



**MATEMATICKO-FYZIKÁLNÍ
FAKULTA**
Univerzita Karlova

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Bc. Pavol Šimko

**Počítačové modelování membránových
proteinů**

Fyzikální ústav UK

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Ivan Barvík, Ph.D.

Studijní program: Matematické a počítačové
modelování ve fyzice

Studijní obor: FMPMP

Praha 2022

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval(a) samostatně a výhradně s použitím citovaných pramenů, literatury a dalších odborných zdrojů. Tato práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

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

V dne

Podpis autora

V prvom rade by som sa veľmi pekne chcel poďakovať môjmu vedúcemu RNDr. Ivanovi Barvíkovi, Ph.D., za vedenie a pomoc pri vypracovaní tejto práce, bez ktorej by určite nebola v takej forme a rozsahu ako môže byť teraz.

Ďalej veľká vďaka patrí mojim rodičom, sestre a Veronike za trpezlivosť, pomoc a nesmiernu podporu, ktorú mi prejavovali počas môjho doterajšieho štúdia.

Výpočtové prostriedky boli zabezpečené pomocou projektu "e-Infrastruktura CZ" (e-INFRA CZ LM2018140) s podporou Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky.

Název práce: Počítačové modelování membránových proteinů

Autor: Bc. Pavol Šimko

Ústav: Fyzikální ústav UK

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Ivan Barvík, Ph.D., Fyzikální ústav UK

Abstrakt: Predkladaná práca sa zaoberá aplikáciou riadených molekulárne dynamických simulácií na medicínsky zaujímavé biomolekulárne systémy. Najprv boli otestované metódy určenia profilu voľnej energie na modelovom systéme $(Ala)_{10}$. Potom sme sa zamerali na určenie profilu voľnej energie pri väzbe ligandu do väzbového miesta adenosínového A_{2A} GPC receptora. Ďalej sme určovali profil voľnej energie spojený s tranzitom iónov cez modelový systém Gramicidínu A. A nakoniec sme túto metodiku aplikovali na iónový kanál TRPM2.

Klíčová slova: A_{2A} adenosínový receptor, TRP iónové kanály, Deca-alanín, Gramicidín A, molekulárne dynamické simulácie, riadená molekulárna dynamika

Title: Computational Modeling of Membrane Proteins

Author: Bc. Pavol Šimko

Institute: Institute of Physics

Supervisor: RNDr. Ivan Barvík, Ph.D., Institute of Physics

Abstract: The present work deals with the application of steered molecular dynamics simulations on medically interesting biomolecular systems. At first, methods for determining the free energy profile were tested on the $(Ala)_{10}$ model system. Then we focused on determining the free energy profile for binding of a ligand to the adenosine A_{2A} GPC receptor. We further studied the free energy profile associated with ion passage through the Gramicidin A ion channel. Finally, we applied this methodology to the TRPM2 ion channel.

Keywords: A_{2A} adenosine receptor, TRP ion channels, Deca-alanine, Gramicidin A, molecular dynamics simulations, steered molecular dynamics

Obsah

| | |
|--|-----------|
| Úvod | 4 |
| 1 Študované systémy | 6 |
| 1.1 Deca-Alanín | 6 |
| 1.2 A_{2A} adenosínový receptor | 7 |
| 1.3 Mechanizmus aktivácie A_{2A} receptoru | 10 |
| 1.4 Gramicidín A | 12 |
| 1.5 Iónový kanál TRPM2 | 13 |
| 1.6 Bunkové membrány | 14 |
| 2 Metodika | 17 |
| 2.1 Molekulárne dynamické simulácie | 17 |
| 2.1.1 Dynamika a vývoj systému | 17 |
| 2.1.2 Silové polia | 18 |
| 2.1.3 Simulácie v NVT súbore | 21 |
| 2.1.4 Simulácie v NPT súbore | 22 |
| 2.1.5 Elektrostatické interakcie | 25 |
| 2.2 Riadená molekulárna dynamika | 26 |
| 2.2.1 Stiff spring aproximácia | 27 |
| 2.3 Metódy výpočtu voľnej energie | 29 |
| 2.3.1 Jarzynskéhoho identita a jej kumulanty | 30 |
| 2.3.2 Crooksov fluktuačný teorém | 34 |
| 2.3.3 Metóda prieniku histogramov | 37 |
| 2.3.4 FR metóda | 40 |
| 2.3.5 Delenie simulácií na intervaly | 41 |
| 3 Ciele práce | 43 |
| 4 Technické detaily | 44 |
| 5 Výsledky | 45 |
| 5.1 Deca-alanín vo vákuu | 45 |
| 5.1.1 Dopredné simulácie | 45 |
| 5.1.2 Spätné simulácie | 51 |
| 5.1.3 FR metóda | 54 |
| 5.1.4 Metóda prieniku histogramov | 56 |
| 5.1.5 Delenie trajektórií na podintervaly | 59 |
| 5.1.6 Zhrnutie a diskusia | 61 |

| | | |
|-------|---|------------|
| 5.2 | Deca-alanín vo vodnej obálke | 62 |
| 5.2.1 | Dopredné simulácie | 63 |
| 5.2.2 | Spätné simulácie | 68 |
| 5.2.3 | FR metóda | 70 |
| 5.2.4 | Metóda prieniku histogramov | 72 |
| 5.2.5 | Delenie trajektórií na podintervaloch | 73 |
| 5.2.6 | Zhrnutie a diskusia | 76 |
| 5.3 | A_{2A} adenosínový receptor | 78 |
| 5.3.1 | Simulácie na jednom intervale | 80 |
| 5.3.2 | Simulácie na 10 podintervaloch | 82 |
| 5.3.3 | Rotácia A_{2A} receptoru | 87 |
| 5.3.4 | Obmedzenie pohybu ligandu v rovine xy | 88 |
| 5.3.5 | <i>His</i> – <i>Glu</i> solný mostík | 89 |
| 5.3.6 | Zhrnutie a diskusia | 90 |
| 5.4 | Gramicidín A | 93 |
| 5.4.1 | Delenie na 2 intervaly a $S_{mem} = 50 \times 50 \text{ \AA}^2$ | 95 |
| 5.4.2 | Delenie na 2 intervaly a $S_{mem} = 72 \times 72 \text{ \AA}^2$ | 97 |
| 5.4.3 | Delenie na 2 intervaly a $S_{mem} = 72 \times 72 \text{ \AA}^2$ - 10x10 trajektórií | 100 |
| 5.4.4 | Delenie na 10 intervalov a $S_{mem} = 72 \times 72 \text{ \AA}^2$ | 101 |
| 5.4.5 | Aproximácia rovnovážneho priebehu | 102 |
| 5.4.6 | Zhrnutie a diskusia | 103 |
| 5.5 | Iónový kanál TRPM2 | 105 |
| 5.5.1 | Dopredné a spätné simulácie | 107 |
| 5.5.2 | FR metóda | 108 |
| 5.5.3 | Metóda prieniku histogramov | 108 |
| 5.5.4 | Vlastnosti získaných aproximácií | 109 |
| 5.5.5 | Zhrnutie a diskusia | 111 |
| | Záver | 112 |
| | Zoznam použitej literatúry | 114 |
| | Zoznam obrázkov | 123 |
| | Zoznam tabuliek | 129 |
| | Zoznam použitých symbolov a skratiek | 130 |
| | A Parametrizácia adenosínu pomocou Force field Toolkitu | 135 |
| | A.1 Voľba počiatočnej štruktúry | 135 |
| | A.2 Optimalizácia geometrie | 136 |

| | | |
|----------|---|------------|
| A.3 | Optimalizácia nábojového rozdelenia | 138 |
| A.4 | Optimalizácia väzbových a uhlových parametrov | 142 |
| A.5 | Optimalizácia dihedrálov | 143 |
| B | Stiff-spring aproximácia | 149 |
| B.1 | Odvodenie stiff-spring aproximácie | 149 |
| B.2 | Stiff-spring aproximácia pre $(Ala)_{10}$ | 150 |
| C | Jensenova-Shannonova divergencia | 152 |
| D | Tabuľky | 153 |
| D.1 | Zoznam PDB štruktúr A_{2A} adenosínového receptoru | 153 |
| E | Grafy a obrázky | 155 |
| E.1 | Testovacia simulácia $(Ala)_{10}$ pre malú simulačnú bunku | 155 |
| E.2 | Vývoj ΔF dopredných simulácií $(Ala)_{10}$ vo vákuu | 156 |
| E.3 | Vývoj ΔF spätných simulácií $(Ala)_{10}$ vo vákuu | 158 |
| E.4 | FR metóda pre $(Ala)_{10}$ vo vákuu | 161 |
| E.5 | Metóda prieniku histogramov pre $(Ala)_{10}$ vo vákuu | 164 |
| E.6 | Vývoj ΔF dopredných simulácií $(Ala)_{10}$ vo vodnej obálke | 166 |

Úvod

Významné pokroky dosiahnuté v oblasti medicíny, chémie, kryštalografie, cryo-elektrónovej mikroskopie a výpočtovej techniky umožňujú cielene sa zamerať na molekulárnu podstatu niektorých závažných chorôb a hľadať efektívne spôsoby ako ich liečiť. Vďaka uvedeným pokrokom dokážeme skúmať membránové proteíny, ktoré hrajú zásadnú úlohu vo fungovaní buniek. Sprostredkovávajú interakciu a látkovú výmenu medzi bunkou a jej prostredím a je na nich zameraná viac než polovica súčasných liekov.

Vďaka pokrokom v röntgenovej kryštalografii sa behom poslednej dekády objavila v tzv. Proteínovej Databanke (www.rcsb.org) rada štruktúr receptorov spriahnutých s G-proteínmi (G-protein coupled receptors - ďalej GPC receptory), ktoré tvoria najväčšiu rodinu proteínov v našom genóme (cca. 800 z 20000). Sú spojené s vnímaním bolesti alebo dokonca čuchu, zraku či chuti. Zároveň sú dôležité aj z medicínskeho hľadiska, konkrétne majú vplyv na priebeh Parkinsonovej choroby, alebo na kardiovaskulárny a imunitný systém (lieky, ktoré ich zacieli mali protizápalový efekt). Aktuálne sa na GPC receptory zameriava približne tretina dostupných liekov [1–3].

Ďalším rovnako významným typom membránových proteínov sú membránové kanály, sprostredkovávajúce výmenu látok medzi bunkou a jej prostredím. A to od iónov až po sacharidy, aminokyseliny alebo dokonca antibiotiká. Vďaka nedávnym pokrokom v cryo-elektrónovej mikroskopii, ktorá približne od roku 2015 poskytuje výsledky porovnateľné s röntgenovou kryštalografiou, sa v Proteínovej Databanke objavila rada štruktúr TRP kanálov (tzv. Transient Receptor Potential channels). Tie sa podieľajú na vnímaní tepla, bolesti a zmyslových podnetov a to práve pomocou výmeny iónov medzi bunkou a jej okolím. Dôsledkom stimulácie TRP kanálov je napríklad pocit pálenia pri kontakte s kapsaicínom, alebo pocit chladu pri kontakte s mentolom [4].

Zvýšená dostupnosť kvalitných štruktúr medicínsky zaujímavých biomolekúl a vysoko výkonných linuxových výpočtových klastrov (skladajúcich sa zo stoviek špecializovaných grafických kariet a tisícok vysoko výkonných procesorov) otvorila cestu k budovaniu rýchlych a dostupných metód počítačového modelovania. Vďaka nemu sme získali silný nástroj k pochopeniu životne dôležitých procesov, prebiehajúcich na atomárnej úrovni a to z pohľadia našich pracovní. Teraz môžeme realizovať a študovať počítačové experimenty, ktoré by za normálnych okolností stáli veľa času a prostriedkov, prípadne by v štandardnom prevedení boli len veľmi ťažko uskutočniteľné.

V tejto práci otestujeme v prostredí super-počítačového strediska MetaCentrum (metavo.metacentrum.cz) metodiku takzvaných riadených molekulárne dy-

namických simulácií (Steered Molecular Dynamics - ďalej SMD), ktorá umožňuje urobiť odhad rovnovážnej voľnej energie na základe veľkého počtu krátkych nerovnovážnych SMD simulácií realizovaných paralelne. Táto metóda je z nášho pohľadu zatiaľ trochu nedocenená [5].

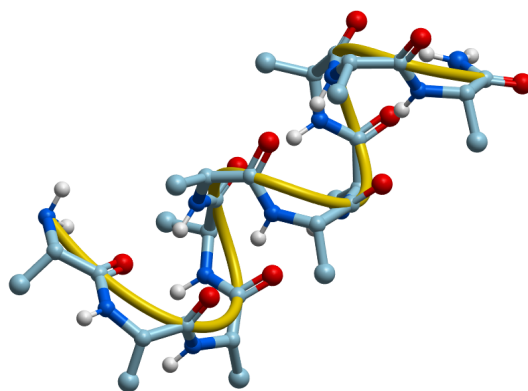
Najprv SMD simulácie otestujeme na modelových systémoch $(Ala)_{10}$ a Gramicidínu A. Potom sa budeme venovať štúdiu adenosínového A_{2A} GPC receptoru a určenie profilu voľnej energie pri väzbe ligandu. Ďalšou časťou tejto práce bude určenie profilu voľnej energie spojenej s tranzitom iónov TRPM2 kanálom v jeho otvorenom a uzavretom stave. Získané výsledky budeme diskutovať z hľadiska možností ich využitia v rámci dlhodobej spolupráce FU MFF UK s FgU AVČR a FNHK smerujúcej k racionálnemu dizajnu nových liekov proti bolesti.

1. Študované systémy

1.1 Deca-Alanín

Prvým z nami študovaných systémov bol modelový systém Deca-Alanínu, alebo skrátene $(Ala)_{10}$. Ako vyplýva z jeho názvu, táto molekula je oligopeptidom, zloženým z 10 alanínových reziduí. Celkovo sa skladá z 104 atómov, ktoré za pokojovej teploty vo vákuu tvoria α -helikálnu konfiguráciu. Dĺžka výsledného helixu v smere osi z zodpovedá 13 Å [6–8]. V prípade, že sa tento peptid vyskytuje vo vodnej obálke, môže prechádzať medzi α -helikálnym usporiadaním a neusporiadanou cievkou. Tento prechod pozorujeme aj v prípade simulácií vo vákuu, podrobením systému externej sile [8, 9].

Štruktúra α -helikálneho usporiadania $(Ala)_{10}$, ktorá bola základom našich simulácií je zobrazená na obrázku (1.1).



Obr. 1.1: Štruktúra Deca-Alanínu

V niektorých prácach bola použitá acetylácia N -terminusu a amidácia C -terminusu (v tejto práci ich neuvažujeme) [10].

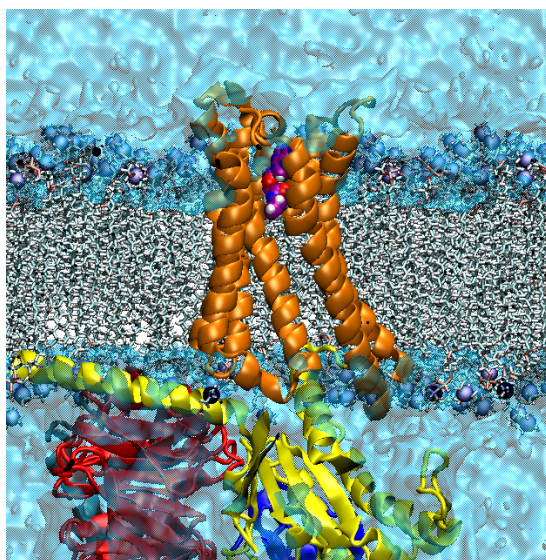
Napriek tomu, že veľkosť tohto systému je oproti komplexite reálnych systémov len zanedbateľná, predstavuje $(Ala)_{10}$ v kontexte simulácií objekt veľkého záujmu. Konkrétne sa často používa ako modelový systém pre otestovanie nových prístupov a metodík, respektíve v kontexte štúdia zbalovania a rozbalovania proteínov, kde reprezentuje síce jednoduchý, ale dôležitý model [8, 11, 12].

