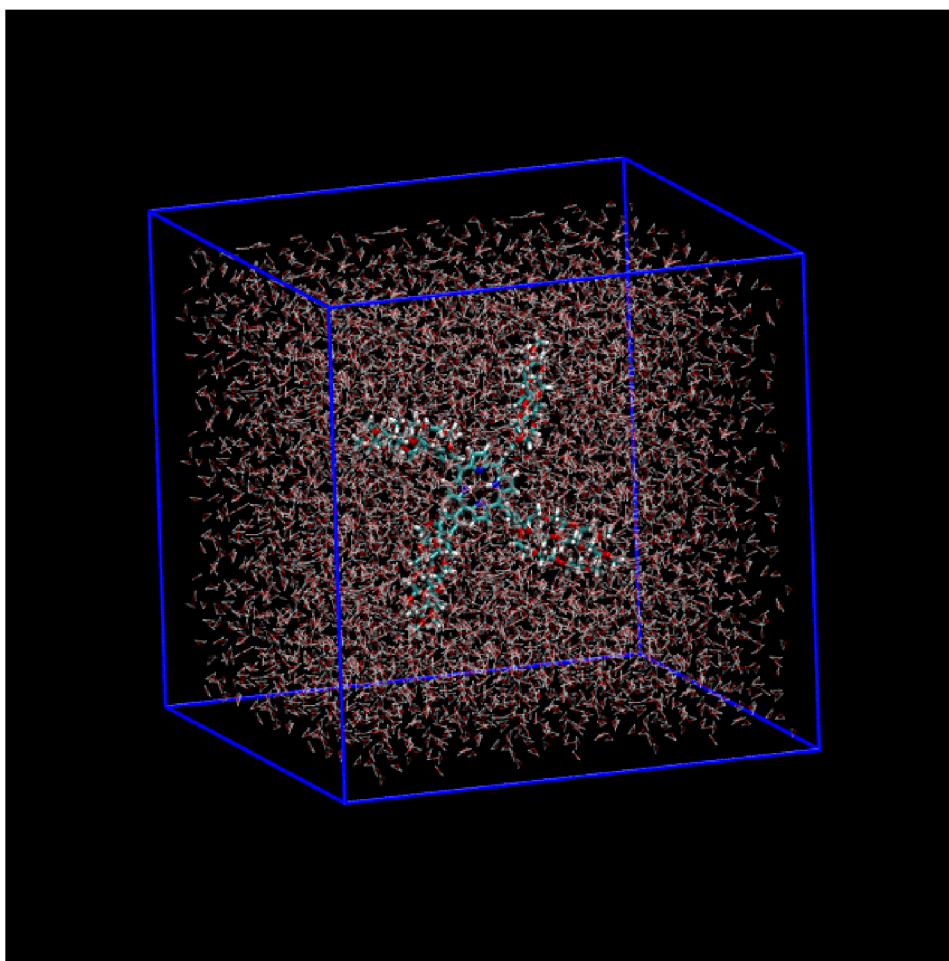
Pro simulace chování látky v roztoku je zapotřebí umístit parametrizované modely do boxu s vodou. Pro potřeby simulací byl zvolen model vody TIP3P [17]. Box s vodou byl k modelu generován pomocí tLEaPu podobně jako při vytváření topologie. Do vstupního souboru byl kromě *leaprc.gaff2* načten také *leaprc.water.tip3p* a pod definici vazeb mezi fragmenty byla připsána řádka z výpisu 4.6.

```
solvatebox x TIP3PBOX {12.0 10.0 23.0}
```

Výpis 4.6: Řádka připsaná do vstupního souboru 4.4 definující solvatační box.

Tímto příkazem byl generován box kolem modelu tak, že ve směru  $x$  byl od struktury ke stěně boxu byla vzdálenost 12 Å na obě strany, ve směru  $y$  pak 10 Å a ve

směru z 23 Å. Rozměry jsou různé pro jednotlivé směry, aby byl vytvořen kubický tvar boxu, který vyhovuje našim simulacím. Výsledný box má rozměr 65 Å na každé straně. Simulace s tímto boxem pak probíhaly v periodických okrajových podmínkách. Dostatečná velikost boxu umožnila použít přesný cutoff 12 Å pro vyčíslení elektrostatických interakcí metodou Ewaldovy sumace [18]. Vizualizace boxu je na obrázku 4.10.



Obrázek 4.10: Vizualizace monomeru v solvatačním boxu. Molekula porfyrinu uprostřed boxu je zvýrazněna tučně.

V případě nabitých molekul byly do boxu přidány také ionty chloru pro vyrovnání celkového náboje na nulu. Přidání chloru bylo provedeno při solvataci tLEaPem tak, že do vstupního souboru byla přidána řádka z výpisu 4.7.

```
addions x Cl- 0.0
```

Výpis 4.7: Řádka přidaná do vstupního souboru 4.4 pro neutralizaci náboje systému umístěním správného počtu záporně nabitých iontů do boxu.

Tímto příkazem je v systému vygenerováno tolik iontů chloru, aby celkový náboj

modelu byl nulový.

Stejný postup byl opakován pro dimery.

V takto vytvořeném modelu mohly být některé atomy příliš blízko u sebe. Aby byly nežádoucí blízké kontakty eliminovány, byla provedena krátká optimalizace pomocí nástroje sander ze softwarového balíku Amber. Pro optimalizaci byl napsán vstupní soubor 4.8 a skript pro spuštění 4.9

```
Geometry optimization
&cntrl
  imin=1,maxcyc=1000,ncyc=100,
  ntx=1,irest=0
  cut=12.0,
  nxto=1,ioutfm=0,ntpr=1,
  ntb=1,iwrap=1
/
```

Výpis 4.8: Vstupní soubor pro optimalizaci systému metodou steepest descent (prvních 100 kroků) a následně metodou konjugovaných gradientů (max. 1000 kroků).

```
#!/bin/bash

module load amber/19

sander -O\
  -i optimalizace.inp\
  -o optimalizace.out\
  -r optimalizace.rst\
  -p solvatace.top\
  -c solvatace.crd
```

Výpis 4.9: Skript pro optimalizaci systému pomocí nástroje sander. Na vstupu je konfigurační soubor (inp), topologie (top) a souřadnice (crd) systému. Výsledná struktura je uložena do restart souboru (rst), zatímco průběh výpočtu je popsán ve výstupním souboru (out).



## 4.2.2 Solvatace agregátu

Pro tvorbu modelu solvatovaného agregátu byl nejprve použit stejný přístup jako u monomerů a dimerů. S tímto přístupem se objevil problém během stlačování popsaného v kapitole 4.2.3. Při každém pokusu se agregát rozvolnil a rozpadl patrně kvůli špatné počáteční hustotě vody v okolí agregátu. Proto musel být změněn postup při tvorbě modelu.

V dalším kroku byl tedy pro vytvoření modelu napsán speciální skript. Vstupními soubory pro něj byl PDB soubor popisující strukturu samotného agregátu a PREP soubor popisující model molekuly vody. Mezi vstupní parametry pak patří rozměry boxu a počet molekul vody.

Rozměry boxu byly určeny podle rozměrů získaných z předchozích pokusů vytvořit model. Počet molekul vody byl vypočítán následujícím způsobem. Nejprve byl připraven box se 64 molekulami TIP3P modelu vody. Tento box byl ohříván a stlačován tak, aby teplota a hustota odpovídaly potřebným hodnotám pro solvataci agregátu. Z tohoto modelu byl určen objem  $V_{H_2O}$  jedné molekuly vody vydělením celkového objemu boxu počtem molekul. Dále byl použit objem boxu se solvatovaným agregátem  $V_1$  z neúspěšného pokusu o solvataci. Následně byl vypočítán objem agregátu  $V_A$  pomocí vztahu

$$V_A = V_1 - N_w \cdot V_{H_2O}, \quad (4.1)$$

kde  $N_w$  je počet molekul vody v neúspěšném modelu.

Od celkového objemu vytvářeného boxu byl odečten objem agregátu  $V_A$ . Tento rozdíl odpovídá objemu vody v modelu. Rozdíl byl následně vydělen objemem jedné molekuly vody, čímž byl získán hledaný počet molekul vody v boxu.

Výstupem z tohoto programu je PDB soubor popisující agregát v boxu s předem stanoveným počtem molekul vody. Tento PDB soubor posloužil jako vstup do tLEaPu, kterým byla vytvořena topologie modelu.

### 4.2.3 Ohřívání a stlačování systému

Sestavený systém ještě neodpovídá reálnému roztoku. Vodný roztok nemá odpovídající hustotu a teplotu. Proto je dalším krokem ohřívání. Ohřívání systému s monomerem proběhlo v rámci jedné MD simulace. Vstupní soubor pro ohřívání monomeru je vypsán ve 4.10. Pro spuštění simulace byl vytvořen jednoduchý skript z výpisu 4.11.

```
MD, NVT, no constraints
&cntrl
  imin=0,nstlim=50000,dt=0.001,
  ntx=1,irest=0,
  ntf=1,ntc=1,cut=12.0,nsnb=10,
  tempi=200.0,temp0=300.0,
  ntt=3,gamma_ln=1.0,
  ntxo=1,ioutfm=0,
  ntwr=1000,ntwx=1000,ntpr=100,
  ntb=1, iwrap=1
/
```

Výpis 4.10: Vstupní soubor pro ohřívání solvovaného systému během 50 000 kroků MD simulace s časovým krokem 1 fs. Počáteční teplota je nastavena na 200 K a postupně zvyšována na 300 K pomocí Langevinova termostatu.

```
#!/bin/bash

module purge
module load amber/23

sander -O -i heating.inp -o heating.out -r heating.rst \
  -x heating.trj -inf heating.inf -p solvatace.top \
  -c optimalizace.rst
```

Výpis 4.11: Skript pro spuštění ohřívání systému. Výsledná trajektorie je uložena v trj souboru.

Zahřívání systémů s dimery a agregátem bylo prováděno v několika krocích. V každém následujícím kroku byly molekuly fixovány k původním polohám menší silou, aby při ohřívání systému nedošlo k nechtěnému rozpadu struktur, ale zároveň aby docházelo k postupnému uvolňování. Tato fixace byla provedena změnou ve vstupním souboru. Na konec byly přidány řádky z výpisu 4.12.