1.2 A_{2A} adenozinový receptor

Postupy a metódy odladené pomocou $(Ala)_{10}$ budeme následne aplikovať na systém A_{2A} adenozinového receptora v komplexe s vopred zvoleným ligandom. V prílohe (D.1) uvádzame zoznam aktuálne dostupných štruktúr spojených s týmto receptorom.

A_{2A} adenozinový receptor (ďalej už len A_{2A} receptor) je jedným zo skupiny receptorov reagujúcich na molekulu adenosínu, konkrétne A_1 , A_{2A} , A_{2B} a A_3 . Tieto receptory sú podtriedou takzvaných GPC receptorov, alebo aj G-protein coupled receptors. GPC receptory sú z medicínskeho pohľadu veľmi významné, keďže sa vo výraznej miere nachádzajú v mozgu, kardiovaskulárnom a imunitnom systéme [3, 13].

Ich základným motívom je sedem transmembránových helixov sprostredkávajúcich interakciu bunky s okolím, respektíve medzi bunkami navzájom. Štruktúru A_{2A} receptora (vyznačeného oranžovou farbou) obklopeného vodným prostredím a bunkovou membránou uvádzame na obrázku (1.2).



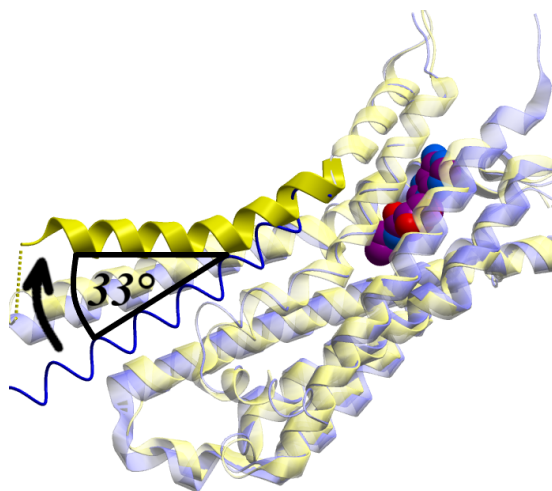
Obr. 1.2: Štruktúra A_{2A} adenozinového receptora (6GDG)

Vo väzbovom mieste dochádza k naviazaniu agonistu NECA (označeného fialovou farbou) [1, 2, 14]. V intracelulárnej časti pozorujeme naviazanie mini- G_S heterotrimeru, ktorý je syntetickým analógom G-proteínov a ktorý bol použitý pri určovaní tejto štruktúry. Štruktúra zobrazená na obrázku (1.2) je vzhľadom na prítomnosť mini- G_S heterotrimeru a agonistu NECA plne aktívnym stavom.

Štandardnou klasifikáciou ligandov sprostredkovávajúcich interakciu a následnú kaskádu vnútrobunkových procesov je delenie podľa odozvy po naviazaní na receptor. Konkrétne hovoríme o agonistoch (vyvolanie biologickej odozvy), čiastočných agonistoch (čiastočná aktivácia biologických procesov), antagonistoch (nedochádza k žiadnej odozve) a inverzných agonistoch, ktoré redukujú bazálnu aktivitu receptora pod hodnotu pozorovanú bez naviazania. Špeciálnou skupinou sú takzvaní zaujatí agonisti, vďaka ktorým dochádza k zaujatiu konformácie sprostredkovávajúcej aktiváciu niektorých špecifických biologických procesov. Posledná skupina je významnou z farmaceutického hľadiska, napríklad v kontexte nových druhov analgetík [1, 2].

Naviazanie ligandu predstavuje časovo a štrukturálne náročný proces trvajúci aj niekoľko μ s. Počas tohto procesu musí ligand prekonať niekoľko potenciálových bariér. Pričom, ako bolo ukázané v práci [15] najväčšia bariéra je spojená s prechodom ligandu do takzvaného mimobunkového vestibulu, ktorý je spojený s veľkou mierou dehydratácie (ako aj ligandu, tak aj receptora).

Malé štrukturálne zmeny vo väzbovom mieste GPC receptora po naviazaní agonistu sa prenášajú do značných posunov α -helixov vo vnútri bunky čím umožňujú naviazanie G-proteínu. Porovnanie aktívnej a neaktívnej štruktúry s naznačením posunu transmembránového helixu H6 o $\approx 33^\circ$ [14] vidíme na obrázku (1.3).

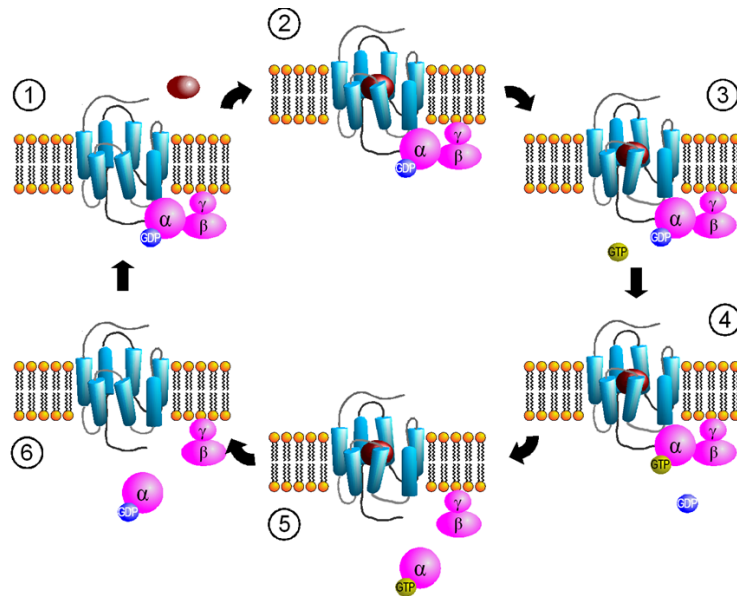


Obr. 1.3: Aktívny vs. neaktívny stav A_{2A} adenosínového receptora

Tieto zmeny, sprevádzané väzbou G-proteínu, stabilizujú aktívny stav receptora. Viazanie na G-proteín je nutnosťou, pretože samotný receptor vďaka svojej flexibilitě prechádza spektrom rôznych nízkoenergetických konformácií (čo je zodpovedné aj za jeho bazálnu aktivitu) a samotné naviazanie ligandu bez väzby na

G-proteín len zvýši jeho dynamickosť (pričom výsledná konformácia bude blízko neaktívnej) [1, 16]. V prípade výskytu niektorých špecifických mutácií môžeme pozorovať dlhodobé zaujatie aktívneho stavu receptora aj počas absencie agonistu. Bolo ukázané, že práve tieto štrukturálne zmeny sú zodpovedné za širokú škálu chorôb (jedným z príkladov je nočná slepota) [2].

Cyklus aktivácie A_{2A} receptora s následnou kaskádou vnútrobunkových procesov schematicky zobrazujeme na obrázku (1.4).

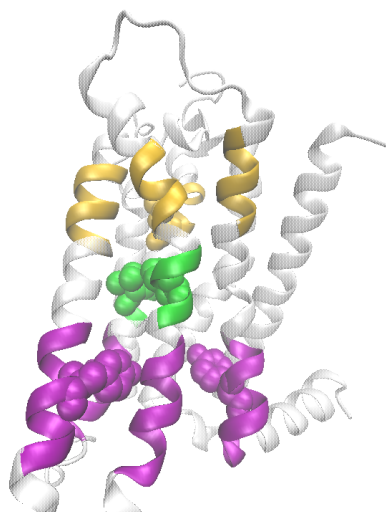


Obr. 1.4: Mechanizmus signalizácie GPC receptorom [17]

V prvom kroku dochádza k naviazaniu ligandu do väzbového miesta receptora. To má za následok štrukturálne zmeny daného proteínu, ktoré ovplyvnia štruktúru G-proteínu. Zmena štruktúry G-proteínu vedie k výmene GDP (Guanozín-difosfát) za GTP (Guanozín-trifosfát). Táto molekula predstavuje energetický zdroj jeho G_{α} podjednotky, ktorá sa v piatom kroku oddelí do cytosolu a iniciuje vnútrobunkové procesy (zvýšenie hladiny cAMP). Vnútrobunkové procesy môžu byť aktivované aj pomocou G_{β} a G_{γ} podjednotiek, tie sú ale obmedzené len na prostredie bunkovej membrány. V poslednom kroku dochádza k hydrolýze GTP na GDP pôsobením G_{α} podjednotky a k rekombinácii všetkých troch podjednotiek. Medzitým dochádza k uvoľneniu ligandu z väzbového miesta receptora v dôsledku zmeny afinity väzby oddelením G-proteínu [3, 4].

1.3 Mechanizmus aktivácie A_{2A} receptoru

A_{2A} adenosínový receptor môžeme v kontexte štrukturálnych zmien v dôsledku naviazania ligandu rozdeliť na tri hlavné časti zobrazené na obrázku (1.5).



Obr. 1.5: Konformačne významné oblasti A_{2A} adenosínového receptoru

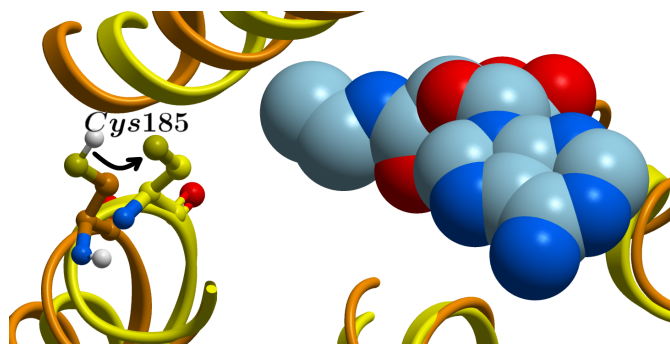
Na väzbové miesto ligandu (zlatá farba), väzbové miesto G-proteínu (fialová) a na takzvanú spojovaciu oblasť (zelená), nachádzajúcu sa medzi nimi.

V každej z týchto častí sme schopní identifikovať kľúčové aminokyseliny vykazujúce výrazné konformačné zmeny a teda zodpovedné za aktiváciu receptora, pričom budeme postupovať na základe analógie s prácou Dror et al. (2011) [16] uvažujúcej β_2 -adrenergický receptor. Tento systém tiež patrí medzi GPC receptory a jeho štruktúra je veľmi podobná nami uvažovanému systému.

Obrázky (1.6) až (1.8) uvádzajú konformačne najvýznamnejšie časti vyššie uvedených oblastí. V každom z týchto vyobrazení uvádzame aktívnu a neaktívnu konfiguráciu získanú z proteínovej databanky pod PDB kódmi 6GDG a 6JZH. Okrem jednotlivých α -helixov zobrazujeme aj aminokyseliny, zodpovedné za zmenu ich konformácie (väzbové miesto ligandu), respektíve ktoré podliehali výraznej zmene konfigurácie (spojovacia oblasť a väzbové miesto G-proteínu). Poznamenajme, že vodíky, prítomné v neaktívnej konfigurácii sa v .pdb súbore obsahujúcom aktívnu konfiguráciu nenachádzali, kvôli čomu na ďalších obrázkoch nie sú zobrazené.

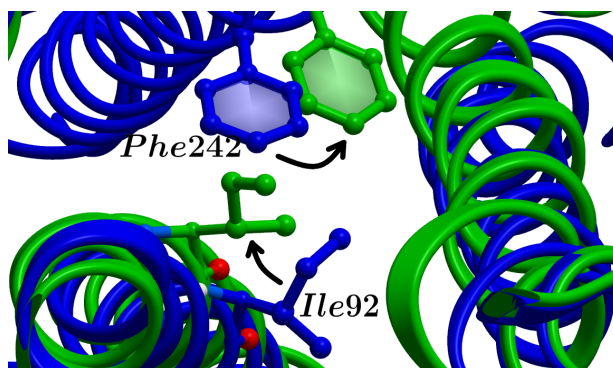
V prípade väzbového miesta ligandu dochádza k výraznej zmene konformácie aminokyseliny cysteínu 185. Konkrétne vidíme, že dochádza k priblíženiu tejto aminokyseliny k ligandu NECA. Táto malá zmena vo väzbovom mieste (zmena polohy atómu síry o 2.81 Å) spôsobí synchronný globálny pohyb α -helixu H5 na intracelulárnej strane receptora so zmenu uhla o veľkosti $\approx 8^\circ$. To vzhľadom na

dĺžku daného helixu odpovedá pohybu niektorých aminokyselín aj o $\approx 10 \text{ \AA}$.



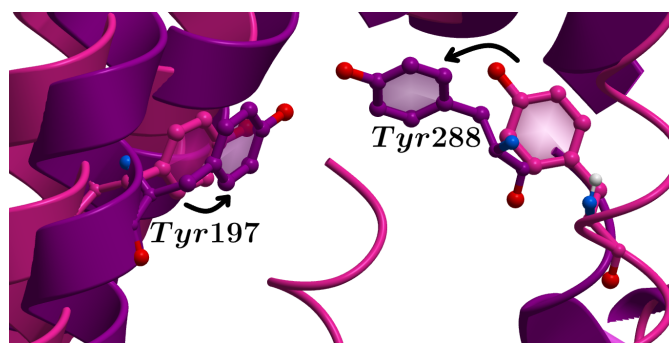
Obr. 1.6: Zmena konformácie väzbového miesta ligandu (*Cys185*)

Na obrázku (1.7) zobrazujúcom spojovaciu oblasť uvádzame aminokyseliny fenylalanínu 242 a izoleucínu 92, ktorým sa v tejto časti dajú prisúdiť najväčšie konformačné zmeny, respektíve najväčší príspevok ku globálnym konformačným zmenám receptora. Na tomto obrázku vidíme posun izoleucínu 92, ktorý následne indukuje posun aromatického kruhu fenylalanínu, vďaka čomu dochádza ku globálnemu pohybu helixu H6 (uvádzaného na obrázku (1.3)) a zmene uhla o veľkosti $\approx 33^\circ$. Tento posun je jednou z najväčších zmien pri prechode receptora medzi aktívnou a neaktívnou konformáciou.



Obr. 1.7: Zmena konformácie spojovacej oblasti (*Phe242* a *Ile92*)

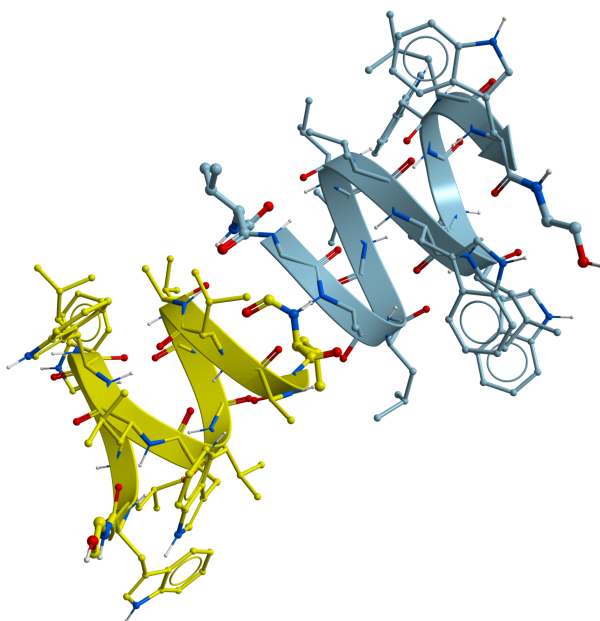
Dôsledkom vyššie uvedených štrukturálnych zmien je značná rotácia aminokyselín tyrozínu 197 a 288 vo väzbovom mieste G-proteínu. Konkrétne v prípade aminokyseliny tyrozínu 288 pozorujeme rotáciu o $\approx 18^\circ$.



Obr. 1.8: Zmena konformácie väzbového miesta G-proteínu (*Tyr197* a *Tyr288*)

1.4 Gramicidín A

Potom sa zameriame na modelový systém bakteriálneho pôvodu, konkrétne na Gramicidín A. Táto štruktúra s dĺžkou ≈ 26 Å a šírkou $\approx (4 - 5)$ Å je najmenším iónovým kanálom, schopným transportovať ióny bunkovou membránou. V membráne tvorí dimér prechádzajúci lipidovou dvojvrstvou (1.9) [18].



Obr. 1.9: Štruktúra Gramicidínu A

Uvádžame aj sekvenciu jedného z jeho helikálnych monomérov (farebné označenie zodpovedá editoru CINEMA [19]) [6, 18]

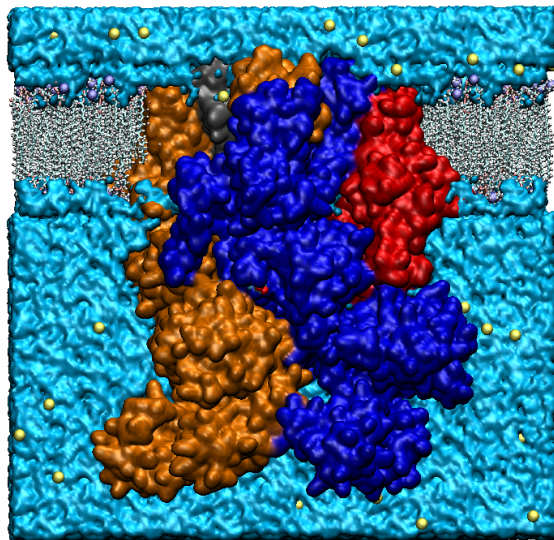
FVA | G | A | DLE | A | DVA | V | DVA | W | DLE | W | DLE | W | DLE | W | ETA

Z farmaceutického hľadiska má využitie ako antibiotikum, kedy sfomovaním kanálu v bunkovej membráne a difúziou častíc K^+ a Na^+ dochádza k narušeniu prirodzených koncentrácií vo vnútri bunky a jej uhynutiu (napríklad kvôli neschopnosti tvoriť ATP (adenozín trifosfát) v mitochondriách). Dimerizácia kanálu je reverzibilná, pričom prechod iónov kanálom je umožnený približne po dobu ≈ 1 s [20, 21].

Selektivita je zabezpečená orientáciou elektronegatívnych kyslíkových atómov kostry helixu. Tie odpudzujú anióny a umožňujú prechod kationom. Okrem toho sa v ňom nachádzajú molekuly vody (≈ 6), ktorých konfigurácia zabezpečuje stabilizáciu pohybu katiónov [22, 23].

1.5 Iónový kanál TRPM2

Posledným zo systémov, ktorým sa v tejto práci budeme zaoberať je iónový kanál TRPM2 (respektíve transient receptor potencial melastatin 2 ion channel). Štruktúru TRPM2 v prípade otvorenej konformácie, vlozenej do fragmentu bunkovej membrány, vo vodnom prostredí a za prítomnosti sodíkových iónov uvádzame na obrázku (1.10).



Obr. 1.10: Reprezentácia TRPM2 iónového kanálu (6DRJ)

Ako vyplýva z názvu, TRPM2 prislúcha do rodiny TRP kanálov, ktoré majú v organizme významnú biologickú úlohu (ako sme uviedli aj v úvode). Konkrétne

bolo ukázané, že TRPM2 zohráva úlohu vo vylučovaní inzulínu. Ďalej sa predpokladá, že má konexiu s autozápalovými ochoreniami a vplýva aj na priebeh Alzheimerovej choroby. Zároveň sa jeho vysoké koncentrácie našli aj v nádorových bunkách. Okrem týchto neprijemných vplyvov je zodpovedný za vnímanie tepla v oblasti 33 – 38 °C (teda za reguláciu telesnej teploty) [24–29].

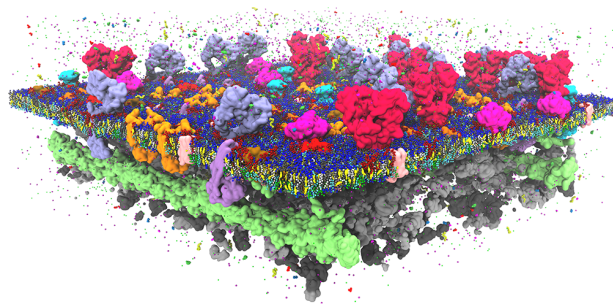
Základným motívom všetkých členov siedmich podskupín rodiny TRP kanálov (u cicavcov) je membránová topológia 4 identických podjednotiek, tvorených šiestimi α -helixami. K výraznejším odlišnostiam v sekundárnej štruktúre dochádza až v oblastiach intracelulárneho *N* a *C*-terminusu zodpovedných za registrovanie širokej škály intracelulárnych podnetov (teda za škálu funkčne dôležitých interakcií) [30]. Tertramérne podjednotky pozostávajú zo štyroch helixov patriacich do takzvanej napäťovo citlivej domény (voltage-sensing domain, resp. VSD). Tento širokospektrálne zaužívaný názov znamená citlivosť na zmeny napätia len v niektorých prípadoch. Zvyšné dva helixy sú zodpovedné za vytvorenie oblasti póru, kde môže dochádzať k toku iónov kanálom. V tejto štruktúre sa nachádza takzvaný filter selektivity (zodpovedný za špecificitu kanálu) a spodná brána. Tá sa je v prípade TRPM2 definovaná glutanímom 1068 a v otvorenom stave má priemer 2.6 Å (v zavretom stave zase 1.0 Å) [30, 31].

TRPM2 kanál je aktivovaný vnútornými intracelulárnymi signalizáciami. Konkrétne k jeho otvoreniu dochádza naviazaním ADP-ribózy (uvoľňovanej pri oxidatívnom strese a metabolických procesoch), spolu s naviazaním intracelulárneho sodíku Ca^{2+} . Po otvorení neprejavuje žiadnu selektivitu voči katiónom (voči aniónom je nepriepustný), ale štandardne jeho aktivácia vedie k zníženiu elektrochemického gradientu sodíkových iónov [4, 32–34].

Výmena sodíkových iónov následne aktivuje sekundárne bunkové procesy. Jedným z možných efektov je šírenie lokálnej depolarizácie bunkovej membrány sériou napäťovo ovládaných sodíkových a draslíkových iónových kanálov povrchom axónu nervových dráh. Tento efekt vedie k aktivácií napäťovo riadených vápnikových iónových kanálov, ktoré pôsobia ako sekundárne prenášače signálu a vyvolajú uvoľnenie acetylcholínu. Ten spúšťa rovnaký proces v nasledujúcom axóne. Tento proces zabezpečuje šírenie počiatočného vzruchu (spôsobeného aktiváciou TRP iónového kanálu) cez nervové dráhy až do mozgu, kde sa vyhodnotí [4].

1.6 Bunkové membrány

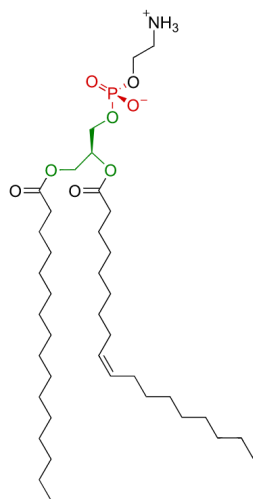
Bunkové membrány zohrávajú vo fungovaní bunky kľúčovú úlohu. Okrem toho, že oddeľujú vnútrobunkové prostredie od jej okolia, obsahujú veľké množstvo proteínov zásadných pre správne fungovanie a komunikáciu bunky (ako ukazuje obrázok (1.11)) [35].



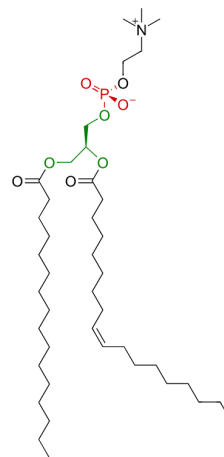
Obr. 1.11: Ilustračný obrázok komplexného modelu bunkovej membrány [35]

Z hľadiska mobility lipidov pozorujeme významný laterálny pohyb v dvojvrstve, previazaný s pohybom proteínov. Prechody lipidov medzi vrstvami sú menej časté v dôsledku energetickej bariéry pochádzajúcej z hydrofóbne-polárnej štruktúry týchto molekúl [36]. V prípade reálnych systémov môžeme hovoriť o stovkách rôznych lipidových typov, ktoré rôznym spôsobom vplyvajú na aktivitu okolitých proteínov. Simulácie zameriavajúce sa na vplyv zloženia bunkovej membrány sa z toho dôvodu vyznačujú vysokou komplexitou.

V našom prípade nebol počas simulácií vplyv membrány až taký zásadný (z dôvodu prirodzenej, respektíve vynútenej rigidity systémov, alebo ich nízkej komplexity). Vďaka tomu sme sa obmedzili na dve základné kompozície, konkrétne na POPC (fosfatidylcholín) a na POPE (fosfatidyletanolamín) lipidy zakomponované v programe QwikMD [37]. Štruktúru spomínaných lipidov uvádzame na obrázkoch (1.12) a (1.13).



Obr. 1.12: Fosfatidyletanolamín (POPE) [38]



Obr. 1.13: Fosfatidylcholín (POPC) [38]

Okrem rozdielu v polárnej hlavičke je zásadným rozdielom ich charakteristická oblasť výskytu. Lipidy typu POPC štandardne pozorujeme na oboch stranách bunkovej membrány. Na druhej strane, výskyt lipidov typu POPE je obmedzený na cytoplazmatickú stranu membrány [39].

2. Metodika

2.1 Molekulárne dynamické simulácie

Motiváciou k použitiu molekulárne dynamických simulácií na štúdium biologických systémov je ich schopnosť hodnoverne zachytiť dynamické procesy. Proteíny podstupujú vo fyziologickom prostredí veľké štrukturálne zmeny. Tieto zmeny nie je možné študovať pomocou klasických kryštalografických metód, kedy štandardne dokážeme získať len štruktúru počiatočného a finálneho stavu.

Ďalšou nemenej významnou motiváciou je možnosť rýchleho dizajnu a otestovania ligandov viažucich sa na študovaný systém. V tomto prípade vieme efektívnym spôsobom určiť najlepších kandidátov na nové liečivá bez toho, aby sme ich museli náročne a drahô syntetizovať. Až pár najlepších ligandov je následne nasyntetizovaných a otestovaných v reálnych experimentoch.

2.1.1 Dynamika a vývoj systému

V prípade molekulárne dynamických simulácií predpokladáme klasický vývoj skúmaného systému. To znamená, že dynamika podlieha Newtonovým pohybovým rovniciam [40]:

$$\dot{\mathbf{r}}_{\alpha} = \frac{\mathbf{p}_{\alpha}}{m_{\alpha}}, \quad \alpha = 1, 2, \dots, N \quad (2.1)$$

$$\dot{\mathbf{p}}_{\alpha} = -\nabla_{\mathbf{r}_{\alpha}} E_{total}(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \dots, \mathbf{r}_N), \quad \alpha = 1, 2, \dots, N \quad (2.2)$$

m_{α} označuje hmotnosť jednotlivých atómov so súradnicami \mathbf{r}_{α} a hybnosťami \mathbf{p}_{α} . E_{total} je potenciál, ktorého pôsobeniu sú tieto atómy vystavené. Konkrétne tvaru tohto potenciálu sa budeme venovať v kapitole (2.1.2).

Teoreticky by bolo možné tento systém vyvíjať aj pomocou kvantovo mechanického prístupu, vďaka čomu by sme dostali presnejšie výsledky. Avšak, výpočtové náklady, s tým spojené, by boli z hľadiska dnes dostupných technológií neúnosné.

Z numerického hľadiska systém vyvíjame pomocou takzvaného Verletovho integrátora. Ten predstavuje jednoduchý iteratívny algoritmus, ktorý vo svojich prácach používal už Newton a znovuobjavil ho Verlet v 60. rokoch minulého storočia. Jeho výhodou je výpočtová nenáročnosť a symplektickosť. Počas jedného kroku tohto algoritmu je nutné určiť sily, ktoré pôsobia na daný systém (najnáročnejší krok) len jeden krát. To je výrazná výhoda napríklad oproti Runge-Kuttovým metódam vyššieho rádu, ktoré potrebujú niekoľko takýchto vyhodnotení [40].

Na druhej strane symplektickosť zase zabezpečuje, že systém je počas celej simulácie vyvíjaný pomocou Hamiltonovskej mechaniky. Vďaka tomu dochádza len k malej akumulácii chýb, ktoré sú dôsledkom diskrétného vývoja systému. Zároveň máme zaručené, že počas NVE simulácií bude dochádzať k zachovaniu energie, respektíve k zachovaniu fázového objemu [40].

n-tý krok tohto algoritmu (pre $\alpha = 1, 2, \dots, N$) vyjadrujú vzťahy [41]:

$$\mathbf{p}_\alpha^{n+1/2} = \mathbf{p}_\alpha^n + \frac{\Delta t}{2} \mathbf{F}_\alpha^n \quad (2.3)$$

$$\mathbf{r}_\alpha^{n+1} = \mathbf{r}_\alpha^n + \frac{1}{m_\alpha} \mathbf{p}_\alpha^{n+1/2} \Delta t \quad (2.4)$$

$$\mathbf{F}_\alpha^{n+1} = -\nabla_{\mathbf{r}_\alpha^{n+1}} E_{total}(\mathbf{r}_1^{n+1}, \mathbf{r}_2^{n+1}, \dots, \mathbf{r}_N^{n+1}) \quad (2.5)$$

$$\mathbf{p}_\alpha^{n+1} = \mathbf{p}_\alpha^{n+1/2} + \frac{\Delta t}{2} \mathbf{F}_\alpha^{n+1} \quad (2.6)$$

Pomocou rovnomerne zrýchleného pohybu určíme v čase $t^{n+1/2} = (n + 1/2)\Delta t$ hybnosť $\mathbf{p}_\alpha^{n+1/2}$. Parameter Δt odpovedá veľkosti časového kroku danej simulácie. Následne s využitím rovnomerného pohybu s hybnosťou $\mathbf{p}_\alpha^{n+1/2}$ určíme novú polohu \mathbf{r}_α^{n+1} . Vďaka tomu vypočítame novú silu \mathbf{F}_α^{n+1} pôsobiacu na časticu v mieste \mathbf{r}_α^{n+1} . V poslednej časti tohto algoritmu určíme hybnosť v $n + 1$ kroku simulácie (zo znalosti \mathbf{F}_α^{n+1}).

Za predpokladu fixného časového kroku má táto metóda diskretizačnú chybu odpovedajúcu $O(\Delta t^2)$ [41].

Na koniec tejto kapitoly ešte poznamenajme, že nami študovaný systém podlieha periodickým okrajovým podmienkam. Dôvodom tejto reštrikcie sú veľmi malé rozmery simulovaných systémov (niekoľko desiatok Å). Kvôli tomu je za štandardných podmienok len veľmi malá časť molekúl mimo kontaktu so stenou čo neodpovedá makroskopickým experimentom a ich výsledkom. Avšak, cenou za túto aproximáciu je nerešpektovanie niektorých zákonov zachovania, ako napríklad zákonu zachovania momentu hybnosti.

2.1.2 Silové polia

Na to, aby sme mohli náš systém vyvíjať a študovať jeho charakteristiky potrebujeme poznať tvar potenciálu E_{total} . Ako sme už spomenuli, molekulárne dynamické simulácie vychádzajú z popisu molekúl ako klasických objektov. To znamená, že ich atómy sú popísané ako nabitú guľôčku spojené sériou pružiniek (a to či už v kontexte väzieb, tak aj v kontexte uhlov). Na základe toho môžeme pre E_{total} písať vzťah:

$$E_{total} = E_{bonded} + E_{nonbonded} \quad (2.7)$$

Člen E_{bonded} popisuje intramolekulárne väzbové príspevky. Člen $E_{nonbonded}$ zase naopak odpovedá medziatomárnej neväzbovej interakcií.