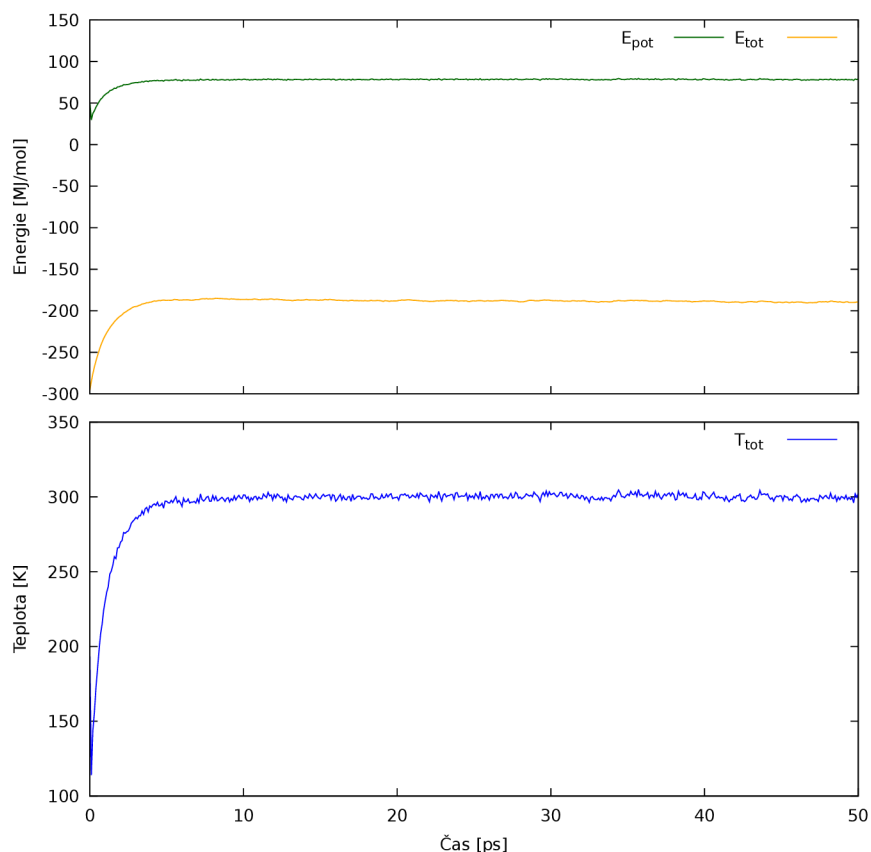
```
Fixovani ringu
500.0
RES 1
RES 18
END
END
```

Výpis 4.12: Specifikace pozičního fixování dimeru.

Číslo na druhém řádku specifikuje silovou konstantu harmonického potenciálu vybraných residuí (RES 1 a 18 jsou porfyrinová jádra). Snižováním této konstanty bylo provedeno postupné rozvolňování dimeru do stavu bez umělé fixace. Celkem byly provedeny 4 simulace s cílem ohřátí systému na 300 K s konstantami 500, 250, 50 kcal/mol/Å<sup>2</sup> a bez fixace.

Ke kontrole průběhu každé simulace sloužilo grafické zobrazení průběhu teploty, potenciální a kinetické energie systému.

Po ohřátí systému na požadovanou teplotu byla stlačováním boxu upravena hustota solventu. Stlačování bylo provedeno opět nástrojem sander. Byl připraven vstupní soubor a program pro spuštění. Stlačování proběhlo ve všech případech v rámci jedné simulace.



Obrázek 4.11: Graf průběhu teploty ( $T_{tot}$ ), potenciální ( $E_{pot}$ ) a celkové energie ( $E_{tot}$ ) modelu solvovaného neutrálního monomeru během ohřívání. Relaxace proběhla během prvních 5 ps.

```

MD, NVT, no constraints
&cntrl
  imin=0,nstlim=100000,dt=0.001,
  ntx=5,irest=1,
  ntf=1,ntc=1,cut=12.0,nsnb=10,
  temp0=300.0,
  ntp=1, pres0=1, taup=1,
  ntt=3,gamma_ln=1.0,
  ntxo=1,ioutfm=0,
  ntwr=1000,ntwx=1000,ntpr=100,
  ntb=2, iwrap=1
/

```

Výpis 4.13: Vstupní soubor pro stlačování solvovaného systému během 100 000 kroků s časovým krokem 1 fs a teplotou 300 K.

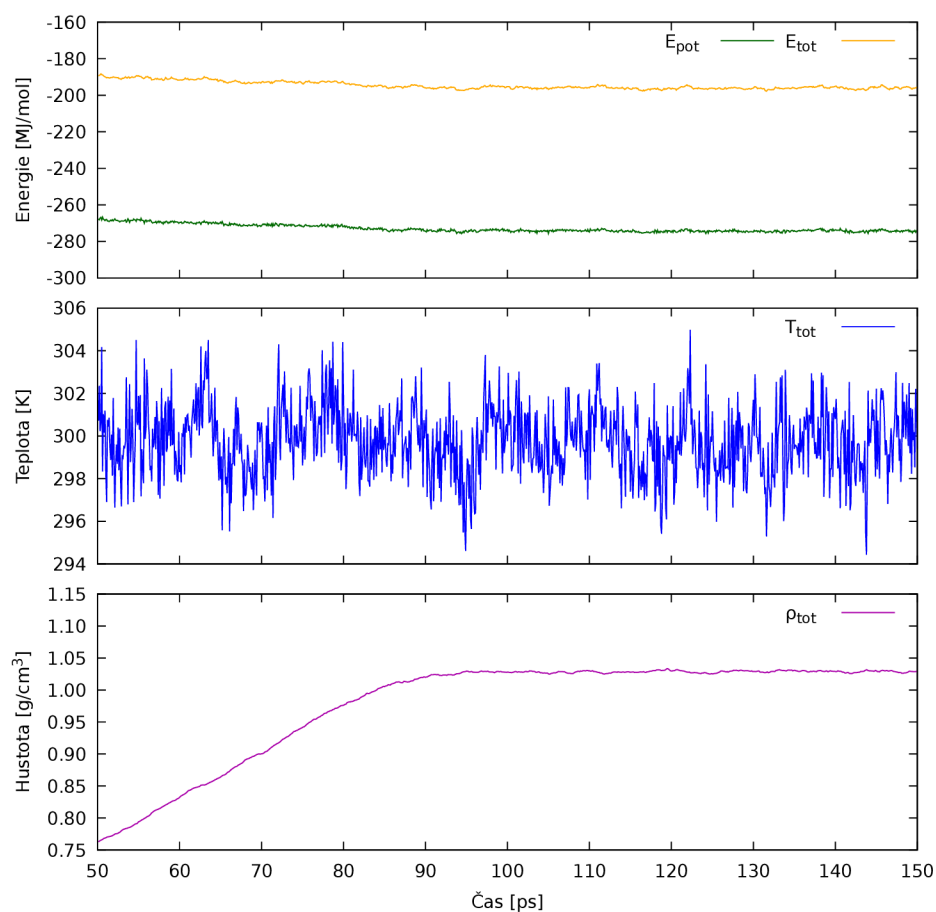
```
#!/bin/bash

module purge
module load amber/23

mpirun -n 16 sander.MPI -O \
  -i pressing.inp -o pressing.out -r pressing.rst \
  -x pressing.trj -inf pressing.inf -p solvatace.top \
  -c heating.rst
```

Výpis 4.14: Skript pro spuštění stlačování systému.

Po skončení simulace byla provedena kontrola průběhu pomocí časového vývoje celkové a potenciální energie, teploty a hustoty solventu. Ilustrativní časové vývoje těchto veličin jsou znázorněny v grafu na obrázku 4.12.



Obrázek 4.12: Graf průběhu celkové ( $E_{tot}$ ) a potenciální energie ( $E_{pot}$ ), teploty ( $T_{tot}$ ) a hustoty ( $\rho_{tot}$ ) systému s neutrálním monomerem během stlačování.

## 5 Analýzy trajektorií

Simulace chování jednotlivých struktur ve vodném roztoku byly prováděny v softwarovém balíku Gromacs, který je dostupný na našem lokálním klastru a je optimalizován pro dlouhé MD simulace. Protože modely byly připraveny pomocí Amberu, bylo zapotřebí překonvertovat soubory do formátů pro Gromacs. Toho bylo docíleno pomocí *amb2gro\_top\_gro.py* skriptu z balíku AmberTools.

Chování systémů bylo simulováno molekulární dynamikou s fixováním vazebných délek vodíků algoritmem LINCS [19]. Proto mohl být časový krok zvětšen na 2 fs. Bylo provedeno celkem 50 000 000 kroků (100 ns) a cut-off byl nastaven na 12 Å. Pro samotnou simulaci byl napsán vstupní soubor ve výpisu 5.1 a program pro spuštění výpočtu na clusteru ve výpisu 5.2.

Výstupem ze simulace je trajektorie v komprimovaném formátu XTC. Zběžná kontrola průběhu simulace byla vždy provedena pomocí vizualizace průběhu potenciální a celkové energie a teploty.

```

integrator           = md
dt                  = 0.002
nsteps              = 50000000

nstxout             = 0
nstxout-compressed  = 5000
nstlog              = 0
nstenergy           = 500
nstcalcenergy       = 500

cutoff-scheme       = Verlet
nstlist             = 10
nstcalclr           = 1
pbc                 = xyz
periodic_molecules  = no
rlist               = 1.2

coulombtype         = PME
pme-order           = 4
fourier-spacing     = 0.15
r-coulomb           = 1.20
ewald-rtol          = 1e-06
ewald-geometry      = 3D

vdwtype             = cut-off
vdw-modifier        = potential-switch
rvdw-switch         = 1.10
rvdw                = 1.20

constraints         = h-bonds
constraint-algorithm = LINCS

gen-vel             = no
tcoupl              = Nose-Hoover
nsttcouple          = 1
tc-grps             = System
tau-t               = 5.0
ref-t               = 300.0

annealing           = no
pcoupl              = no
comm_mode           = linear
nstcomm             = 100

```

Výpis 5.1: Vstupní soubor pro simulaci v Gromacsu

```

#!/bin/bash
#PBS -l nodes=1:ppn=12
#PBS -N mono+0

NAME="gromacs-md-1"
CRD="gromacs.gro"
TOP="gromacs.top"
GMX="gmx_mpi"

SCRATCH=/scratch/vysloj02
#####

cd $PBS_O_WORKDIR
rm -f ${NAME}.tpr

${GMX} grompp -maxwarn 1 -c ${CRD} -p ${TOP} \
  -f ${NAME}.mdp -o ${NAME}.tpr
rm -f mdout.mdp

if [ ! -f ${NAME}.tpr ]; then
  exit; fi
#####

cp ${NAME}.tpr $SCRATCH/
cd $SCRATCH

${GMX} mdrun -s ${NAME}.tpr -cpo ${NAME}.cpt -g ${NAME}.log \
  -o ${NAME}.trr -x ${NAME}.xtc -c ${NAME}.gro -e ${NAME}.edr

mv ${NAME}.* $PBS_O_WORKDIR/
rm -f *

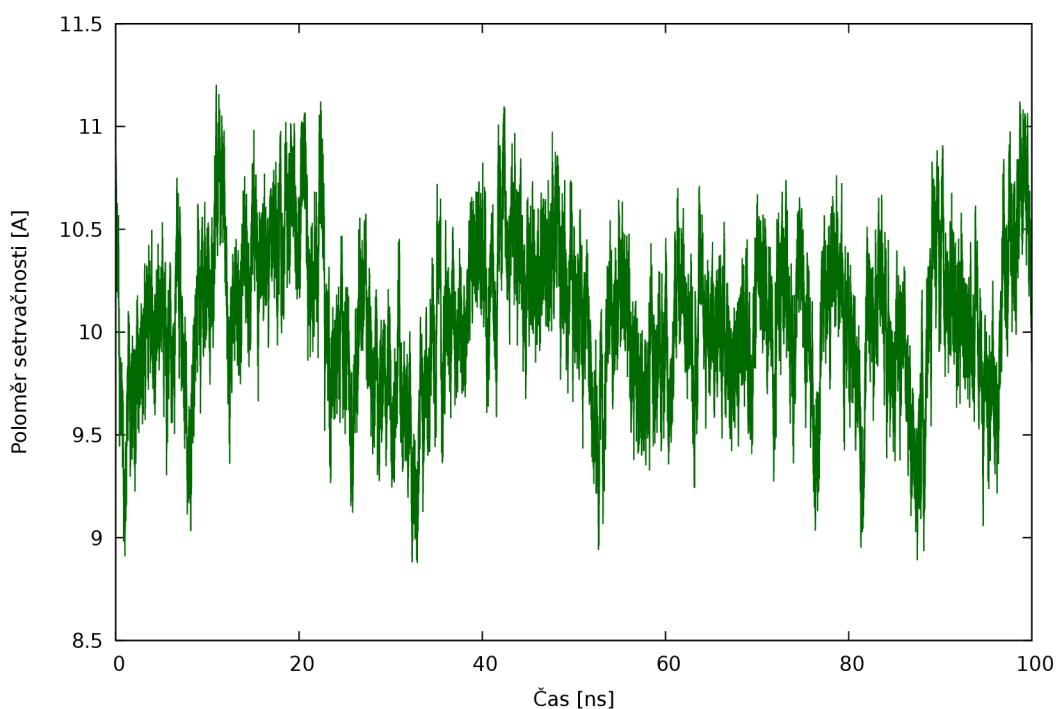
```

Výpis 5.2: Kód pro spuštění simulace na lokálním klastru.



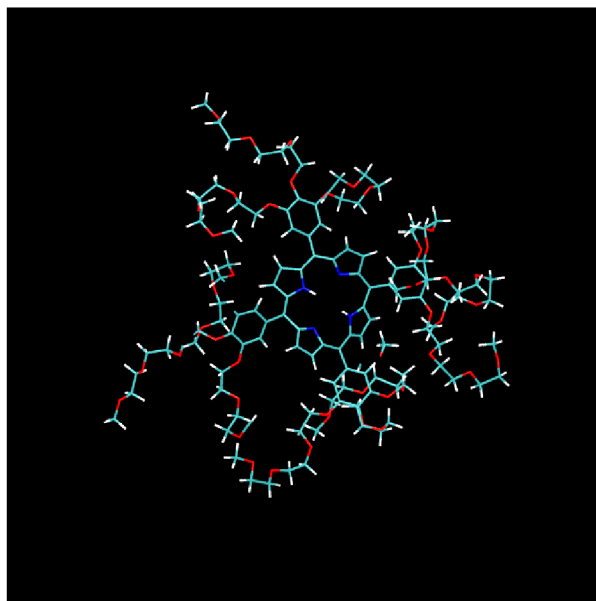
## 5.1 Monomery

Z trajektorie monomerů byl určen vývoj poloměru setrvačnosti (tzv. gyration radius) v čase. Z této veličiny lze usuzovat rozložení atomů molekuly v prostoru. Čím větší je hodnota této veličiny, tím větší je prostor, ve kterém je hmota rozložena. Z časového vývoje lze určit, zda se molekula rozkládá do šířky, či se sbaluje do těsnějšího uspořádání.



Obrázek 5.1: Graf závislosti poloměru setrvačnosti na čase pro neutrální monomer.

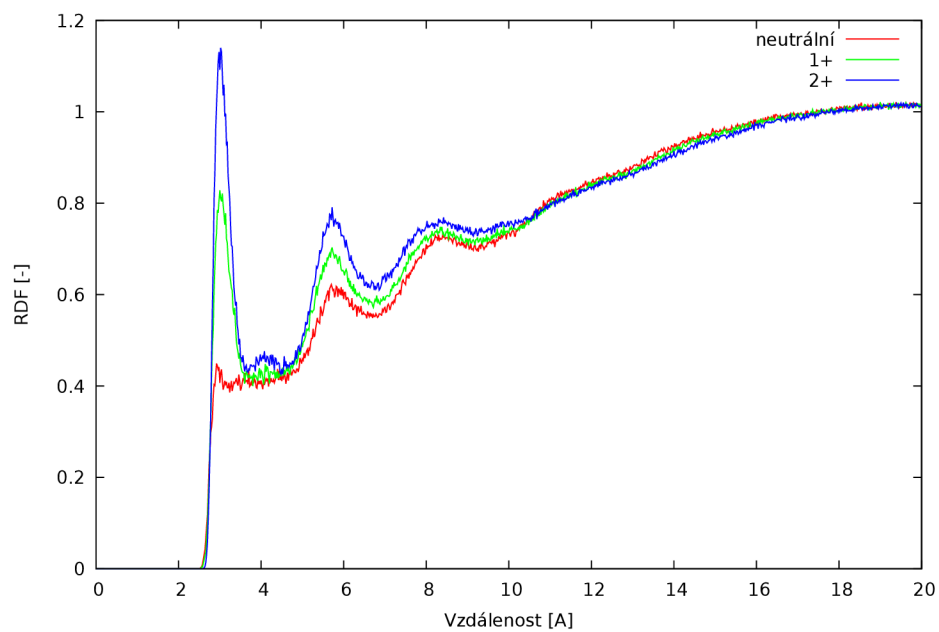
Graf závislosti poloměru setrvačnosti na čase pro neutrální monomer je na obrázku 5.1. Poloměr setrvačnosti v průběhu simulace osciloval mezi hodnotami 9 a 11 Å bez patrného nárůstu nebo poklesu. Z toho lze usuzovat, že nedošlo k výraznému sbalení řetězců kolem porfyrinového jádra a struktura zůstala po celou dobu přibližně v uspořádání jako na obrázku 5.2. Stejný průběh byl pozorován i pro nabitě monomery.



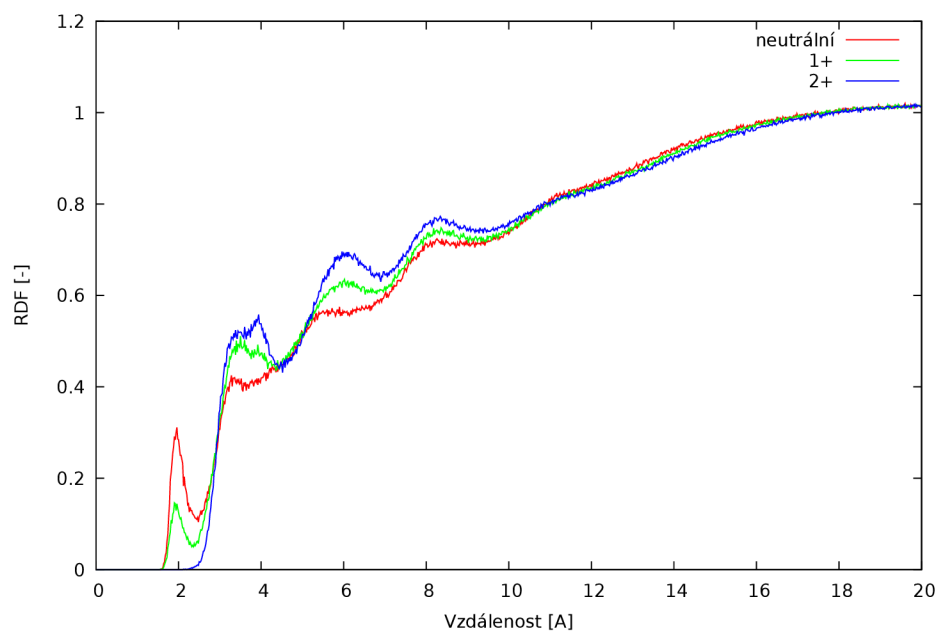
Obrázek 5.2: Struktura neutrálního monomeru na konci produktivní simulace.

Dále byl proveden výpočet radiální distribuční funkce. Tato funkce určuje pravděpodobnost výskytu částice nebo skupiny částic ve vzdálenosti  $r$  od pozorovaného atomu, která je normována na jednotkovou hustotu v objemu. Byla vypočítána radiální distribuční funkce zvláště pro vodíky a kyslíky z atomů vody ve vztahu k dusíkům v porfyriu. Funkce pro strukturu neutrálního monomeru jsou vykresleny na obrázku 5.3.

Z grafů je patrné, že první solvatační vrstva se nachází ve vzdálenosti 2 až 4 Å v závislosti na protonaci. Z různých poloh peaků pro vodíky a kyslík lze usuzovat, že voda se k porfyriu natačí blíže vodíky pro případ neutrálního a  $1^+$  monomeru. Naopak u  $2^+$  struktury jsou vody natočené kyslíkem k porfyriu. Proto je první peak pro vodíkovou funkci posunut do menší vzdálenosti. Vlivem dipólové interakce vody s nabíjejícím se porfyriem se tak evidentně zvětšuje solvatační interakce.



(a)

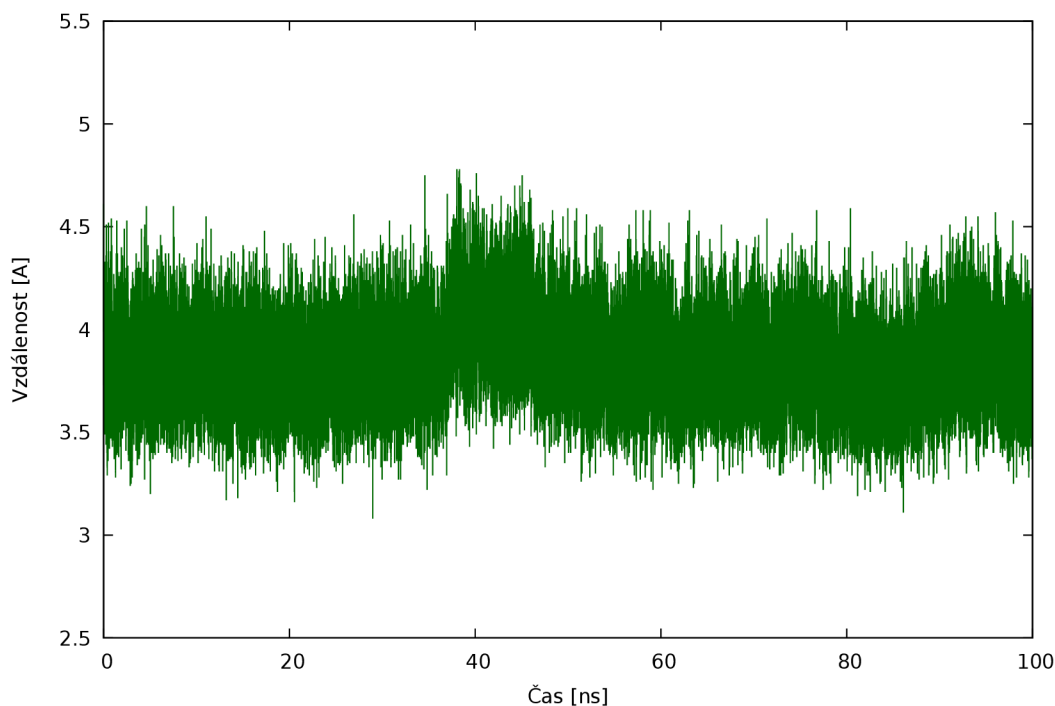


(b)

Obrázek 5.3: Radiální distribuční funkce detekující průměrnou hustotu kyslíků (a) a vodíků (b) okolo pyrrolových dusíků během simulace.