Energiu, spojenú s väzbovými príspevkami E_{bonded} , môžeme na základe toho vyjadriť pomocou vzťahu [42]:

$$E_{bonded} = \sum_i k_i^{bond} (r_i - r_i^0)^2 + \sum_j k_j^{angle} (\theta_j - \theta_j^0)^2 + E_{dihedral} \quad (2.8)$$

Prvá sumácia prebieha cez väzby danej molekuly, pričom k_i^{bond} je konštanta tuhosti i -tej väzby v harmonickej aproximácii. r_i odpovedá jej aktuálnej dĺžke a r_i^0 je parameter určujúci jej rovnovážnu hodnotu. V druhej sumácii prechádzame cez uhly trojíc susediacich atómov spojených väzbou. Parametre k_j^{angle} , θ_j^0 a premenná θ_j majú analogický význam, ako v prípade väzbového členu.

Energiu spojenú s dihedrálnymi uhlami $E_{dihedral}$ môžeme vyjadriť pomocou rovnice [42]:

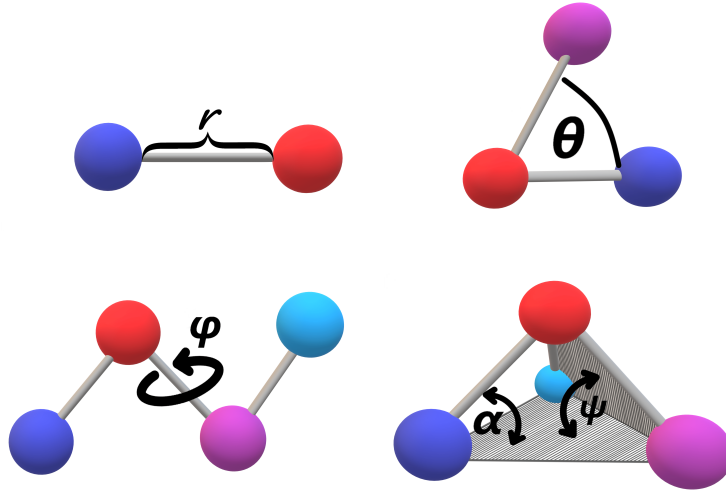
$$E_{dihedral} = \sum_l \left\{ \begin{array}{l} \sum_{m=1}^6 k_{l,m}^{dihe} [1 + \cos(m\Phi_l - \gamma_{l,m})] \\ k_l^{dihe} (\Psi_l - \Psi_l^0)^2 \end{array} \right. \quad (2.9)$$

Prvý člen odpovedá rotačne symetrickému dihedrálnemu potenciálu, kde $k_{l,m}^{dihe}$ reprezentuje konštantu tuhosti a $\gamma_{l,m}$ jeho fázový posun. Φ_l odpovedá hodnote dihedrálneho uhla medzi štvoricou susediacich atómov. Druhá časť rovnice (2.9) reprezentuje nepravé dihedrálne členy, ktoré sa využívajú na stabilizáciu niektorých štruktúr (tetraedrálne konformácia). V tomto prípade nám v danom vzťahu znova vystupuje konštanta tuhosti harmonickej aproximácie k_l^{dihe} , rovnovážna hodnota tohto uhla Ψ_l^0 a jeho aktuálna hodnota Ψ_l . Analogicky, ako v prípade vzťahov pre väzby a uhly, aj v tomto prípade prechádzame, cez všetky dostupné dihedrálne uhly tvorené štvoricou susediacich atómov.

Zobrazenie jednotlivých intramolekulárnych potenciálových príspevkov vidíme na obrázku (2.1). V prvom riadku tohto obrázku znázorňujeme parametre pre udržiavanie konštantnej medziatomárnej vzdialenosti a uhlov. Druhý riadok znázorňuje pravé a nepravé dihedrálne členy.

Energetický príspevok $E_{nonbonded}$ spojený so vzájomným neväzbovým pôsobením atómov charakterizujeme rovnicou [41, 42]:

$$E_{nonbonded} = \sum_{\substack{i,j; i < j \\ r_{ij} < r_{cut}}} 4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \sum_{\mathbf{n}}' \sum_{\substack{i,j \\ i \leq j}} \frac{1}{4\pi\epsilon_0 |\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j + \mathbf{n}L|} q_i q_j \quad (2.10)$$



Obr. 2.1: Intramolekulárne príspevky potenciálu U_{total}

Prvý člen reprezentuje van der Waalsovo pôsobenie vyjadrené Lennard-Jonesovým potenciálom. Parameter ϵ_{ij} odpovedá hĺbke potenciálového minima atómov i a j vo vzdialenosti r_{ij} . Na druhej strane, parameter σ_{ij} odpovedá efektívnemu rozmeru, s akým tieto atómy spolu interagujú. Spojitosť s atomárnymi charakteristikami vyjadrujú vzťahy Lorentza a Berthelota [43]:

$$\sigma_{ij} = \frac{\sigma_i + \sigma_j}{2} \quad \epsilon_{ij} = \sqrt{\epsilon_i \epsilon_j} \quad (2.11)$$

σ_i a σ_j odpovedajú efektívnemu priemeru častíc i a j . ϵ_i a ϵ_j odpovedajú hĺbke potenciálového minima pre jednotlivé atómy v prípade, že sa k nim približujeme bodovou testovacou časticou. Veľkosť týchto parametrov môžeme určiť z databázy CHARMM general Force Field (CGenFF) [44–47].

Taktiež ešte potrebujeme popísať parameter r_{cut} . Ten charakterizuje dosah van der Waalsovej interakcie, čo znamená, že v prvej sume uvažujeme len tie atómy, pre ktoré platí $r_{ij} < r_{cut}$. Korekciu energie k tejto aproximácii, vieme vďaka dostatočne rýchlemu poklesu danej interakcie vypočítať analyticky. Avšak, jej tvar predstavuje len aditívny faktor k celkovej energii, ktorý sa počas simulácie pre konštantnú hodnotu r_{cut} nemení [41].

Šiesta mocnina v Lennard-Jonesovom potenciály vychádza z popisu interakcie dvoch oscilujúcich dipólov. Repulzívny člen s dvanástou mocninou nemá fyzikálny význam, repulziu popisuje len približne a bol zavedený z dôvodu vyššej efektivity výpočtu [48].

Druhý člen zodpovedá klasickej Coulombickej interakcii bodových nábojov q_i a q_j vo vzdialenosti $|\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j + \mathbf{n}L|$, kde \mathbf{r}_i a \mathbf{r}_j označujú polohy atómov i a j . V

tomto prípade, ale musíme zobrať do úvahy dlhodobý charakter elektrostatickej interakcie a musíme sčítavať cez všetky periodické obrazy daného systému, kde $\mathbf{n} \in \mathcal{Z}^3$ a L predstavuje rozmer simulačnej bunky (pre jednoduchosť predpokladáme bunku v tvare kocky). Značenie Σ' znamená, že sumácia vynecháva singulárne členy typu $\mathbf{n} = 0$ a $i = j$ [41].

Parametre, vystupujúce vo vyššie uvedených potenciálových členoch určujeme pomocou fitovania na kvantovo mechanické výpočty. V prípade, že nepotrebujeme mať príliš vysokú presnosť získaných výsledkov, môžeme použiť dostupné knižnice, kedy pri malých molekulách používame určenie parametrov pomocou analógie [49].

Pokiaľ je vyššia presnosť nevyhnutnosťou, je jednou z možností využitie takzvaného Force Field Toolkitu. V tomto prípade postupne určujeme geometriu, nábojové rozloženie a intermolekulárne parametre tak, aby sme dostali, čo najlepšiu zhodu s kvantovo mechanickými výpočtami danej štruktúry. Podrobnejší popis tejto parametrizácie, ako aj jej ukážka na príklade adenozínu je uvedený v prílohe (A) [50].

2.1.3 Simulácie v NVT súbore

Ako sme spomenuli vyššie, metóda založená na riešení štandardného tvaru Newtonových pohybových rovníc pomocou Verletovho integrátora funguje v prípade, že chceme náš systém vyvíjať v kontexte NVE simulácií. To znamená, že dochádza k zachovaniu počtu častíc, objemu a energie simulovaného systému.

Avšak, tento prístup vo väčšine prípadov neodpovedá štandardným experimentom a ich simulačným podmienkam, ktoré sú väčšinou prevádzané za konštantnej teploty T a tlaku p . V tejto časti sa zameriame na simulácie pri konštantnej teplote, teda simulácie typu NVT.

Existuje viacero metód, ako udržiavať systém pri konštantnej teplote (Berendsenov termostat, škálovanie rýchlostí, Nose-Hooverov termostat). V tejto kapitole sa ale zameriame len na metódu, ktorá je používaná v prípade simulačného balíka NAMD používaného na uskutočnenie našich simulácií [51].

Tento balík používa takzvaný stochastický prístup. V tomto prípade náš systém pripojíme k teplotnému rezervoáru, ktorý má stochastický charakter. To znamená, že do nášho pôvodného systému, ktorý bol popísaný Newtonovou dynamikou vložíme fiktívne častice teplotného rezervoáru o teplote T . Interakcia nášho systému s časticami tepelného rezervoáru vytvára trenie, ktoré môžeme popísať koeficientom γ . Bolo ukázané, že člen, ktorý je s ním spojený má tendenciu zvyšovať dynamickú stabilitu simulovaného systému. Zároveň na náš pôvodný systém pôsobia náhodné, časovo závislé stochastické sily $\mathbf{R}(t)$, pochádzajúce od zrážok so spomínanými fiktívnymi časticami [40, 52].

Na základe toho môžeme zostaviť nové pohybové rovnice v tvare [40, 52]:

$$\dot{\mathbf{r}}_\alpha = \frac{\mathbf{p}_\alpha}{m_\alpha}, \quad \alpha = 1, 2, \dots, N \quad (2.12)$$

$$\dot{\mathbf{p}}_\alpha = -\nabla_{\mathbf{r}_\alpha} E_{total}(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \dots, \mathbf{r}_N) - \gamma \mathbf{p}_\alpha + \sqrt{\frac{2\gamma m_\alpha k_b T}{\Delta t}} \mathbf{R}_\alpha(t), \quad \alpha = 1, 2, \dots, N \quad (2.13)$$

Tieto rovnice odpovedajú Langevinovým pohybovým rovniciam [53]. k_b reprezentuje Boltzmannovu konštantu, T predstavuje požadovanú teplotu systému a Δt odpovedá veľkosti časového kroku. Náhodné sily $\mathbf{R}_\alpha(t)$ sme uvažovali ako bezrozmerné.

Predpokladáme, že počas jedného molekulárne dynamického kroku (pohyb so všetkými atómami v systéme) dochádza k veľkému počtu zrážok s fiktívnymi časticami. Vďaka tomu z centrálnej limitnej vety dostávame, že $\mathbf{R}_\alpha(t)$ bude mať gaussovské rozdelenie. Zároveň predpokladáme, že k nim dochádza oveľa rýchlejšie, ako je dĺžka nášho časového kroku, takže platí [52]:

$$\langle \mathbf{R}_\alpha(t) \mathbf{R}_\alpha(t') \rangle = \delta(t - t') \quad (2.14)$$

Je možné ukázať, že gaussovské rozdelenie, ktorým sa bude $\mathbf{R}_\alpha(t)$ riadiť má nulovú strednú hodnotu a jednotkový rozptyl. Tvar multiplikatívneho faktoru vystupujúceho pri $\mathbf{R}_\alpha(t)$ v rovnici (2.13) vyplýva z flukтуаčne-disipatívneho teorému [54].

Vzhľadom na to, že sme upravili tvar pohybových rovníc, pomocou ktorých vyvíjame náš systém musíme upraviť aj tvar prislúchajúceho numerického integrátora. Konkrétne využijeme Brüngerov–Brooksov–Karplusov algoritmus, ktorý je rozšírením Verletovho algoritmu a k zmene dochádza len vo vzťahu pre novú pozíciu častice \mathbf{r}_α^{n+1} ($\alpha = 1, 2, \dots, N$). Tú môžeme vyjadriť v tvare [55]:

$$\mathbf{r}_\alpha^{n+1} = \frac{\gamma \Delta t / 2}{1 + \gamma \Delta t / 2} \mathbf{r}_\alpha^{n-1} + \frac{1}{1 + \gamma \Delta t / 2} \left[\mathbf{r}_\alpha^n + \frac{1}{m_\alpha} \mathbf{p}_\alpha^{n+1/2} \Delta t + \sqrt{\frac{2\gamma k_b T}{m_\alpha}} \mathbf{Z}_\alpha^n \Delta t^2 \right] \quad (2.15)$$

V prípade, že $\gamma \rightarrow 0$ dostávame pôvodný Verletov algoritmus. \mathbf{Z}_α^n predstavuje vektor gaussovských náhodných premenných s nulovou strednou hodnotou a jednotkovým rozptylom.

2.1.4 Simulácie v NPT súbore

Táto časť sa bude zameriavať na simulácie pri konštantnom tlaku, konkrétne na simulácie typu NPT. Aj v tomto prípade máme viacero možností, ako dosiahnuť

konštantného tlaku (Weak coupling algoritmus, Nose-Hooverov barostat, metóda Langevinovho piestu). Stratégia, ktorou sa riadi NAMD kombinuje prístup Nose-Hooverovho barostatu (popísaného v [56]) s kontrolou fluktuácií tlakového piestu pomocou Langevinovej dynamiky (popis postupu sa dá nájsť v [57]) [40].

Vývoj systému je popísaný Langevinovými rovnicami. Avšak, v tomto prípade zavádzame novú dynamickú premennú, ktorou je objem \mathcal{V} . Dá sa ukázať, že tieto rovnice (pre $\alpha = 1, 2, \dots, N$) budú mať tvar [58]:

$$\dot{\mathbf{r}}_\alpha = \frac{\mathbf{p}_\alpha}{m_\alpha} + \dot{\epsilon} \mathbf{r}_\alpha \quad (2.16)$$

$$\dot{\mathbf{p}}_\alpha = -\nabla_{\mathbf{r}_\alpha} E_{total}(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \dots, \mathbf{r}_N) - \left(1 + \frac{d}{N_f}\right) \dot{\epsilon} \mathbf{p}_\alpha - \gamma \mathbf{p}_\alpha + \sqrt{\frac{2\gamma m_\alpha k_b T}{\Delta t}} \mathbf{R}_\alpha(t) \quad (2.17)$$

$$\dot{\mathcal{V}} = d\mathcal{V}\dot{\epsilon} \quad (2.18)$$

$$W\dot{\epsilon} = d\mathcal{V}(X - P_{ext}) + \frac{d}{N_f} \sum_{\alpha=1}^N \frac{\mathbf{p}_\alpha^2}{m_\alpha} - \gamma_p \dot{\epsilon} W + \sqrt{\frac{2\gamma_p W k_b T}{\Delta t}} R_p(t) \quad (2.19)$$

Veličiny \mathbf{m}_α , \mathbf{r}_α a \mathbf{p}_α zodpovedajú hmotnostiam, polohám a hybnostiam častíc. d predstavuje dimenziu systému (v našom prípade $d = 3$). N_f zodpovedá počtu stupňov voľnosti. Vzhľadom na štandardnú veľkosť simulovaných systémov často uvažujeme $1 + d/N_f \approx 1$. γ a $\mathbf{R}_\alpha(t)$ majú rovnaký význam ako v prípade NVT settingu. P_{ext} je vonkajší tlak, ktorému chceme systém podrobiť. S objemom \mathcal{V} je spojená premenná $\dot{\epsilon}$ zodpovedajúca rýchlosti relatívnej zmeny objemu simulačnej bunky (škálovanaj dimenziou systému). Veličiny γ_p a $R_p(t)$ majú analogický význam ako γ a $\mathbf{R}_\alpha(t)$, avšak v tomto prípade pôsobia na piest barostatu. Zároveň definujeme fiktívnu hmotnosť piestu W , ktorú určujeme pomocou rovnice [58]:

$$W = dNk_b T \tau^2 \quad (2.20)$$

Veličina τ predstavuje periódu oscilácií barostatu. Jej hodnotu stanovujeme tak, aby sme zásadne nenarušili tepelné spektrum NVT simulácie [58].