## 5.2 Dimery

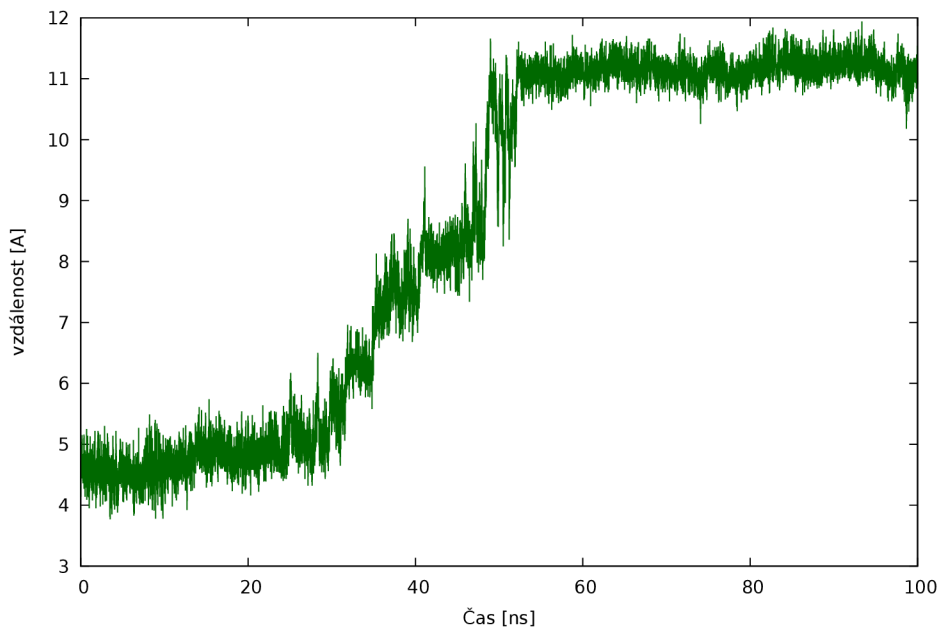
Z trajektorie dimerů byl určen časový průběh vzdálenosti mezi jednotlivými molekulami 3,4,5-TEG-TPP. Vzdálenost byla počítána mezi dvojicemi dusíků z jednotlivých monomerů, aby bylo možné detekovat i případnou vzájemnou rotaci monomerů v dimeru. Vývoj vzdáleností mezi dvěma neutrálními molekulami v dimeru je graficky zobrazen na obrázku 5.4.



Obrázek 5.4: Graf vývoje vzdálenosti mezi dvěma neutrálními molekulami 3,4,5-TEG-TPP během simulace.

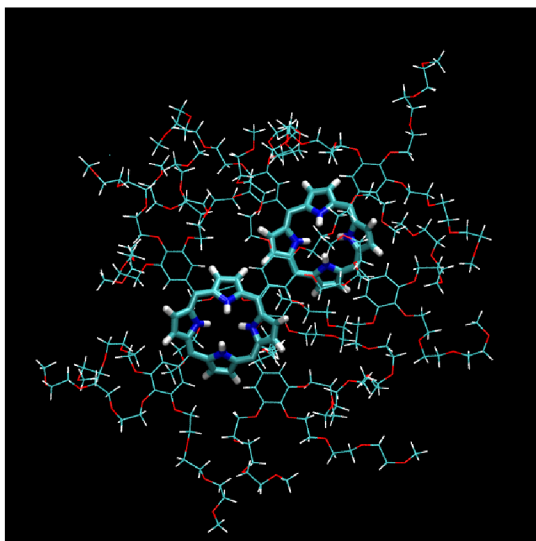
Z časového vývoje vzdáleností bylo usuzováno na stabilitu dimerů. Z grafu 5.4 je patrné, že vzdálenost během celé simulace oscilovala. Střední hodnota vzdálenosti byla určena jako 3,71 Å a směrodatná odchylka jako 0,25 Å. V simulovaném časovém horizontu byl neutrální dimer stanoven jako stabilní. Nedochozí ani k rozvolnění ani k vzájemné rotaci monomerů.

Velmi podobné výsledky byly získány i pro ostatní dimery s různými kombinacemi nábojů. Jedinou výjimkou se stal dimer složený ze dvou molekul s nábojem  $2^+$ . Průběh vzdáleností pro tento dimer je popsán grafem na obrázku 5.5.



Obrázek 5.5: Graf vývoje vzdálenosti mezi dvěma molekulami 3,4,5-TEG-TPP s nábojem  $2^+$  během simulace.

Z časového vývoje lze říci, že v čase 30 ns se začaly jednotlivé molekuly vzdalovat. Vzájemná vzdálenost se ustálila na 11 Å. Z toho je patrné, že i přes rozpad dimeru spolu molekuly interagují postranními řetězci. Výsledná struktura ze simulace tohoto dimeru je na obrázku 5.6. Jak je vidět, dimer není zcela disociovaný – monomery jsou provázány glykolovými řetězci – ale vlivem velmi silné elektrostatické repulze došlo k rozvolnění struktury.



Obrázek 5.6: Struktura dimeru molekul s náboji  $2^+$  po 100 ns simulace v roztoku se zvýrazněnými porfyrinovými jádry.

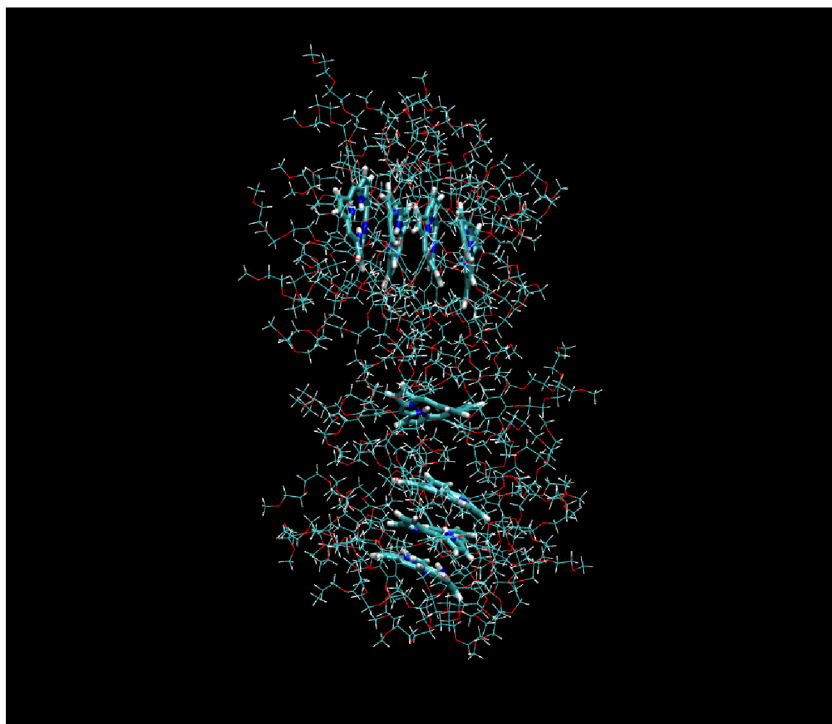
### 5.3 Agregát

Po skončení simulace byla nejprve vizuálně zkontrolována výsledná struktura. Ta je vyobrazena na obrázku 5.7. Na této struktuře došlo k rozvolnění v několika místech. Nebyla proto vhodná k protonaci a následnému zkoumání vlivu velikosti agregátu na stabilitu.

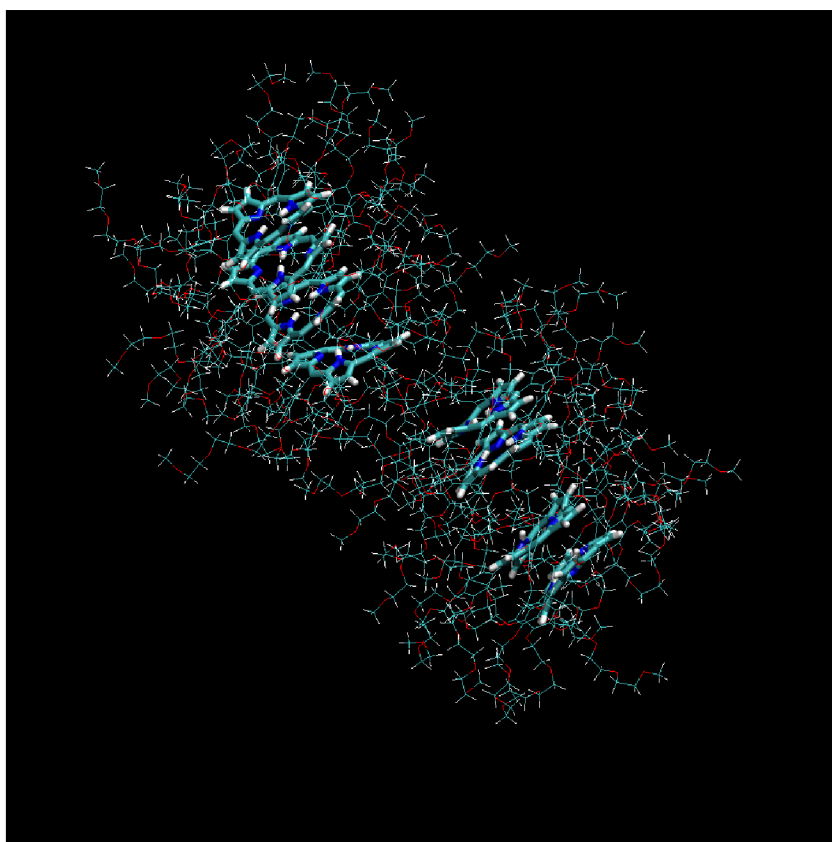
Proto byl postaven nový model podle postupu popsaného v kapitole 4.2.2. Byla ovšem zkrácena vzdálenost mezi jednotlivými molekulami ze 4 na 3 Å. Tento model byl dále ohříván a stlačován podle kapitoly 4.2.3. Následně byla spuštěna simulace tohoto systému a analyzována její trajektorie. Výsledná struktura ze simulace tohoto agregátu je na obrázku 5.8.

Také v tomto případě došlo ke zlomům v několika místech. Z této skutečnosti vyplývá, že neutrální agregát s pravidelným uspořádáním monomerů ve stackovém uspořádání není ve vodě stabilní.

Z výsledné struktury je také patrné, že přestože celý agregát je nestabilní, rozpadl se na několik stabilnějších útvarů. Tímto rozpadem vznikly dva neutrální dimery, což je v souladu s předchozím pozorováním na simulaci samotného dimeru.



Obrázek 5.7: Struktura agregátu s původními vzdálenostmi 4 Å mezi molekulami po skončení 100 ns simulace se zvýrazněnými porfyrinovými jádry.



Obrázek 5.8: Struktura agregátu s původními vzdálenostmi 3 Å mezi molekulami po skončení 100 ns simulace se zvýrazněnými porfyrinovými jádry.

## 6 Optická a magnetická spektra

Vzorkování je proces, kterým se z trajektorie vybírá určitý počet struktur, z nichž jsou následně určovány různé statistiky a vlastnosti systémů. Z trajektorií pro různě nabitě monomery bylo vzorkováním získáno vždy 100 struktur rovnoměrně rozložených během 100 ns dlouhé trajektorie. Mezi jednotlivými vzorky byl tedy časový interval 1 ns, který je dostatečně dlouhý na to, aby byly vzorky považovány za statisticky nezávislé. Pro vzorkování byl připraven skript z výpisu 6.1.

```
#!/bin/bash
module load gromacs/2023.3

NAME=gromacs-md-1

gmx trjconv -f ../$NAME.trr -s ../$NAME.tpf -n ../$NAME.ndx \
-o sample.gro -s 500 -pbc mol - center -sep
```

Výpis 6.1: Zdrojový kód skriptu na vzorkování trajektorií.

### 6.1 UV/VIS spektra

Na jednotlivých strukturách získaných vzorkováním z trajektorií byla pomocí softwaru Gaussian vypočítána absorpční spektra v oblasti viditelného světla.

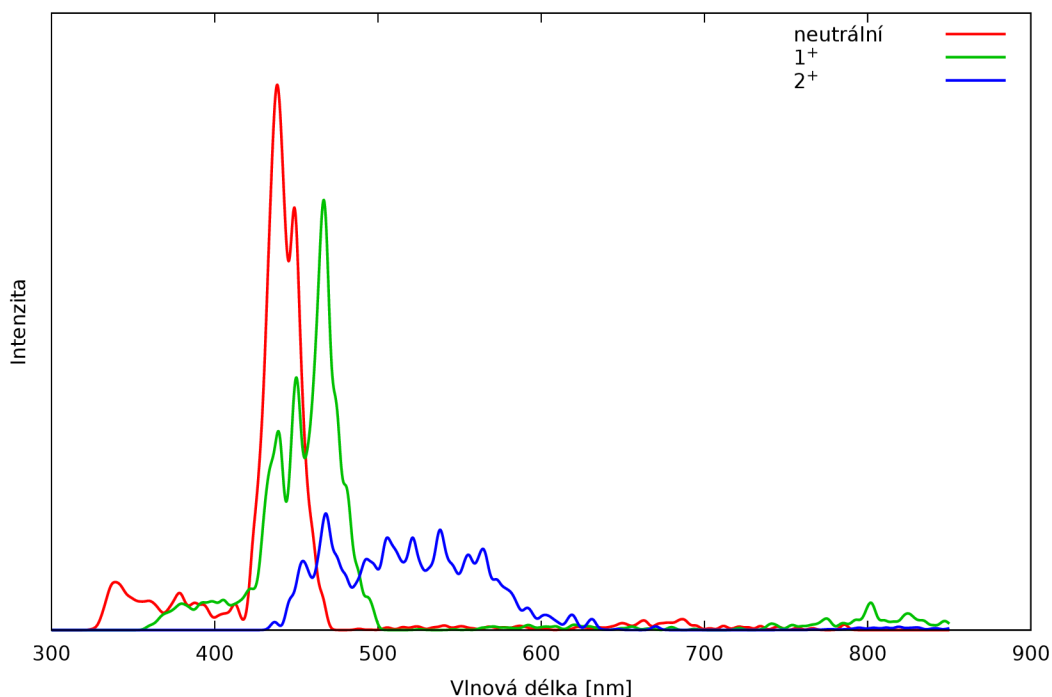
Vzhledem k velikosti a časové náročnosti byl výpočet proveden semiempirickou metodou ZINDO. Konkrétní metoda byla definována v hlavičce vstupních souborů.



```
#p ZINDO(NStates=10) SCF(Tight, QC, MaxCycle=250)
```

Výpis 6.2: Specifikace parametrů výpočetní metody absorpčního spektra v oblasti UV/VIS. Na každém vzorku bylo napočítáno 10 excitovaných stavů a optické spektrum bylo určeno z přechodů mezi nimi.

Ze všech 100 napočítaných spekter na jednotlivých strukturách byl určen průměr. Průměrná absorpční spektra jsou na obrázku 6.1.



Obrázek 6.1: Napočítaná absorpční spektra v oblasti viditelného světla pro různě nabitě monomery (průměr ze 100 vzorků).

## 6.2 NMR spektra

Na strukturách vybraných vzorkováním z trajektorie byla vypočítána NMR spektra opět za použití softwaru Gaussian. Pro výpočet magnetických spekter byla zvolena metoda DFT, jejíž specifikace je ve výpisu 6.3. Jako referenční hodnota pro výpočet bylo použito spektrum tetramethylsilanu vypočítané stejnou metodou.

```
#p wb97xd/6-31g SCF(Tight, XQC, MaxCycle=250) NMR
```

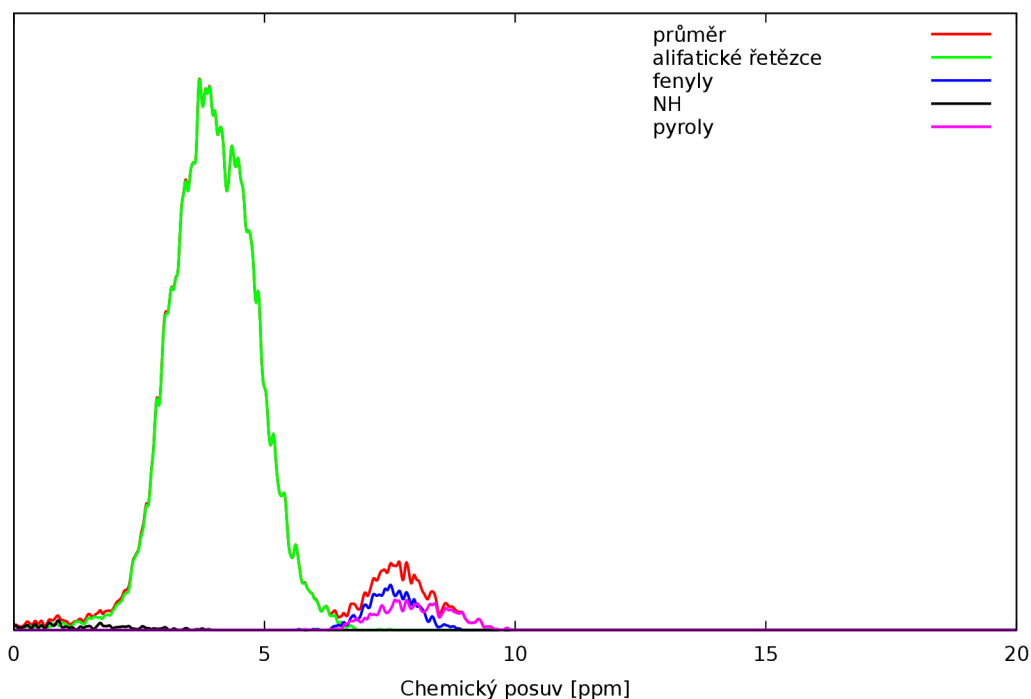
Výpis 6.3: Specifikace parametrů pro výpočet NMR spektra na struktuře.

Ze všech získaných spekter byl určen průměr. Pro ilustraci byla vypočítána i průměrná spektra pro všechny skupiny ekvivalentních vodíků na struktuře. Výsledná spektra pro neutrální strukturu jsou vykreslena na obrázku 6.2.

Spektra získaná touto metodou byla počítána ve vakuu, proto byl proveden výpočet spekter na stejných vzorcích také upravenou metodou, která do výpočtu zahrne elektrostatické stínění mimikující vodné prostředí (tzv. implicitní solvent). Její specifikace je ve výpisu 6.4.

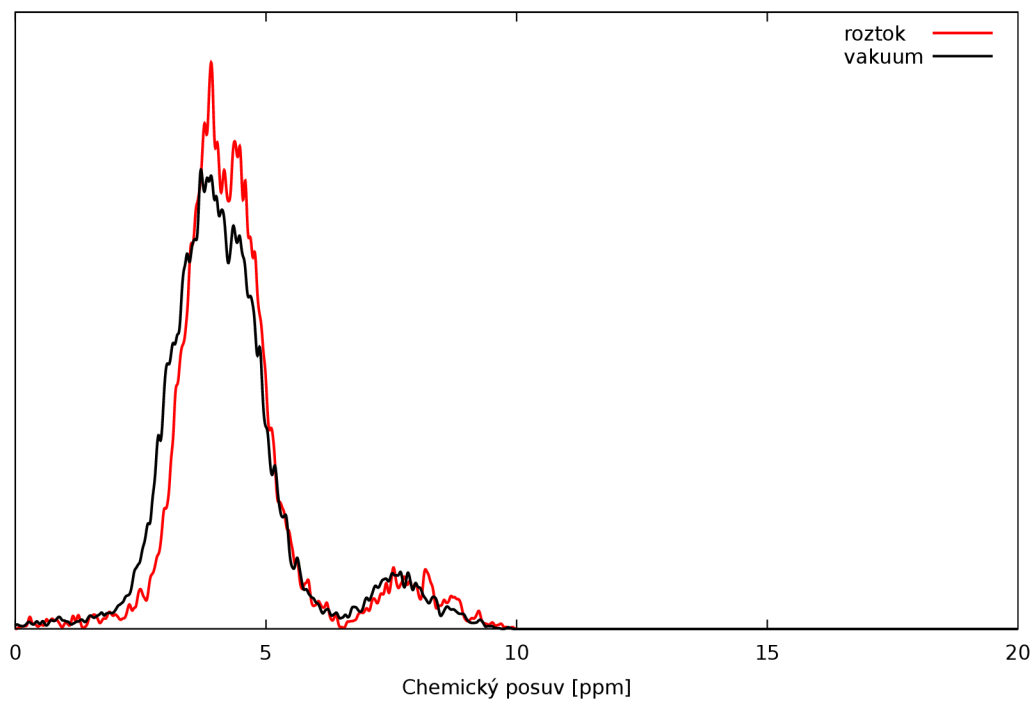
```
#p wb97xd/6-31g SCF(Tight,XQC,MaxCycle=250) NMR
SCRF(IEFPCM, Solvent=Water)
```

Výpis 6.4: Specifikace parametrů pro výpočet NMR spektra na struktuře.



Obrázek 6.2: Průměrné NMR spektrum pro celou neutrální strukturu a jednotlivé skupiny ekvivalentních vodíků.

Z vypočítaných spekter bylo určeno průměrné spektrum. Spektrum pro neutrální strukturu v roztoku je na obrázku 6.3.