Nakoniec ešte uvedme tvar veličiny X , ktorú môžeme vyjadriť pomocou vzťahu [58]:

$$X = \frac{1}{d\mathcal{V}} \sum_{\alpha=1}^N \left[\frac{\mathbf{p}_\alpha^2}{m_\alpha} - \mathbf{r}_\alpha \cdot \nabla_{\mathbf{r}_\alpha} E_{total}(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \dots, \mathbf{r}_N) \right] - \frac{\partial}{\partial \mathcal{V}} E_{total}(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \dots, \mathbf{r}_N, \mathcal{V}) \quad (2.21)$$

Parciálna derivácia podľa \mathcal{V} znamená, že musíme prepísať súradnice $\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \dots, \mathbf{r}_N$ do bezrozmerných jednotiek pomocou škálovania cez $\mathcal{V}^{1/3}$ a až následne parciálne

derivovať E_{total} . Tento potenciál je rovnaký ako v predchádzajúcich častiach, len v tomto prípade explicitne uvažujeme závislosť na objeme systému.

Z hľadiska numerického riešenia tohto settingu znova používame obdobu Verletovho algoritmu. Avšak, zároveň s polohami a hybnosťami častíc musíme vyvíjať aj objem systému a kanonicky združenú veličinu $p_\epsilon = W\dot{\epsilon}$. To znamená, že používame dva prelínajúce sa algoritmy pre \mathcal{V} a p_ϵ a pre \mathbf{r}_α a \mathbf{p}_α . n -tý krok tohto algoritmu má tvar [58]:

$$\mathcal{V}^{n+1/2} = \mathcal{V}^n + \frac{\Delta t}{2} \dot{\mathcal{V}}^n \quad (2.22)$$

$$\dot{\epsilon}^{n+1/2} = \dot{\epsilon}^n + \frac{\Delta t}{2} \ddot{\epsilon}^n \quad (2.23)$$

$$\mathbf{p}_\alpha^{n+1/2} = \mathbf{p}_\alpha^n + \frac{\Delta t}{2} \dot{\mathbf{p}}_\alpha^n \quad (2.24)$$

$$\mathbf{r}_\alpha^{n+1} = \mathbf{r}_\alpha^n + \dot{\mathbf{r}}_\alpha^{n+1/2} \Delta t \quad (2.25)$$

$$\mathbf{p}_\alpha^{n+1} = \mathbf{p}_\alpha^{n+1/2} + \frac{\Delta t}{2} \dot{\mathbf{p}}_\alpha^{n+1/2} \quad (2.26)$$

$$\dot{\epsilon}^{n+1} = \dot{\epsilon}^{n+1/2} + \frac{\Delta t}{2} \ddot{\epsilon}^{n+1/2} \quad (2.27)$$

$$\mathcal{V}^{n+1} = \mathcal{V}^n + \frac{\Delta t}{2} \dot{\mathcal{V}}^{n+1/2} \quad (2.28)$$

V tomto algoritme dosadzujeme získané medzivýsledky do výpočtov v nasledujúcich medzikrokoch. To znamená, že pre $\dot{\mathcal{V}}^n$ platí $\dot{\mathcal{V}}^n = \dot{\mathcal{V}}(\mathcal{V}^n, \dot{\epsilon}^n)$, avšak pre $\ddot{\epsilon}^n$ dostávame $\ddot{\epsilon}^n = \ddot{\epsilon}(\mathbf{r}_\alpha^n, \mathbf{p}_\alpha^n, \mathcal{V}^{n+1/2}, \dot{\epsilon}^n)$.

Predpokladajme, že platí $W \rightarrow \infty$, teda perióda oscilácií piestu $\tau \rightarrow \infty$ a zároveň $\gamma_p \rightarrow 0$. Potom v prípade, že platí $\dot{\epsilon}(t=0) = 0$ (teda, na začiatku simulácie nedochádzalo k deformáciám objemu \mathcal{V}), dostávame Brüngerov–Brooksov–Karplusov algoritmus. Ako sme spomenuli vyššie, v prípade $\gamma \rightarrow 0$ vieme tento algoritmus previesť na klasický Verletov algoritmus. Takže vidíme, že tento prístup je konzistentný s tým, čo sme uviedli v prípade NVT, respektíve NVE súboru.

Zároveň platí, že daný postup generuje korektné vzorkovanie izobaricko-izotermického ensamble (takže dostávame korektnú hustotu pravdepodobnosti) [58].

V prípade praktickej aplikácie máme viacero možností, ako kontrolovať objem bunky. Je možné naň aplikovať rôzne reštrikcie, napríklad môžeme požadovať, aby sa každá súradnica menila v rovnakej miere (izotropné oscilácie objemu). Alebo

môžeme požadovať, aby boli niektoré z rozmerov simulačnej bunky zafixované, čo sa používa pri simulácií s membránami, kedy fixujeme rozmery v rovine xy .

2.1.5 Elektrostatické interakcie

Ako sme už spomenuli v kapitole (2.1.2), príspevok od nábojového rozloženia do celkového potenciálu E_{total} , ktorý budeme značiť E_{charge} môžeme vyjadriť pomocou rovnice:

$$E_{charge} = \sum_{\mathbf{n}}' \sum_{\substack{i,j \\ i \leq j}} \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{q_i q_j}{|\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j + \mathbf{n}L|} \quad (2.29)$$

Na to, aby sme sčítaním tejto sumy dostali konečnú hodnotu potrebujeme, aby bol simulovaný systém neutrálny. Napriek tomu, ale táto suma nie je absolútne konvergentná. To sa dá ukázať tým, že začneme sčítavať len kladné náboje.

Postup, používaný na jej korektné a efektívne sčítanie, je takzvaná Ewaldova sumácia. Jeho základom je rozklad $1/|\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j + \mathbf{n}L|$ na krátkodosahový a dlhodosahový príspevok (uvedený v rovnici (2.30)). Krátkodosahový príspevok vieme spočítať priamou integráciou. Dlhodosahový príspevok sčítavame v reciprokom priestore s využitím Poissonovho sumačného vzťahu [59].

$$\frac{1}{|\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j + \mathbf{n}L|} = \frac{1}{r} = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^\alpha e^{-t^2 r^2} dt + \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_\alpha^\infty e^{-t^2 r^2} dt \quad (2.30)$$

α je parameter, ktorým určujeme, ako sa rozdelí náročnosť výpočtu medzi reálny a reciproký priestor. Po vykonaní vyššie spomínaných výpočtov dostávame Ewaldovu sumáciu [59]:

$$E_{charge} = \sum_{\mathbf{n}}' \sum_{\substack{i,j \\ i \leq j}} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0} \frac{Erfc(\alpha |\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j + \mathbf{n}L|)}{|\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j + \mathbf{n}L|} + \sum_{\mathbf{k}, \mathbf{k} \neq 0} \frac{e^{-\left(\frac{\pi}{\alpha L}\right)^2 \mathbf{k}^2}}{8L\pi^2 \epsilon_0 \mathbf{k}^2} |Q(\mathbf{k})|^2 + E_{surf}^{self} \quad (2.31)$$

$$Q(\mathbf{k}) = \sum_j q_j \exp\left(2\pi i \frac{\mathbf{k} \cdot \mathbf{r}_j}{L}\right) \quad (2.32)$$

$$E_{surf}^{self} = \frac{2\pi}{2\epsilon_r + 1} \frac{1}{4\pi\epsilon_0 L^3} \left| \sum_j \mathbf{r}_j q_j \right|^2 - \frac{\alpha}{4\pi^{3/2} \epsilon_0} \sum_j q_j^2 \quad (2.33)$$

Kde $Erfc(x)$ reprezentuje error funkciu, ktorá pochádza zo sumácie v reálnom priestore. Druhý člen má pôvod v sumácií v reciprokom priestore, pričom $\mathbf{k} \in \mathcal{Z}^3$

je vektor tohto priestoru. E_{surf}^{self} charakterizuje interakciu s dielektrikom nachádzajúcim sa v nekonečne a korekciu k self-interakciám nábojov q_j . ϵ_r odpovedá relatívnej permitivite tohto dielektrika. Často sa uvažuje takzvaná tin foil aproximácia, teda daný systém v nekonečne obalíme vodivým materiálom, pre ktorý $\epsilon_r \rightarrow \infty$ [41].

V praxi tento výsledok ešte aproximujeme tým, že v sumáciách cez \mathbf{n} a \mathbf{k} uvažujeme len niekoľko prvých členov. V prípade vyšších hodnôt \mathbf{n} a \mathbf{k} sú získané korekcie len malé a exponenciálne klesajú k 0.

Výpočet sa dá ešte urýchliť interpoláciou nábojov na mriežku a prevedením tohto rozdelenia do reciprokeho priestoru Fourierovou transformáciou. V prípade NAMD je interpolácia uskutočnená pomocou B-splineov. Výsledný algoritmus sa nazýva Particle mesh Ewald method (PME) a jeho výpočtová náročnosť je $O(N \log(N))$ [40].

2.2 Riadená molekulárna dynamika

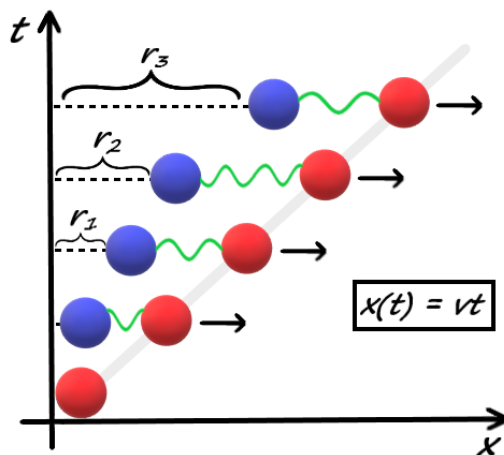
Charakteristické časy procesov prebiehajúcich v biologických systémoch sú veľmi často v ráde ms až niekoľkých sekúnd. To je z hľadiska dnešných simulácií vo väčšine prípadov nerealizovateľné (až na pár výnimiek, ako napríklad [16] a [15]). Z toho dôvodu je nutné tieto procesy vhodným spôsobom urýchliť, aby sme boli schopní pozorovať študovaný proces aj na kratších časových škálach, ale aby sme zároveň boli schopní zrekonštruovať výsledky reálnych experimentov.

Jednou z metód používaných na takéto typ simulácií je riadená molekulárna dynamika (Steered molecular dynamics, alebo aj SMD). V tomto prípade na študovaný systém aplikujeme externú silu, ktorou znížime výšku potenciálovej bariéry nutnej k prechodu z počiatočnej do finálnej konfigurácie, ktorá je definovaná reakčnou koordinátou $\xi = \xi(\mathbf{r}_1, \dots, \mathbf{r}_N)$. Tá môže popisovať napríklad pohyb v smere osi z , ale môže mať aj komplexnejší charakter, ako napríklad miera α -helikálnosti študovanej štruktúry [10].

Okrem mechanizmu realizácie daného procesu sa v tomto type simulácií, vo väčšine prípadov, zameriavame na určenie profilu voľnej energie $\Phi(\xi)$, ako funkcie reakčnej koordináty, nazývanej potenciál strednej sily (Potencial of mean force, alebo PMF).

Praktická realizácia spočíva v pripojení virtuálneho atómu na časť študovaného systému pomocou harmonického potenciálu. Pohyb sa realizuje v smere reakčnej koordináty ξ a to buď v settingu konštantnej hodnoty aplikovanej sily $\mathbf{f}(t) = \mathbf{f}$, alebo konštantnej rýchlosti pohybu $\mathbf{v}(t) = \mathbf{v}$. Zároveň, časť skúmaného systému fixujeme, čím zabránime rovnomernému rozpohybovaniu sa celej simulačnej bunky. V našom prípade budeme používať simulácie s konštantnou hodnotou rýchlosti $\mathbf{v}(t)$. Tento prístup, uvedený na obrázku (2.2), je analogický práci s mikroskopom atomárnych síl (Atomic force microscope, alebo AFM) [40].

Modrou farbou označujeme atóm študovaného systému, červená farba odpovedá virtuálnemu atómu.



Obr. 2.2: Riadená molekulárna dynamika pre $\mathbf{v}(t) = \mathbf{v}$

Prácu $W(\boldsymbol{\lambda}(t))$, ktorú počas simulácie v čase t na tento systém vykonávame určujeme (vzhľadom ku konštantnej rýchlosti $\mathbf{v}(t)$) podľa vzťahu:

$$W(\boldsymbol{\lambda}(t)) = \int_0^t \mathbf{v} \cdot \mathbf{f}(\boldsymbol{\lambda}(t)) dt \quad (2.34)$$

Ak rýchlosť virtuálneho atómu $\mathbf{v} \rightarrow 0$, dostávame $\lim_{\mathbf{v} \rightarrow 0} W(\boldsymbol{\lambda}(t)) = \Delta F$, teda dostávame vratnú kvazistacionárnu simuláciu.

2.2.1 Stiff spring aproximácia

Je dôležité si uvedomiť, že práca, ktorú vykoná virtuálny atóm nemusí nutne odpovedať potenciálu strednej sily $\Phi(\boldsymbol{\xi})$ harmonicky pripojenej časti pôvodného systému. Dôvodom je, že daný atóm môže, v dôsledku pôsobenia ostatných atómov v systéme, za virtuálnym atómom zaostávať.

V tejto podkapitole sa budeme stručne zaoberať vzťahom medzi $\Phi(\boldsymbol{\xi})$ a získaným priebehom voľnej energie pre upravený systém $F(\boldsymbol{\lambda})$ (respektíve $\Delta F = F(\boldsymbol{\lambda}_f) - F(\boldsymbol{\lambda}_i)$, kde $\boldsymbol{\lambda}_f$ a $\boldsymbol{\lambda}_i$ sú finálna a počiatočná hodnota parametra $\boldsymbol{\lambda}$).

A to v prípade, ak na pôvodný N -časticový systém popísaný hamiltoniánom $\mathcal{H}(\mathbf{r}^N, \mathbf{p}^N) = \mathcal{H}(\mathbf{r}_1, \dots, \mathbf{r}_N; \mathbf{p}_1, \dots, \mathbf{p}_N)$ pôsobíme externým harmonickým potenciálom $h(\mathbf{r}^N, \boldsymbol{\lambda})$, charakterizovaným riadiacim parametrom $\boldsymbol{\lambda}$, korelovaným s koordinátou $\boldsymbol{\xi}$. Vďaka tomu dostávame nový systém popísaný hamiltoniánom $\tilde{\mathcal{H}}(\mathbf{r}^N, \mathbf{p}^N, \boldsymbol{\lambda}) = \mathcal{H}(\mathbf{r}^N, \mathbf{p}^N) + h(\mathbf{r}^N, \boldsymbol{\lambda})$ [9].

Stavy pôvodného systému môžeme popísať pomocou kanonického rozdelenia $\rho(\beta, \mathcal{H}(\mathbf{r}^N, \mathbf{p}^N))$ charakterizovaného cez $\mathcal{H}(\mathbf{r}^N, \mathbf{p}^N)$ a teplotu T (respektíve, inverznú teplotu $\beta = 1/k_b T$). Pre toto rozdelenie platí vzťah:

$$\rho(\beta, \mathcal{H}(\mathbf{r}^N, \mathbf{p}^N)) = \frac{1}{\mathcal{Z}_k} e^{-\beta \mathcal{H}(\mathbf{r}^N, \mathbf{p}^N)} \quad (2.35)$$

Kde \mathcal{Z}_k , je kanonická partičná suma.