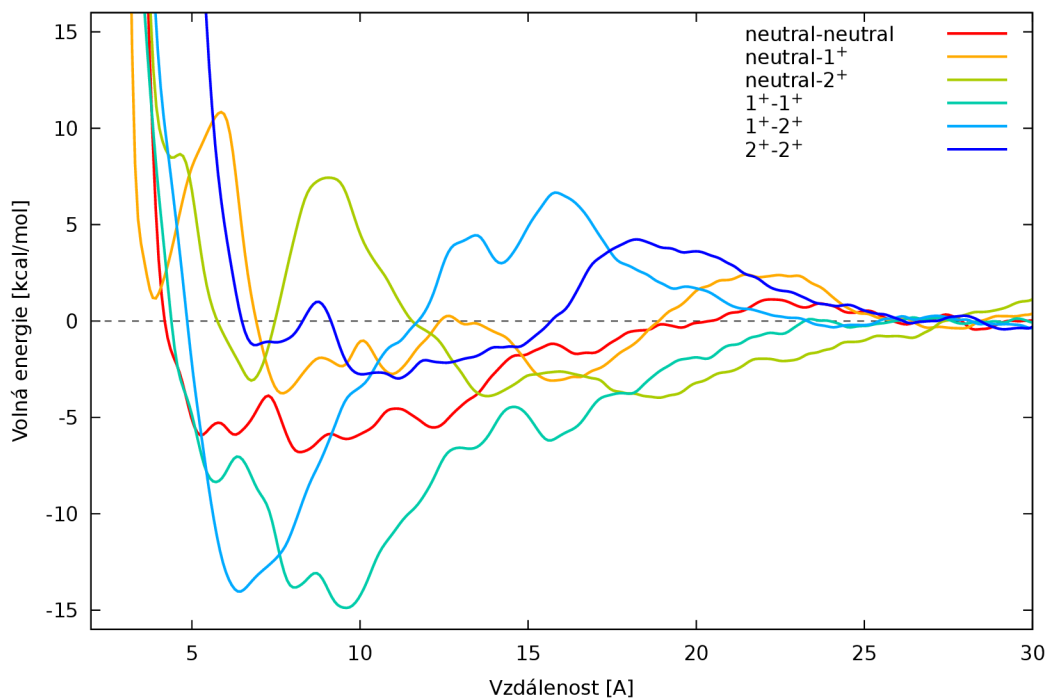
Obrázek 6.3: Solvatační efekt na NMR spektrum neutrální struktury.

# 7 Porovnání s experimentem

## 7.1 Stabilita dimerů

Ověřovaná hypotéza mluví o stabilních dvakrát a třikrát protonovaných dimerech. Z trajektorií různě nabitých dimerů vycházejí jako stabilní všechny kombinace kromě struktury s celkovým nábojem  $4^+$ .

Stabilita v počítané trajektorii může být dána krátkým časovým úsekem, který byl simulován – k rozpadu může dojít až po 100 ns. Proto byly školitelem určeny profily volných energií jednotlivých struktur pomocí tzv. metadynamiky. Grafy jsou vyobrazeny na obrázku 7.1.



Obrázek 7.1: Profily volných energií pro různě nabité dimery.

Z profilů volné energie vychází jako nejstabilnější dvakrát protonovaný  $1^+ - 1^+$  a třikrát protonovaný  $1^+ - 2^+$  dimer. Průběh volné energie u dimeru neutrální  $- 2^+$  také naznačuje stabilitu, přestože lokální minimum není tak hluboké. Za tímto minimem se nachází výrazná energetická bariéra, kterou je obtížné překonat, a tak se dimer stabilizuje s porfyrinovými cykly ve vzdálenosti asi 7 Å. Ostatní struktury mají průběhy volné energie rozvleklé bez výrazných minim a bariér, a proto se budou jádra volně vzdalovat a přibližovat v rámci poměrně širokých intervalů vzdáleností.

Dimer  $2^+ - 2^+$  vychází z průběhu volných energií jako nejméně stabilní. Z trajektorie byl určen jako nestabilní a vzdálenost porfyrinových jader se ustálila přibližně na 11 Å (viz obrázek 5.5). V této vzdálenosti se také nachází lokální minimum volné energie.

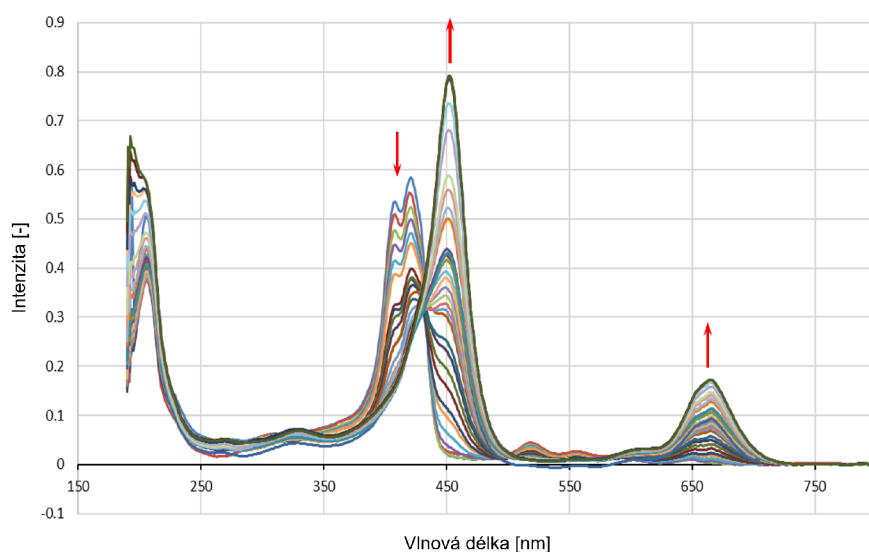
Experimentální hypotéza o stabilitě  $1^+ - 1^+$  a  $1^+ - 2^+$  nabitých dimerů se zdá být správná. Tyto dimery by skutečně měly tvořit stabilní produkty v kyselém prostředí.

## 7.2 UV/VIS spektra

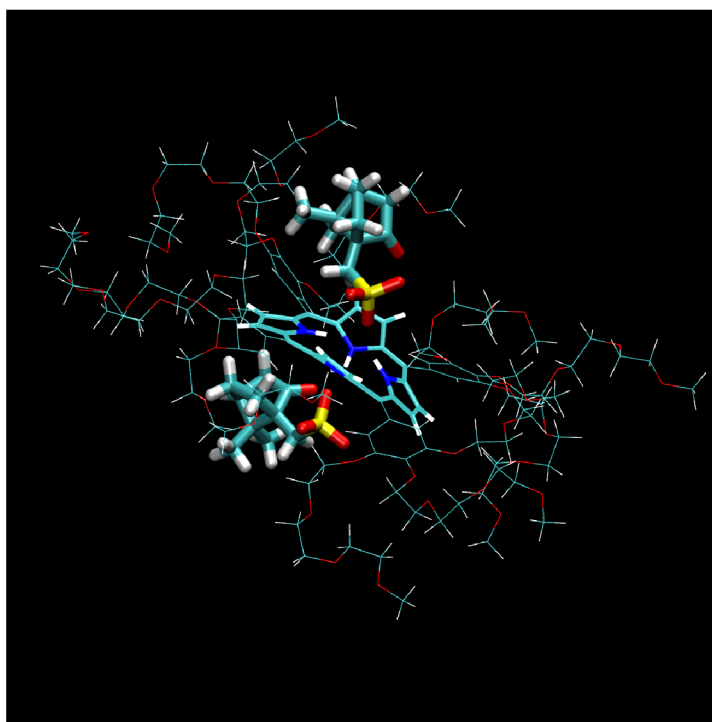
Vypočítaná UV/VIS spektra z kapitoly 6.1 byla porovnána s experimentálně naměřenými spektry Dr. Labutou (NIMS, Japonsko). Experimentální data jsou na obrázku 7.2. K protonaci byla v experimentu použita kyselina kafrsulfonová.

Napočítané optické spektrum z obrázku 6.1 neodpovídá experimentálním datům v grafu 7.2. Spektrum získané pro neutrální monomer má největší peak v oblasti asi 400-450 nm stejně jako v experimentálním spektru. Monomer s nábojem  $1^+$  má největší peak posunutý do oblasti 450 - 500 nm. Zde se již spektra začínají lišit. Ovšem největší rozdíl byl získán pro monomer s nábojem  $2^+$ . V tomto případě vznikl široký band ve vlnových délkách 450 - 600 nm.

Rozdílnost napočítaných a naměřených spekter může způsobovat přítomnost kyseliny kafrsulfonové v roztoku. Proto byl školitelem postaven model monomeru  $1^+$  a  $2^+$  za přítomnosti jedné, respektive dvou molekul kyseliny. Vizualizace systému s nábojem  $2^+$  a dvěma molekulami kyseliny je na obrázku 7.3.

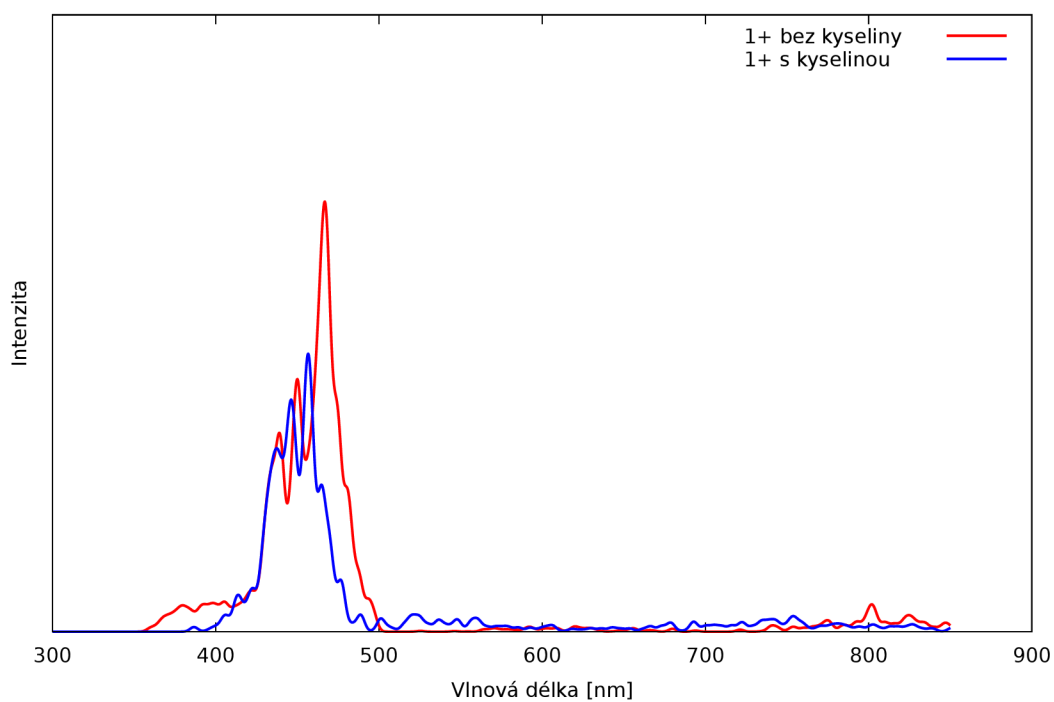


Obrázek 7.2: Experimentálně naměřená UV/VIS spektra 3,4,5-TEG-TPP (Dr. Labuta). Při zvyšující se koncentraci kyseliny kafrsulfonové dochází k poklesu peaku v oblasti 400 nm, nárůstu v 500 nm a vzniku peaku přibližně v oblasti 650 nm.