Ako sme uviedli vyššie, potenciál strednej sily $\Phi(\boldsymbol{\xi})$, je definovaný len ako funkcia reakčnej koordináty. To znamená, že v bode $\boldsymbol{\xi}'$ ho môžeme vyjadriť pomocou $\rho(\beta, \mathcal{H}(\mathbf{r}^N, \mathbf{p}^N))$, ako strednú hodnotu cez všetky dostupné stavy systému s reštrikciou na hodnotu reakčnej koordináty $\boldsymbol{\xi}(\mathbf{r}_1, \dots, \mathbf{r}_N) = \boldsymbol{\xi}'$. Integráciou $\rho(\beta, \mathcal{H}(\mathbf{r}^N, \mathbf{p}^N))$ v kontexte danej reštrikcie a úpravou výsledného vzťahu dostávame [8]:

$$\Phi(\boldsymbol{\xi}') = -\frac{1}{\beta} \ln \left[\int \delta(\boldsymbol{\xi}(\mathbf{r}^N) - \boldsymbol{\xi}') e^{-\beta \mathcal{H}(\mathbf{r}^N, \mathbf{p}^N)} d\mathbf{r}^N d\mathbf{p}^N \right] \quad (2.36)$$

Veličiny \mathbf{r}^N a \mathbf{p}^N uvažujeme pre jednoduchosť bezrozmerné.

Voľnú energiu $F(\boldsymbol{\lambda})$ pozmeneného systému $\widetilde{\mathcal{H}}(\mathbf{r}^N, \mathbf{p}^N, \boldsymbol{\lambda})$ môžeme vyjadriť pomocou vzťahu pre partičnú funkciu kanonického rozdelenia (2.35), kde \mathcal{Z}_k vyjadríme v integrálnom tvare [8]:

$$e^{-\beta F(\boldsymbol{\lambda})} = \int \exp \left\{ -\beta \mathcal{H}(\mathbf{r}^N, \mathbf{p}^N) - \frac{\beta}{2} [\boldsymbol{\xi}(\mathbf{r}^N) - \boldsymbol{\lambda}] \cdot \mathbf{K} \cdot [\boldsymbol{\xi}(\mathbf{r}^N) - \boldsymbol{\lambda}] \right\} d\mathbf{r}^N d\mathbf{p}^N \quad (2.37)$$

Kde sme rozpísali tvar harmonického potenciálu $h(\mathbf{r}^N, \boldsymbol{\lambda})$. Matica \mathbf{K} predstavuje diagonálnu maticu $diag(k_i)$, kde k_i sú konštanty tuhosti prislúchajúce i -tej zložke reakčnej koordináty $\boldsymbol{\xi}$ a parametra $\boldsymbol{\lambda}$. Pre jednoduchosť predpokladáme, že \mathbf{K} má rozmer energie a $\boldsymbol{\xi}$, $\boldsymbol{\lambda}$, \mathbf{r}^N a \mathbf{p}^N sú vyjadrené bezrozmerne. Z tohto vzťahu vidíme, že závisí práve od matice \mathbf{K} , ako veľmi bude hodnota $\boldsymbol{\xi}(\mathbf{r}^N)$ zodpovedať kontrolnému parametru $\boldsymbol{\lambda}$.

V rámci zachovania stručnosti tejto kapitoly uvedme, že za predpokladu, že elementy matice \mathbf{K} budú dostatočne veľké, platí vzťah $\Delta\Phi \approx \Delta F$, kde $\Delta\Phi = \Phi(\boldsymbol{\lambda}_f) - \Phi(\boldsymbol{\lambda}_i)$. Čo predstavuje takzvanú Stiff-spring aproximáciu. Korekčné členy prvého rádu sú vo veľkosti $O(1/k_i)$, kde $\{k_i\}_{i=1}^n$ predstavujú elementy matice \mathbf{K} [8, 9]. V prípade záujmu uvádzame podrobné odvodenie v prílohe (B.1).

Takže vidíme, že pre dostatočne silnú väzbu \mathbf{K} medzi vektorom reakčnej koordináty $\boldsymbol{\xi}$ a externým riadiacim parametrom $\boldsymbol{\lambda}$ môžeme vývoj voľnej energie ΔF stotožniť s vývojom potenciálu strednej sily $\Delta\Phi$. Na druhej strane, hodnota tohto parametra nemôže byť príliš vysoká, pretože v prípade SMD simulácií s konštantnou rýchlosťou \mathbf{v} dochádza so zvyšovaním hodnoty k ku zvyšovaniu fluktuácií externej sily pôsobiacej na systém. Tieto fluktuácie sú úmerné faktorom $\sqrt{k/\beta}$ [60].

Niektoré z použitých hodnôt k (v prípade simulácií so skalárnou reakčnou koordinátou $\xi(\mathbf{r}^N)$) uvádzame v tabuľke (2.1)

Tabuľka 2.1: Príklady použitých hodnôt parametra k

| k [kcal/mol/Å ²] | k [kcal/mol/Å ²] |
|--------------------------------|--------------------------------|
| 1.0 [11] | 50.0 [6] |
| 5.0 [10] | 400.0 [12] |
| 7.0 [11] | 500.0 [10] [6] |
| 7.2 [7–9, 11, 40] | 503.8 [8] |
| 20.0 [6] | 800.0 [61] |

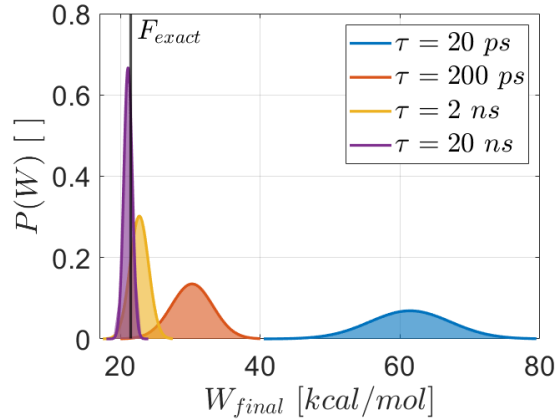
V reálnych experimentoch sú hodnoty tuhosti k použitého zariadenia štandardne o niekoľko rádov nižšie (~ 1 pN Å⁻¹). Z toho dôvodu majú výsledky získané zo simulácií vyššie priestorové rozlíšenie (avšak, na úkor časového okna) [40].

2.3 Metódy výpočtu voľnej energie

Ako sme už spomenuli, výpočet priebehu voľnej energie pomocou rovnovážnych SMD simulácií nie je štandardne možné z technických príčin realizovať. Z toho dôvodu volíme opačný prístup, kedy robíme veľké množstvo krátkych, nevratných simulácií. Skrátenie simulačného času sa musí nutne prejavovať v posune distribúcie hodnôt vykonanej práce $\mathcal{P}(\mathcal{W})$ ďalej od rovnovážnej hodnoty voľnej energie F_{exact} (smerom k vyšším hodnotám v dôsledku disipácie). Príklad takého vývoja pre rôzne hodnoty simulačného času τ môžeme vidieť na grafe (2.3). Môžeme si všimnúť, že pre veľmi krátke simulačné časy sa len zanedbateľné percento získaných trajektórií blíži rovnovážnemu vývoju.

Z opačného pohľadu z tohto grafu taktiež vyplýva, že pre rýchlosť virtuálneho atómu $\mathbf{v} \rightarrow 0$, budeme pozorovať prechod $\mathcal{P}(\mathcal{W}) \rightarrow \delta(\mathcal{W} - \Delta F)$ (v dôsledku približovania sa ku rovnovážnemu priebehu).

Na získané výsledky následne aplikujeme flukтуаčné teorémy (alebo ich dôsledky), ktoré spájajú nerovnovážne termodynamické procesy s vratným rovnovážnym vývojom študovaného systému. Práve pomocou týchto teorémov sme schopní zrekonštruovať požadovaný rovnovážny vývoj. V tejto kapitole sa budeme zaoberať Crookovým flukтуаčným teorémom a metódami určenia priebehu voľnej energie $\Delta F(\lambda)$, ktoré z neho vyplývajú (aj keď ho historicky niekedy predchádzali).



Obr. 2.3: Charakter $\mathcal{P}(\mathcal{W})$ voči rôznym hodnotám τ

2.3.1 Jarzynského identita a jej kumulanty

Významným nástrojom pre získanie rovnovážnej informácie o priebehu voľnej energie z nerovnovážnych simulácií je takzvaná Jarzynského identita. Tá bola odvodená Jarzynskim ešte v 90. rokoch minulého storočia. Jej tvar uvádzame v nasledujúcom vzťahu [62, 63]:

$$\langle e^{-\beta\mathcal{W}} \rangle_F = \int \mathcal{P}_F(\mathcal{W}) e^{-\beta\mathcal{W}} d\mathcal{W} = e^{-\beta\Delta F} \quad (2.38)$$

Odvedenie rovnice (2.38) je uvedené v nasledujúcej kapitole (2.3.2) spojenej s Crookovým fluktuáčnym teorémom (ktorý je voči nej historicky mladší).

Platí, že vzťah (2.38) je nezávislý na rýchlosti študovaného procesu. Avšak, v prípade vyšších rýchlostí je na získanie relevantného výsledku nutné robiť obsiahlejšie vzorkovanie, pretože získané hodnoty \mathcal{W} budú kvôli disipáciám vychýlené k $\mathcal{W} > \Delta F$. To znamená, že nezávislosť je len asymptotická a platí v limite nekonečného počtu akumulovaných trajektórií [63, 64].

Pokiaľ by sme uvažovali, že pre rýchlosť procesu \mathbf{v} platí $\mathbf{v} \rightarrow \infty$, tak prechádzame k takzvanej metóde perturbácie voľnej energie (Free energy perturbation method, resp. FEP), kedy skokovo prechádzame z počiatočného stavu do finálneho stavu systému [65].

Z hľadiska praktickej aplikácie tejto rovnice sme pracovali so vzťahom:

$$\Delta F \approx F_{exp}^F = -k_b T \ln \left(\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n e^{-\beta\mathcal{W}_i} \right) \quad (2.39)$$

Kde k_b je Boltzmannova konštanta, n označuje počet sledovaných trajektórií a \mathcal{W}_i zodpovedá i -tej hodnote získanej práce z dopredných simulácií.

Teraz sa hlbšie pozrime na vlastnosti rovnice (2.38). Najprv na ňu aplikujeme Jensenovu nerovnosť, tým dostávame vzťah [9]:

$$\langle \mathcal{W} \rangle_F \geq -\frac{1}{\beta} \ln \langle e^{-\beta \mathcal{W}} \rangle_F = \Delta F \quad (2.40)$$

Vyššie uvedená rovnica predstavuje druhý zákon termodynamiky. Ten hovorí, že vykonaná práca musí byť väčšia alebo rovná ako hodnota voľnej energie ΔF . Rovnosť dostávame len, keď budú všetky príspevky rovnaké (vratný proces).

Vidíme, že tento zákon platí len pre strednú hodnotu vykonanej práce. To znamená, že v niektorých prípadoch môže nastať $\mathcal{W} \leq \Delta F$. Práve na týchto vývoch, je Jarzynského identita veľmi závislá, keďže v prípade rýchlych nerovnovážnych simulácií majú najväčší príspevok do exponenciálneho stredovania. Z toho dôvodu sme nútení získať veľmi dobrý popis distribúcie dopredných simulácií $\mathcal{P}_F(\mathcal{W})$ zahŕňajúci aj príspevky s $\mathcal{W} \leq \Delta F$. To je ale štandardne veľmi náročné, keďže pravdepodobnosť vzorkovania prác menších ako ΔF klesá exponenciálne [9, 66].

Kvôli problémom exponenciálneho priemerovania, ktoré je praktické len v prípade, že veličina $\beta\sigma_F$ nie je príliš veľká (kde σ_F je rozptyl hodnôt práce \mathcal{W} získaných z dopredných simulácií), sa vyvinul prístup, kedy Jarzynského identitu (2.38) aproximujeme členmi kumulatívneho rozvoja $\{\kappa_n\}_{n=1}^{\infty}$. Konkrétne môžeme písať [9, 64]:

$$\Delta F = \sum_{n=1}^{\infty} (-\beta)^{n-1} \frac{\kappa_n}{n!} \quad (2.41)$$

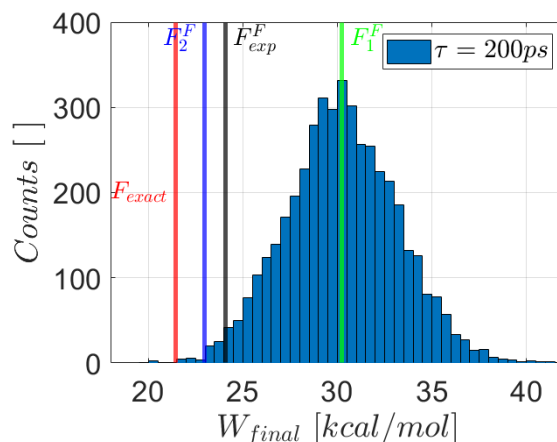
V prípade, že sa obmedzíme len na prvý člen tohto rozvoja, dostávame klasický aritmetický priemer, ktorý ako sme ukázali v rovnici (2.40) aproximuje hodnotu voľnej energie ΔF zhora. V kapitole (5) budeme výsledné aproximácie ΔF získané pomocou aritmetického priemeru označovať pomocou F_1 (pre účely tejto kapitoly ešte prípadne s horným indexom F , respektíve R).

Pokiaľ budeme uvažovať aj príspevok druhého kumulantu, tak dostávame [67]:

$$\Delta F \approx \langle \mathcal{W} \rangle_F - \frac{\beta}{2} (\langle \mathcal{W}^2 \rangle_F - \langle \mathcal{W} \rangle_F^2) = \mu_F - \frac{\beta}{2} \sigma_F^2 \quad (2.42)$$

Kde μ_F odpovedá strednej hodnote vykonaných prác \mathcal{W} (dopredných simulácií). Táto rovnica predchádzala Jarzynského identitu a bola navrhnutá v roku 1991 Hermansom [68]. Ak je rýchlosť simulácií dostatočne pomalá, respektíve platí, že je dostatočne dobre splnená stiff-spring aproximácia je rozvoj (2.42) presným vyjadrením ΔF . V tom prípade, je distribúcia získaných prác gaussovská, čo ale znamená, že všetky vyššie kumulanty budú nulové. V opačnom prípade máme nekonečné množstvo nenulových príspevkov [69].

V prípade vzťahu (2.42) bolo ukázané, že je efektívnou aproximáciou rovnice (2.38) a že pre limitovaný počet trajektórií dáva často lepšie výsledky ako Jarzynského rovnica. To môžeme vidieť na obrázku (2.4), kde pre rýchle nerovnovážne simulácie získavame najlepšiu aproximáciu hodnoty voľnej energie (označenej pomocou F_{exact}) rozvojom do druhého kumulantu (označeného pomocou F_2^F).



Obr. 2.4: Porovnanie Jarzynského identity a jej kumulantov

Explicitný tvar vzťahu (2.42) používaného pri vyhodnocovaní výsledkov vyjadruje rovnica:

$$\Delta F \approx F_2^F = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \mathcal{W}_i - \frac{1}{2k_b T n} \left[\sum_{i=1}^n \mathcal{W}_i^2 - \frac{1}{n} \left(\sum_{i=1}^n \mathcal{W}_i \right)^2 \right] \quad (2.43)$$

Uvažovanie vyšších kumulantov štandardne nevedie k ďalšiemu zlepšeniu, pretože tieto príspevky disponujú vyššími mocninami vykonanej práce \mathcal{W} a vedú k výrazným fluktuáciám aproximácie ΔF a k vyššej štatistickej neistote [8, 70].

Analogickým spôsobom, ako uvádzame v kapitole (2.3.2) môžeme odvodiť Jarzynského identitu pre $\mathcal{P}_R(-\mathcal{W})$, teda v prípade realizácie spätných simulácií. Tvar tejto rovnice môžeme vyjadriť pomocou vzťahu [67]:

$$\langle e^{\beta \mathcal{W}} \rangle_R = \int \mathcal{P}_R(-\mathcal{W}) e^{\beta \mathcal{W}} d\mathcal{W} = e^{\beta \Delta F} \quad (2.44)$$

Ako vidíme, jediným rozdielom oproti rovnici (2.38) je zmena znamienok v exponentoch výsledného vzťahu. Je ale nutné upozorniť, že práca \mathcal{W} , ktorá v tejto rovnici vystupuje odpovedá dopredným simuláciám. Pokiaľ by sme chceli prejsť k hodnotám práce $\tilde{\mathcal{W}}$ vykonanej počas reverzných simulácií obrátených v čase, tak by sme museli zmeniť znamienko práce $\mathcal{W} \rightarrow -\tilde{\mathcal{W}}$.