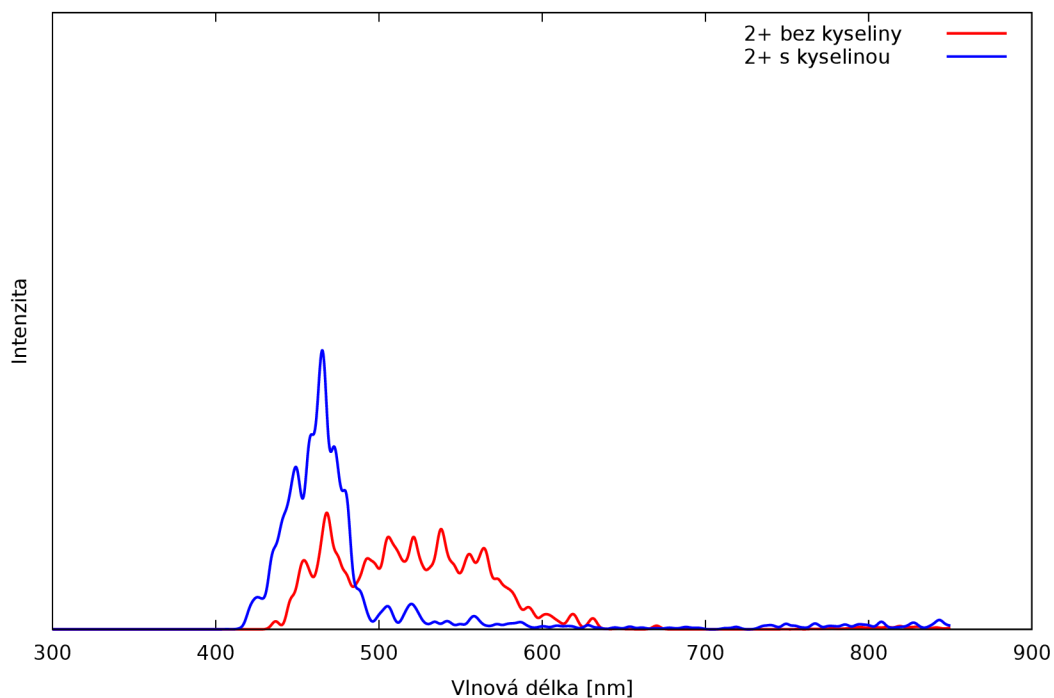


Obrázek 7.3: Vizualizace struktury se dvěma molekulami karfsulfonové kyseliny. Zvýrazněné molekuly kyseliny jsou elektrostaticky drženy poblíž porfyrinového kruhu.

Na těchto modelech byla spuštěna stejná simulace a na 100 vzorcích napočítáno UV/VIS spektrum, které bylo následně zprůměrováno. Spektra napočítaná na modelech bez kafrsulfonové kyseliny a s kyselinou jsou na obrázku 7.4 a 7.5.



Obrázek 7.4: Napočítané optické spektrum na monomeru 1<sup>+</sup> s přítomností a bez přítomnosti kyseliny kafrsulfonové.

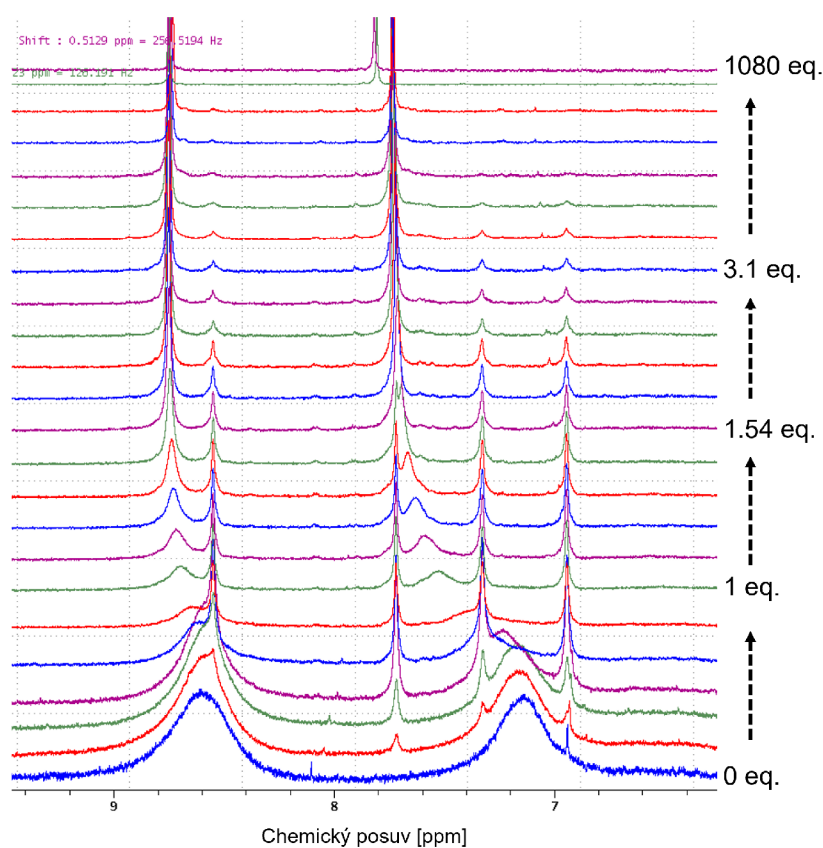


Obrázek 7.5: Napočítané optické spektrum na monomeru 2<sup>+</sup> s přítomností a bez přítomnosti kyseliny kafrsulfonové.

Z grafů na obrázcích 7.4 a 7.5 je patrné, že přítomnost kyseliny má na optické spektrum vliv. Pro systémy, ve kterých je kyselina přítomna, se peak posouvá blíže do experimentálně naměřené oblasti. Ani tato napočítaná spektra však neodpovídají přesně experimentálním datům. Spektrum může být dále ovlivněno přítomností stabilních dimerů. Tento efekt je předmětem dalšího zkoumání.

### 7.3 NMR spektra

Vypočítaná NMR spektra z kapitoly 6.2 byla opět porovnána se spektry naměřenými Dr. Labutou (NIMS, Japonsko). Experimentálně změřená spektra jsou na obrázku 7.6. Spektra byla měřena se zvyšující se koncentrací kyseliny kafrsulfonové pro zajištění protonace porfyrinů.



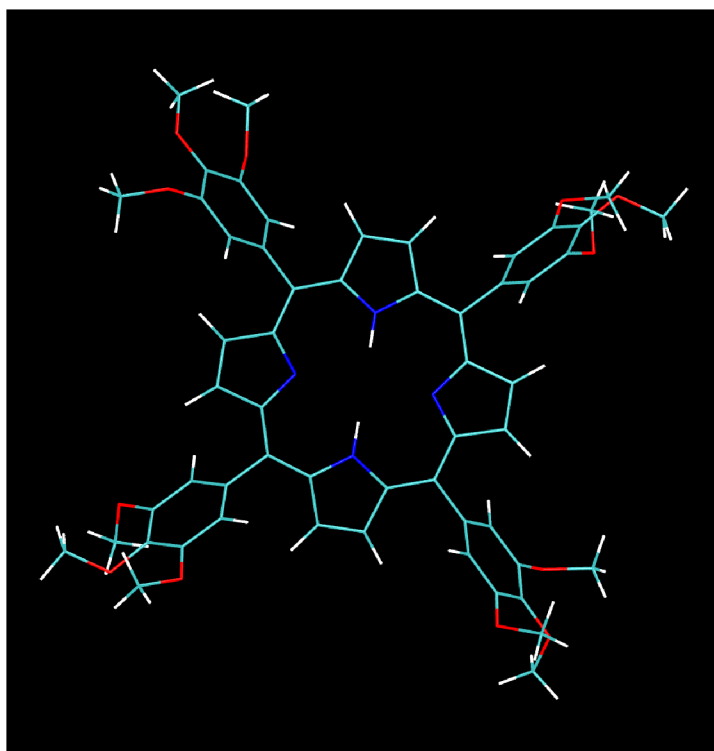
Obrázek 7.6: Experimentálně naměřená NMR spektra s různou koncentrací kyseliny kafrsulfonové (Dr. Labuta). Koncentrace se směrem nahoru zvyšuje.



Po srovnání vypočítaného spektra pro neutrální strukturu na obrázcích 6.2 a 6.3 s naměřeným spektrem na obrázku 7.6 je patrné, že spektra si vzájemně neodpovídají. Na spektru napočítaném Gaussianem se v oblasti 7 - 9 ppm vyskytuje jeden široký band, zatímco naměřená data zobrazují bandy dva – jeden přibližně v oblasti 7 ppm a druhý asi na 8,5 ppm. Vypočítané spektrum je příliš rozšířené a neodpovídá experimentálním hodnotám.

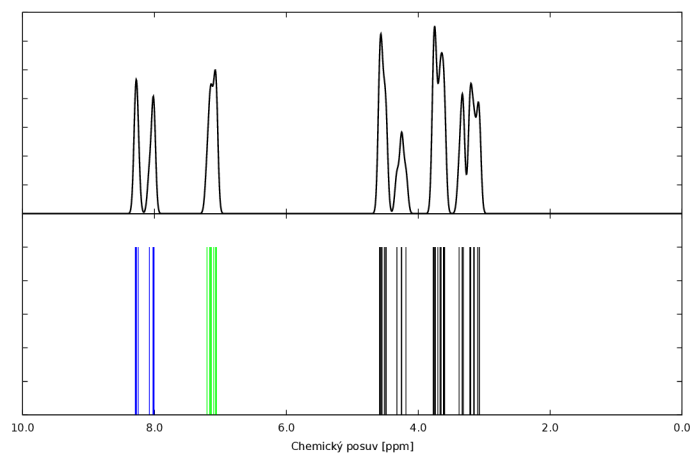
Rozdíl mezi spektry by mohla způsobit přítomnost kyseliny kafrsulfonové. Toto vysvětlení ovšem není přípustné pro neutrální strukturu. Její spektrum by mělo odpovídat naměřenému spektru při nulové koncentraci kyseliny.

Jak je již z obrázku 6.2 patrné, velký podíl na výsledném spektru mají alifatické řetězce. Je možné, že právě ony svými vibracemi způsobují zkreslení výpočtů. Proto byly provedeny další výpočty NMR spekter pro struktury bez těchto řetězců. Vizualizace takto oříznuté struktury bez alifatických řetězců je na obrázku 7.7.