Avšak, v našom prípade táto zmena nie je nutná. Dôvodom je, že ešte pred vyhodnotením získaných trajektórií sme ich pre lepšiu porovnateľnosť s doprednými simuláciami posunuli tak, aby nulová hladina vykonanej práce v reverznej simulácii odpovedala nulovej hladine v doprednej simulácii. Teda sme celý priebeh $\widetilde{\mathcal{W}}$ posunuli o finálnu hodnotu vykonanej práce. Tento posun vedie k zmene znamienok jednotlivých čiastkových prác $\delta\widetilde{\mathcal{W}}$ a teda k transformácii celkového charakteru vykonanej práce. To znamená, že po uvedenej transformácii bude získaný priebeh efektívne odpovedať priebehu doprednej simulácie, vďaka čomu môžeme pracovať so vzťahom (2.44).

Z hľadiska praktickej aplikácie rovnice (2.44) dostávame vzťah:

$$\Delta F \approx F_{exp}^R = k_b T \ln \left(\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n e^{\beta \mathcal{W}_i} \right) \quad (2.45)$$

Pokiaľ na rovnicu (2.44) aplikujeme Jensenovu nerovnosť tak, ako sme to urobili v prípade (2.40), tak dostávame vzťah:

$$\langle \mathcal{W} \rangle_R \leq \frac{1}{\beta} \ln \langle e^{\beta \mathcal{W}} \rangle_R = \Delta F \quad (2.46)$$

Keď rovnicu (2.46) spojíme so vzťahom (2.40), tak dostávame obmedzenie na hodnotu voľnej energie ΔF pomocou výsledkov dopredných a spätných simulácií, konkrétne [71]:

$$\langle \mathcal{W} \rangle_R \leq \Delta F \leq \langle \mathcal{W} \rangle_F \quad (2.47)$$

Ako vidíme pomocou kombinácie výsledkov dopredných a spätných simulácií môžeme dostať obojstranný odhad hodnoty ΔF a teda isté zlepšenie jej aproximácií (čo budeme uplatňovať v kontexte FR metódy a metódy prieniku histogramov spomínanej v kapitole (2.3.4) a v kapitole (2.3.3)). Okrem toho nám tento vzťah vypovedá aj o tom, že v prípade dopredných simulácií môžeme očakávať hodnoty práce, ktoré budú priemerne nadhodnocovať hodnotu ΔF a v prípade spätných simulácií ju zase budú podhodnocovať.

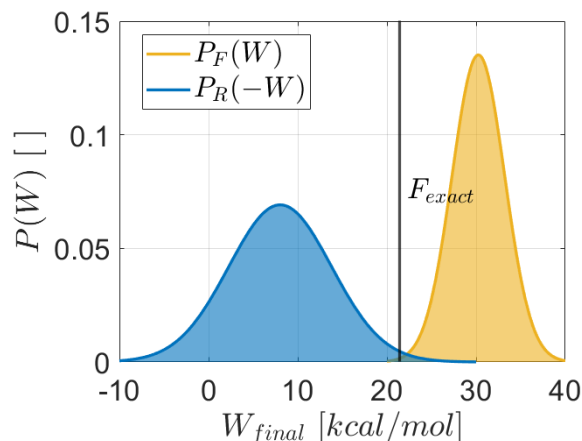
Tento jav uvádzame na obrázku (2.5). Ako vidíme, väčšina pravdepodobnostnej distribúcie pre spätné simulácie $\mathcal{P}_R(-\mathcal{W})$ sa nachádza pod presnou hodnotou F_{exact} . Naopak, pri dopredných simuláciách charakterizovaných $\mathcal{P}_F(\mathcal{W})$ pozorujeme, že len malé percento vykonaných prác na chvoste histogramu podhodnocuje presnú hodnotu voľnej energie.

Tvar Jarzynského rovnice (2.44) v prípade spätných simulácií samozrejme vedie aj na zmenu tvaru aproximácie pomocou druhých kumulantov. Konkrétne sa tento vzťah transformuje na [67]:

$$\Delta F \approx \langle \mathcal{W} \rangle_R + \frac{\beta}{2} (\langle \mathcal{W}^2 \rangle_R - \langle \mathcal{W} \rangle_R^2) = \mu_R + \frac{\beta}{2} \sigma_R^2 \quad (2.48)$$

Kde μ_R odpovedá strednej hodnote získaných prác zo spätných simulácií (po vyššie uvedenej transformácii) a σ_R zase ich rozptylu. Pokiaľ tento vzťah prepíšeme do prakticky aplikovateľného tvaru tak dostávame:

$$\Delta F \approx F_2^R = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \mathcal{W}_i + \frac{1}{2k_b T n} \left[\sum_{i=1}^n \mathcal{W}_i^2 - \frac{1}{n} \left(\sum_{i=1}^n \mathcal{W}_i \right)^2 \right] \quad (2.49)$$



Obr. 2.5: Znáozornenie distribúcií $\mathcal{P}_{F/R}(\pm\mathcal{W})$

2.3.2 Crooksov flukтуаčný teorém

Ako sme spomenuli vyššie, na získanie informácie o rovnovážnom priebehu voľnej energie z nerovnovážnych simulácií potrebujeme na obdržané výsledky aplikovať flukтуаčné teorémy alebo ich dôsledky. Jedným z flukтуаčných teorémov je takzvaný Crooksov flukтуаčný teorém, ktorý môžeme písať v tvare [71]:

$$\frac{\mathcal{P}_F(\mathcal{W})}{\mathcal{P}_R(-\mathcal{W})} = e^{\beta(\mathcal{W} - \Delta F)} \quad (2.50)$$

Tento teorém je významný v tom, že spája distribúciu prác \mathcal{W} nerovnovážnych trajektórií s hodnotou voľnej energie ΔF . Prístupy, ktoré diskutujeme v kapitolách (2.3.1), (2.3.3) a (2.3.4) sú jednoduchými dôsledkami vyššie uvedenej rovnice.

Vo zvyšku tejto kapitoly sa pozrieme na odvodenie tohto teorému, na niektoré z jeho vlastností a na dôsledky z neho vyplývajúce.

Predpokladajme, že máme systém s konečným počtom stavov $x \in \{1, \dots, \mathcal{N}\}$, popísaný hamiltoniánom $\tilde{\mathcal{H}}(x, \boldsymbol{\lambda}(t)) = \tilde{\mathcal{H}}(\mathbf{r}_x^N, \mathbf{p}_x^N, \boldsymbol{\lambda}(t))$. Parameter $\boldsymbol{\lambda}(t)$ kontroluje vývoj externého potenciálu (napríklad, harmonický potenciál v SMD). Ďalej predpokladajme kontakt systému s tepelným rezervoárom o teplote T . Uva-

žujme, že procesy prebiehajúce v tomto systéme môžeme popísať diskretnou Markovovskou dynamikou. Teda, diskretnou časovou škálou $t \in \{0, 1, \dots, \tau\}$ so stavmi $x(0), x(1), \dots, x(\tau)$. Následne náš systém budeme vyvíjať a konať naň externú prácu. Každý krok tohto vývoja sa skladá z dvoch častí, prvá z nich je stochastický prechod systému zo stavu $x(t)$ do stavu $x(t+1)$ sprevádzaný výmenou tepla $\delta Q_{x(t)x(t+1)}$ o veľkosti $\delta Q_{x(t)x(t+1)} = \tilde{\mathcal{H}}(x(t+1), \boldsymbol{\lambda}(t)) - \tilde{\mathcal{H}}(x(t), \boldsymbol{\lambda}(t))$ [72].

Druhou časťou je vykonanie práce $\delta W_{\boldsymbol{\lambda}(t)\boldsymbol{\lambda}(t+1)}$, zmenou $\boldsymbol{\lambda}(t) \rightarrow \boldsymbol{\lambda}(t+1)$ o veľkosti $\delta W_{\boldsymbol{\lambda}(t)\boldsymbol{\lambda}(t+1)} = \tilde{\mathcal{H}}(x(t+1), \boldsymbol{\lambda}(t+1)) - \tilde{\mathcal{H}}(x(t+1), \boldsymbol{\lambda}(t))$. Takýmto spôsobom pokračujeme až do koncového stavu $\{x(\tau), \boldsymbol{\lambda}(\tau)\}$ [72].

Teraz zadefinujeme takzvanú maticu prechodu $\mathbf{M}(t)$. Pre prechod medzi stavmi $x(t) \rightarrow x(t+1)$ platí, že element $M(t)_{x(t)x(t+1)}$ odpovedá pravdepodobnosti realizácie daného procesu. To znamená, že pravdepodobnosť prechodu medzi stavom $x(t)$ a $x(t+1)$ môžeme vyjadriť pomocou vzťahu [72]:

$$\mathcal{P}[x(t) \rightarrow x(t+1)] = M(t)_{x(t)x(t+1)} \pi(t)_{x(t)} \quad (2.51)$$

Kde $\pi(t)_{x(t)}$ odpovedá pravdepodobnosti, že sa systém v čase t nachádza v stave $x(t)$. Na základe toho dostávame jej ďalšiu vlastnosť, ktorá hovorí, že všetky prvky $\mathbf{M}(t)$ musia byť nezáporné. Okrem toho musí platiť, že v časovom kroku t dôjde k nejakej zmene systému, teda dôjde k prechodu do nejakého stavu v čase $t+1$ (aj keď by mal byť len ten istý). To ale znamená, že musí platiť, že súčet elementov v stĺpcoch $\mathbf{M}(t)$ je rovný 1 (vzhľadom na normalizáciu pravdepodobnosti) [41].

Zároveň platí, že prechodová matica $M(t)_{x(t)x(t+1)}$ procesu $x(t) \rightarrow x(t+1)$ nezávisí na histórii systému. Nakoniec predpokladajme, že energia systému je v každom kroku konečná a $\mathbf{M}(t)$ zachováva kanonické rozdelenie (popísané rovnicou (2.35) a (2.53)). To znamená, že predpokladáme platnosť podmienky detailnej rovnováhy [41, 66]:

$$\boldsymbol{\pi}(t) = \boldsymbol{\pi}(t) \cdot \mathbf{M}(t) \quad (2.52)$$

Kde $\boldsymbol{\pi}(t)$ je vektor pravdepodobností $\pi(t)_{x(t)} = \rho(\beta, \tilde{\mathcal{H}}(x(t), \boldsymbol{\lambda}(t)))$ stavov kanonického rozdelenia v čase t (charakterizovanom rovnicou (2.35)), pričom partičnú sumu vyššie uvedeného vzťahu môžeme vyjadriť v tvare:

$$\mathcal{Z}_k = e^{-\beta F(\beta, \boldsymbol{\lambda}(t))} \quad (2.53)$$

Kde $F(\beta, \boldsymbol{\lambda}(t))$ odpovedá voľnej energii systému. Podmienka (2.52) efektívne znamená, že ak je systém v rovnováhe, tak daný stochastický proces túto rovnováhu zachováva.

Za predpokladu, že v každom kroku je systém v novom rovnovážnom stave platí, že obrátenie času (urobenie spätnej simulácie) nemení pravdepodobnosť prechodu medzi uvažovanými stavmi. To znamená, že pre matice prechodu musí platiť vzťah [72]:

$$\hat{M}(t)_{x(t+1)x(t)}\pi(t)_{x(t+1)} = M(t)_{x(t)x(t+1)}\pi(t)_{x(t)} \quad (2.54)$$

Kde $\hat{M}(t)_{x(t+1)x(t)}$ označuje maticu prechodu spätného procesu zo stavu $x(t+1)$ do stavu $x(t)$ (tento vzťah zodpovedá podmienke mikroskopickej reverzibility). Na základe vyššie uvedených vzťahov dostávame, že podiel pravdepodobností \mathcal{P} procesov $x(0) \rightarrow \dots \rightarrow x(\tau)$ a $x(\tau) \rightarrow \dots \rightarrow x(0)$ spĺňa vzťah:

$$\frac{\mathcal{P}[x(0) \rightarrow \dots \rightarrow x(\tau)]}{\mathcal{P}[x(\tau) \rightarrow \dots \rightarrow x(0)]} = \frac{\pi(0)_{x(0)}}{\pi(\tau)_{x(\tau)}} \prod_{t=0}^{\tau-1} \frac{M(t)_{x(t)x(t+1)}}{\hat{M}(t)_{x(t+1)x(t)}} = \frac{\pi(0)_{x(0)}}{\pi(\tau)_{x(\tau)}} \prod_{t=0}^{\tau-1} \frac{\pi(t)_{x(t+1)}}{\pi(t)_{x(t)}} \quad (2.55)$$

Prvá rovnosť vyplýva z definície pravdepodobnosti prechodu medzi stavom $x(t)$ a $x(t+1)$ na základe vzťahu (2.51). Druhú rovnosť dostaneme aplikovaním vzťahu (2.54). Teraz využijeme vzťah (2.53) a že $\pi(t)_{x(t)}$ je len úspornejší zápis pre kanonické rozdelenie, vďaka čomu dostávame:

$$\frac{\pi(0)_{x(0)}}{\pi(\tau)_{x(\tau)}} = e^{-\beta[F(\beta, \boldsymbol{\lambda}(\tau)) - F(\beta, \boldsymbol{\lambda}(0)) - \tilde{\mathcal{H}}(x(\tau), \tau) + \tilde{\mathcal{H}}(x(0), 0)]} = e^{-\beta(\Delta F - \Delta E)} \quad (2.56)$$

$$\prod_{t=0}^{\tau-1} \frac{\pi(t)_{x(t+1)}}{\pi(t)_{x(t)}} = e^{-\beta \sum_{t=0}^{\tau-1} [\tilde{\mathcal{H}}(x(t+1), \boldsymbol{\lambda}(t)) - \tilde{\mathcal{H}}(x(t), \boldsymbol{\lambda}(t))]} = e^{-\beta \sum_{t=0}^{\tau-1} \delta \mathcal{Q}(t)_{x(t)x(t+1)}} = e^{-\beta \Delta \mathcal{Q}} \quad (2.57)$$

Kde ΔF a ΔE odpovedajú zmene voľnej energie a vnútornej energie systému pri procese $\{x(0), \boldsymbol{\lambda}(0)\} \rightarrow \{x(\tau), \boldsymbol{\lambda}(\tau)\}$. Veličina $\Delta \mathcal{Q}$ zodpovedá množstvu predaného tepla medzi rezervoárom a systémom počas tohto procesu. Keď spojíme vzťahy (2.56) a (2.57) a dosadíme ich do (2.55), tak dostávame [71]:

$$\frac{\mathcal{P}[x(0) \rightarrow \dots \rightarrow x(\tau)]}{\mathcal{P}[x(\tau) \rightarrow \dots \rightarrow x(0)]} = e^{-\beta(\Delta F - \Delta E + \Delta \mathcal{Q})} = e^{-\beta(\Delta F - \mathcal{W})} \quad (2.58)$$

Kde \mathcal{W} je práca vykonaná počas procesu $\{x(0), \boldsymbol{\lambda}(0)\} \rightarrow \{x(\tau), \boldsymbol{\lambda}(\tau)\}$.

Tento vzťah spája pravdepodobnosť realizácie dopredného a identického spätného procesu, pričom pravdepodobnosti sú škálované faktorom závisiacim len na hodnote vykonanej práce \mathcal{W} (ΔF je pre pevné $\{x(0), \boldsymbol{\lambda}(0)\}$ a $\{x(\tau), \boldsymbol{\lambda}(\tau)\}$ konštantné). To znamená, že dané škálovanie môžeme uplatniť nie len na jednotlivé trajektórie, ale na celkovú pravdepodobnostnú distribúciu vykonaných prác. Na základe tejto úvahy dostávame takzvaný Crooksov flukтуаčný teorém [71]:

$$\frac{\mathcal{P}_F(\mathcal{W})}{\mathcal{P}_R(-\mathcal{W})} = e^{\beta(\mathcal{W} - \Delta F)} \quad (2.59)$$

Kde $\mathcal{P}_F(\mathcal{W})$ a $\mathcal{P}_R(-\mathcal{W})$ odpovedajú pravdepodobnostným distribúciám prác dopredných a spätných simulácií.