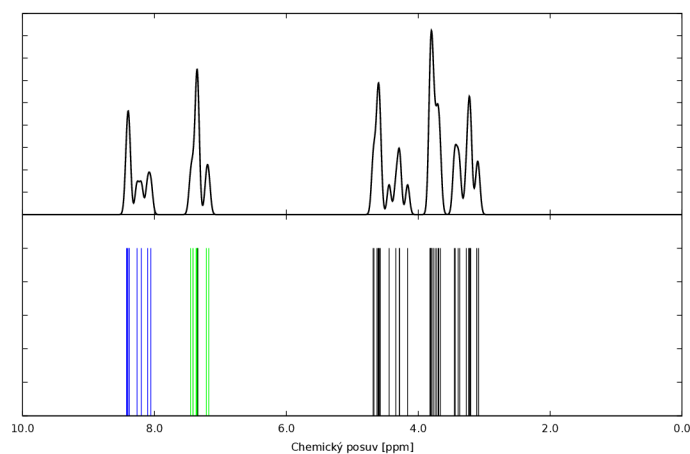


Obrázek 7.7: Vizualizace neutrální oříznuté struktury bez alifatických řetězců.

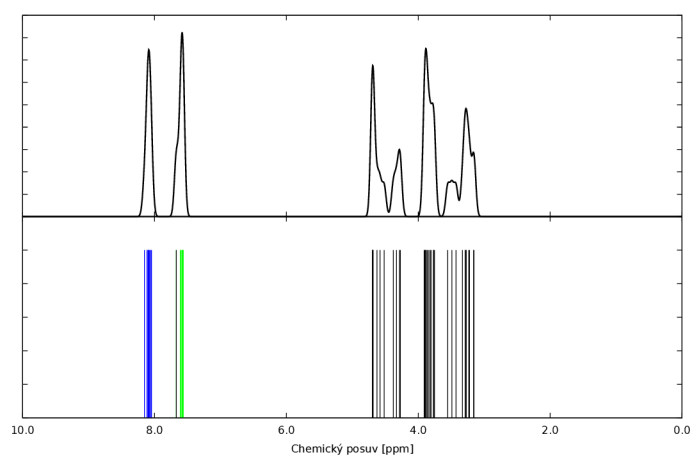
Spektra napočítaná na různě nabitých strukturách bez alifatických řetězců jsou vyobrazena na obrázku 7.8.



(a) neutrální



(b) 1<sup>+</sup>



(c) 2<sup>+</sup>

Obrázek 7.8: NMR spektra různě protonovaných struktur bez alifatických řetězců. Modře vykreslené polohy peaků jsou od vodíků navázaných na pyrolech, zeleně od vodíků navázaných na fenylech a černě od vodíků na methoxy skupinách.

Srovnáním poloh peaků vypočítaných spekter na struktuře bez alifatických řetězců s experimentálními spektry lze usoudit, že chyba výpočtů byla opravdu způsobena vibracemi řetězců. Na spektrech se zcela oddělují peaky způsobené vodíky na fenylových substituentech od vodíků navázaných přímo na porfyrinové jádro.

Na vypočítaných spektrech ovšem není patrné štěpení a posuny peaků při protonaci tak, jako je tomu v naměřených datech. K tomuto štěpení by mohl přispívat vznik dimerů v roztoku. Tato skutečnost je předmětem dalšího zkoumání.

## 8 Závěr

Tato bakalářská práce splnila všechny stanovené cíle, tedy

- rešerši simulačních metod pro popis organických molekul
- vytvoření počítačových modelů, jejich následnou parametrizaci, molekulární dynamiku a analýzy strukturních parametrů.
- výpočet optických a magnetických spekter, jejich porovnání s experimentálními daty a diskuze

Dosažené výsledky přinášejí vhled do experimentálních dat a pomáhají s jejich interpretací. Pomocí výpočtů byly přiřazeny jednotlivé části NMR spekter k různým skupinám vodíků, zatímco výpočty UV/VIS spekter jasně indikují vznik komplexů s kafrsulfonovou kyselinou. Objasnění detailů bude vyžadovat další výpočty, pro které byl vytvořen silný základ.

Práce měla pro mě také velký osobní přínos. Naučila jsem se základy práce s operačním systémem Linux včetně obsluhy základních simulačních softwarů a psaní na anglické klávesnici. Kromě těchto technických oblastí jsem měla příležitost vyzkoušet si práci na skutečném vědeckém projektu, kriticky přemýšlet nad jeho řešením a vyhodnocovat průběžné výsledky.

# Literatura

- [1] MURRAY, Robert K., et al. Harperova biochemie. Z angl. 23. vyd. přel. Lenka Fialová et. al. 4. vyd. v ČR. Praha: H & H, 2002. ix, 872 s. ISBN 80-7319-013-3.
- [2] LEWARS, E, 2004. *Computational Chemistry: Introduction to the Theory and Applications of Molecular and Quantum Mechanics*. 2nd edition. Kluwer Academic Publishers. ISBN 978-0-306-48391-2.
- [3] BEISER, Arthur a BRDIČKA, Miroslav. *Úvod do moderní fyziky*. Vydání překladu 2. Přeložil Josef ČADA. Praha: Academia, 1978.
- [4] PARR, Robert G. a Weitao YANG, 1989. Density - functional theory of atoms and molecules. New York: Oxford Univ. Press. ISBN 01-950-4279-4.
- [5] LEACH, Andrew R., 2001. *Molecular modelling: principles and applications*. 2nd edition. Harlow: Prentice Hall. ISBN 978-0-582-38210-7.
- [6] HUML, K. a J. VONDRÁŠEK, 2000. Tři přístupy k počítačovému modelování struktury a interakcí velkých molekul. *Materials Structure in Chemistry, Biology, Physics and Technology* [online]. 7(1), 10-15 [cit. 2024-02-07]. ISSN 1211 - 5894. Dostupné z: <https://www.xray.cz/ms/bul2000-1/huml.pdf>
- [7] IUPAC *Compendium of Chemical Terminology*, 3rd ed. International Union of Pure and Applied Chemistry; 2006. Online version 3.0.1, 2019. Dostupné z: <https://goldbook.iupac.org/terms/view/V06597>.
- [8] ATKINS, P. W. *Physical chemistry*. 5th ed. Oxford: Oxford University Press, 1994. ISBN 0-19-855730-2.

- [9] Wang, J., Cieplak, P., & Kollman, P. A. (2000). How well does a restrained electrostatic potential (RESP) model perform in calculating conformational energies of organic and biological molecules? *Journal of Computational Chemistry*, 21(12), 1049-1074. [https://doi.org/10.1002/1096-987X\(200009\)21:12<1049::AID-JCC3>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/1096-987X(200009)21:12<1049::AID-JCC3>3.0.CO;2-F)
- [10] Mark Abraham, Andrey Alekseenko, Cathrine Bergh, Christian Blau, Eliane Briand, Mahesh Doijade, Stefan Fleischmann, Vytautas Gapsys, Gaurav Garg, Sergey Gorelov, Gilles Gouaillardet, Alan Gray, M. Eric Irrgang, Farzaneh Jalalypour, Joe Jordan, Christoph Junghans, Prashanth Kanduri, Sebastian Keller, Carsten Kutzner, ... Erik Lindahl. (2024). GROMACS 2023.4 Manual (2023.4). Zenodo. <https://doi.org/10.5281/zenodo.10560024>
- [11] D.A. Case, H.M. Aktulga, K. Belfon, I.Y. Ben-Shalom, J.T. Berryman, S.R. Brozell, D.S. Cerutti, T.E. Cheatham, III, G.A. Cisneros, V.W.D. Cruzeiro, T.A. Darden, N. Forouzesh, G. Giambasu, T. Giese, M.K. Gilson, H. Gohlke, A.W. Goetz, J. Harris, S. Izadi, S.A. Izmailov, K. Kasavajhala, M.C. Kaymak, E. King, A. Kovalenko, T. Kurtzman, T.S. Lee, P. Li, C. Lin, J. Liu, T. Luchko, R. Luo, M. Machado, V. Man, M. Manathunga, K.M. Merz, Y. Miao, O. Mikhailovskii, G. Monard, H. Nguyen, K.A. O'Hearn, A. Onufriev, F. Pan, S. Pantano, R. Qi, A. Rahnamoun, D.R. Roe, A. Roitberg, C. Sagui, S. Schott-Verdugo, A. Shajan, J. Shen, C.L. Simmerling, N.R. Skrynnikov, J. Smith, J. Swails, R.C. Walker, J. Wang, J. Wang, H. Wei, X. Wu, Y. Wu, Y. Xiong, Y. Xue, D.M. York, S. Zhao, Q. Zhu, and P.A. Kollman (2023), Amber 2023, University of California, San Francisco.
- [12] NEZBEDA, Ivo, Jiří KOLAFKA a Miroslav KOTRLA, 2003. Úvod do počítačových simulací: metody Monte Carlo a molekulární dynamiky. 2. upr. vyd. Praha: Karolinum. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 80-246-0649-6.
- [13] Gijs Schaftenaar, 2018. Molden, Available at: <https://www3.cmbi.umcn.nl/molden/>.

- [14] Gaussian 16, Revision C.01, M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, X. Li, M. Caricato, A. V. Marenich, J. Bloino, B. G. Janesko, R. Gomperts, B. Mennucci, H. P. Hratchian, J. V. Ortiz, A. F. Izmaylov, J. L. Sonnenberg, D. Williams-Young, F. Ding, F. Lipparini, F. Egidi, J. Goings, B. Peng, A. Petrone, T. Henderson, D. Ranasinghe, V. G. Zakrzewski, J. Gao, N. Rega, G. Zheng, W. Liang, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, K. Throssell, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. J. Bearpark, J. J. Heyd, E. N. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, T. A. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. P. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, J. M. Millam, M. Klene, C. Adamo, R. Cammi, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, O. Farkas, J. B. Foresman, and D. J. Fox, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2016.
- [15] FILEFORMAT, 2024. FILEFORMAT [online]. [cit. 2024-03-05]. Dostupné z: <https://docs.fileformat.com/database/pdb/>
- [16] Humphrey, W., Dalke, A. and Schulten, K., "VMD - Visual Molecular Dynamics", J. Molec. Graphics, 1996, vol. 14, pp. 33-38.
- [17] JORGENSEN, William L., Jayaraman CHANDRASEKHAR a Jeffrey D. MADURA, 1983. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *The Journal of Chemical Physics*. **79**(2), 926-935.
- [18] ESSMANN, Ulrich, Lalith PERERA, Max L. BERKOWITZ, Tom DARDEN, Hsing LEE a Lee G. PEDERSEN, 1995. A smooth particle mesh Ewald method. *The Journal of Chemical Physics* [online]. 1995-11-15, 103(19), 8577-8593 [cit. 2024-04-07]. ISSN 0021-9606. Dostupné z: doi:10.1063/1.470117
- [19] The LINCS algorithm, 2023. In: *GROMACS Documentation, Release 2023.3* [online]. GROMACS development team, s. 375-377 [cit. 2024-04-04]. Dostupné z: <https://manual.gromacs.org/2023.3/manual-2023.3.pdf>.