Rovnica (2.59) v sebe spája oba hysterézne efekty prítomné v SMD experimentoch (spomenuté v kapitole (2.3.1)). V prípade, že robíme dopredné simulácie (napríklad rozbaľovanie proteínu), budeme s vyššou pravdepodobnosťou získavať hodnoty vykonanej práce \mathcal{W} vyššie ako ΔF . Dôvodom je, že pre $\mathcal{W} > \Delta F$ je člen na pravej strane väčší ako 1 a teda platí, že táto hodnota \mathcal{W} sa bude s vyššou pravdepodobnosťou nachádzať v distribúcií $\mathcal{P}_F(\mathcal{W})$. Ak budeme naopak robiť reverznú simuláciu, tak v tomto prípade bude absolútna hodnota vykonanej práce vo väčšine prípadov menšia ako ΔF . Analogickou argumentáciou zase vidíme, že pre $\mathcal{W} < \Delta F$ je exponenciálny faktor menší ako 1 a teda bude s vyššou pravdepodobnosťou táto hodnota práce prislúchať k distribúcií $\mathcal{P}_R(-\mathcal{W})$ [12, 73].

Zároveň vidíme, že v prípade rovnakého simulačného protokolu pre dopredné a spätné simulácie je pomer distribúcií vykonaných prác nezávislý na tomto protokole a závisí len na hodnote vykonanej práce \mathcal{W} a voľnej energie ΔF . To ale znamená, že tento podiel je pre dostatočne kvalitné vzorkovanie nezávislý na rýchlosti SMD simulácie [73].

Dôsledkom tohto vzťahu je okrem metód uvádzaných v kapitolách (2.3.3) a (2.3.4) aj Jarzynského identita uvedená v kapitole (2.3.1). Túto rovnicu môžeme odvodiť z rovnice (2.59) úpravou na tvar [71]:

$$\mathcal{P}_F(\mathcal{W})e^{-\beta\mathcal{W}} = \mathcal{P}_R(-\mathcal{W})e^{-\beta\Delta F} \quad (2.60)$$

Vidíme, že člen na pravej strane zodpovedá distribúcií $\mathcal{P}_R(-\mathcal{W})$ násobenej konštantou. Avšak, pravdepodobnostné distribúcie $\mathcal{P}_{F/R}(\pm\mathcal{W})$ sú z definície normované na jednotku. To znamená, že pokiaľ rovnicu (2.60) integrujeme voči premennej \mathcal{W} , tak dostávame žiadanú identitu [8, 64]:

$$\langle e^{-\beta\mathcal{W}} \rangle_F = \int \mathcal{P}_F(\mathcal{W})e^{-\beta\mathcal{W}} d\mathcal{W} = e^{-\beta\Delta F} \quad (2.61)$$

2.3.3 Metóda prieniku histogramov

V tejto časti sa bližšie pozrieme na správanie Crooksovho flukтуаčného teorému popísaného rovnicou (2.59). Konkrétne si môžeme všimnúť, že pokiaľ existuje práca \mathcal{W}_{inter} , pre ktorú platí $\mathcal{P}_F(\mathcal{W}_{inter}) = \mathcal{P}_R(-\mathcal{W}_{inter})$, tak dostávame [73]:

$$1 = e^{\beta(\mathcal{W}_{inter} - \Delta F)} \implies \Delta F = \mathcal{W}_{inter} \quad (2.62)$$

Takže vidíme, že ak nájdeme bod prieniku distribúcií prác pre dopredný a reverzný proces, tak tento priesečník odpovedá hodnote voľnej energie ΔF . Na

to, aby sme mohli efektívne pracovať so získanými distribúciami a aby sme minimalizovali problémy spojené s nedostatočným vzorkovaním, sme získané dáta aproximovali gaussovými funkciami $\{\mu_F, \sigma_F\}$ a $\{\mu_R, \sigma_R\}$ vyjadrenými rovnicou:

$$\mathcal{P}_{F/R}(\pm\mathcal{W}) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma^2}} \exp \left\{ -\frac{(\pm\mathcal{W} - \mu_{F/R})^2}{2\sigma_{F/R}^2} \right\} \quad (2.63)$$

Vďaka tomu sme schopní získať výsledky aj v prípade ultra-rýchlych simulácií, kedy dochádza len k minimálnemu (alebo k žiadnemu) prelínaniu sa získaných distribúcií. Aproximácia $\mathcal{P}_F(\mathcal{W})$ a $\mathcal{P}_R(-\mathcal{W})$ pomocou gaussových funkcií je za predpokladu nerovnovážnych SMD simulácií popísaných Langevinou dynamikou a za platnosti Stiff-spring aproximácie (diskutovanej v kapitole (2.2.1)) korektná. Respektíve, pokiaľ sa uplatňujú viaceré mechanizmy prechodu z počiatočnej do finálnej konfigurácie, tak môže dôjsť ku kombinácií gaussových distribúcií, pričom každá z nich podlieha Crooksovmu teorému [9, 12].

Za predpokladu platnosti vzťahu $\mathcal{P}_F(\mathcal{W}_{inter}) = \mathcal{P}_R(-\mathcal{W}_{inter})$ a rovnice (2.62) dostávame kvadratickú rovnicu pre hodnotu voľnej energie ΔF_{Hist} , ktorej riešenie môžeme písať v tvare:

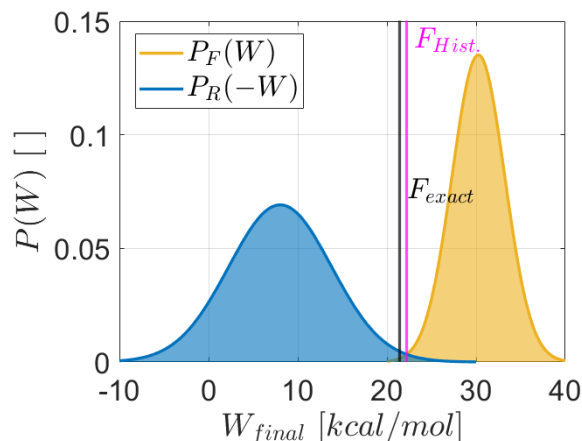
$$\Delta F_{Hist} = \frac{\frac{\langle \mathcal{W} \rangle_F}{\sigma_F^2} + \frac{\langle \mathcal{W} \rangle_R}{\sigma_R^2} \pm \sqrt{\frac{1}{\sigma_F^2 \sigma_R^2} (\langle \mathcal{W} \rangle_F + \langle \mathcal{W} \rangle_R) - 2 \left(\frac{1}{\sigma_F^2} - \frac{1}{\sigma_R^2} \right) \ln \frac{\sigma_F}{\sigma_R}}}{\frac{1}{\sigma_F^2} - \frac{1}{\sigma_R^2}} \quad (2.64)$$

Určenie fyzikálne korektného riešenia vychádzalo z toho, že chceme určiť hodnotu prieniku gaussovských aproximácií, ktorá sa bude nachádzať medzi μ_F a μ_R . Druhé riešenie bolo štandardne mimo tohto intervalu.

Výhoda uvedeného prístupu spočíva v tom, že je len veľmi málo citlivý na vychýlené pozorovania a teda sa nevyznačuje veľkou štatistickou neistotou. Jeden z jeho výsledkov môžeme vidieť na grafe (2.6). V tomto prípade pozorujeme dobrú zhodu aplikovanej metódy (označenej ako $F_{Hist.}$) s presným vývojom F_{exact} .

V niektorých prípadoch nebola kvalita získaných histogramov dostatočná a dochádzalo k ich výraznému prekryvu. Kvôli tomu bolo riešenie kvadratickej rovnice nejednoznačné a výrazne sa odchyľovalo od očakávaných hodnôt (niekedy aj o dva alebo tri rády). Prvou korekciou bolo nahradiť dané body výsledkami FR metódy (vzhľadom na podobnosť spomínaných prístupov).

Táto metóda sa osvedčila v prípade oligopeptidu $(Ala)_{10}$ a v prípade oboch typov študovaných iónových kanálov. Získané riešenie vykazovalo porovnateľnú kvalitu v celom svojom rozsahu a nenachádzali sa v ňom (až na pár výnimiek) žiadne nespojnosti. Tieto výnimky vychádzali priamo zo zlého odhadu strednej hodnoty získaných distribúcií a teda nešli odstrániť.



Obr. 2.6: Aplikácia metódy prieniku histogramov

Avšak, v kontexte A_{2A} receptora, keď metóda prieniku histogramov vykazovala vyššie odchýlky od FR metódy, tento prístup viedol k zlomom v získaných závislostiach, ktoré znižovali kvalitu aproximácie a nemali žiadne fyzikálne opodstatnenie. Prvou variantou, ako odstrániť tieto nespojitosti bolo výsledné trajektórie bez žiadnych dodatočných úprav zhladiť pomocou Savitzkého–Golayovho filtra, ktorý bol schopný efektívne zjemniť prítomné skoky a zároveň výrazným spôsobom neovplyvnil celkový priebeh daných závislostí. Tento prístup ale viedol v oblasti pozorovaných skokov k zvlneniam, ktoré by sa tam za normálnych okolností nemali vyskytovať.

Z toho dôvodu sme oblasti zníženej kvality histogramov interpolovali lineárnou závislosťou. Keďže šírka daných oblastí dosahovala len pár stotín celkovej zmeny reakčnej koordináty, nedochádza pomocou tejto aproximácie k narušeniu celkového priebehu a na uvádzaných krivkách sa v podstate neprejavuje. Následne sme pre odstránenie zlomov medzi lineárnou interpoláciou a štandardne získanými областami na daný výsledok aplikovali dodatočné zhladenie pomocou vyššie spomínaného filtra. Tak ako vyššie, ani v tomto prípade po zhladení nedochádzalo k zásadnej zmene daných charakteristík.

Vyššie uvádzaný prístup vychádzajúci z rovnice (2.62) pracuje len s lokálnym charakterom daných distribúcií, pričom je možné ho rozšíriť aj na ich globálnu charakteristiku. V tomto prípade sa budeme zameriavať na celkový priebeh $\mathcal{P}_F(\mathcal{W})$ a $\mathcal{P}_R(-\mathcal{W})$, pričom rovnicu (2.59) prepíšeme do tvaru:

$$\mathcal{W} = \Delta F + \frac{1}{\beta} \ln \frac{\mathcal{P}_F(\mathcal{W})}{\mathcal{P}_R(-\mathcal{W})} \quad (2.65)$$

To znamená, že na základe získaných histogramov nafitujeme závislosť (2.65).

Hodnota voľnej energie ΔF študovaného procesu bude určená, ako absolútny člen získanej lineárnej závislosti.

Z experimentálneho hľadiska sa musíme obmedziť len na oblasť, kedy dochádza k prekryvu daných histogramov. Experimentálne potvrdenie Crooksovho fluktuáčného teorému na systéme RNA vlásenky P5ab môžeme nájsť v práci [73], kedy bol využitý globálny prístup pomocou rovnice (2.65).

V našej práci sme s rovnicou (2.65) zásadnejším spôsobom nepracovali, pretože by v prípade ultra-rýchlych simulácií vyžadovala na získanie kvalitnejších výsledkov (v porovnaní s rovnicou (2.62)) fitovanie získaných histogramov pomocou adaptívnejších distribučných funkcií. Napríklad pomocou jadrového odhadu s kernelom reprezentovaným gaussovskou distribúciou.

Avšak, tento prístup sa nám zatiaľ neosvedčil, pretože na získanie rozumných aproximácií priebehu voľnej energie vyžadoval vhodnú voľbu šírky jadra. Zároveň bolo nutné vhodne zvoliť šírku fitovanej oblasti, čo sa tiež ukázalo ako netriviálny problém.

2.3.4 FR metóda

Stratégia FR metódy je založená na tom, že distribúcie $\mathcal{P}_F(\mathcal{W})$ a $\mathcal{P}_R(-\mathcal{W})$ aproximujeme gaussovými distribúciami $\{\mu_F, \sigma_F\}$ a $\{\mu_R, \sigma_R\}$, avšak oproti predchádzajúcej kapitole pre ne ešte platí podmienka $\sigma_F = \sigma_R = \sigma$. Teda máme identické distribúcie, ktoré sú voči sebe len posunuté a môžeme ich vyjadriť pomocou vzťahu [6, 66]:

$$\mathcal{P}_{F/R}(\pm\mathcal{W}) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma^2}} \exp\left\{-\frac{(\pm\mathcal{W} - \mu_{F/R})^2}{2\sigma^2}\right\} \quad (2.66)$$

Keď vzťah (2.66) dosadíme do Crooksovho teorému (2.59), tak po úprave dostávame rovnicu:

$$\frac{1}{2\sigma^2}[(\mathcal{W} - \mu_F)^2 - (\mathcal{W} + \mu_R)^2] = \beta(\Delta F - \mathcal{W}) \quad (2.67)$$

Združením členov podľa faktoru \mathcal{W} dostávame, vzťahy pre hodnotu rozptylu σ^2 a pre hodnotu voľnej energie ΔF [6, 66]:

$$\Delta F = \frac{\mu_F - \mu_R}{2} \quad \sigma^2 = \frac{\mu_F + \mu_R}{\beta} = \frac{2}{\beta} \overline{\mathcal{W}}_d \quad (2.68)$$

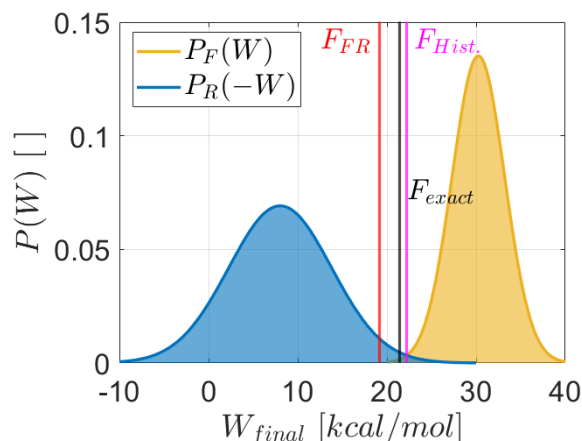
μ_F a μ_R vyjadrujú strednú hodnotu vykonanej práce počas dopredných a spätných simulácií. Takže, aplikáciou transformácie prác spätných simulácií (uvedenej v kapitole (2.3.1)) môžeme voľnú energiu ΔF vyjadriť čisto pomocou priemeru stredných hodnôt μ_F a μ_R (dôjde k zmene znamienka pri μ_R). Ďalej vidíme, že

hodnota rozptylu σ^2 je priamo úmerná teplote (vyššia teplota bude zväčšovať amplitúdu náhodných fluktuácií častíc v systéme) a zároveň je úmerná veľkosti strednej hodnoty disipovanej práce (práce konanej navyše oproti ΔF). Dôvodom je, že $\mu_{F/R}$ môžeme vyjadriť pomocou vzťahu $\mu_{F/R} = \overline{W}_{dF/R} \pm \Delta F$ [6, 66]. Pričítaním a vzájomným odčítaním vyjadrení pre $\mu_{F/R}$ a použitím vzťahov uvedených v rovnici (2.68) dostávame rovnosť $\overline{W}_{dF} = \overline{W}_{dR} = \overline{W}_d$, z čoho vyplýva druhý člen vzťahu pre σ^2 v rovnici (2.68).

Prístup aplikovaný FR metódou je vzhľadom na vyššie uvedený predpoklad $\sigma_F = \sigma_R$ špeciálnym prípadom metódy prieniku histogramov, ktorá apriori nekladie požiadavky na vzťah medzi $\mathcal{P}_F(W)$ a $\mathcal{P}_R(-W)$.

Oproti metóde prieniku histogramov je ale jej výhoda v tom, že za predpokladu $\sigma_F = \sigma_R$ nepotrebujeme určiť celú pravdepodobnostnú distribúciu. Stačí len získať dostatočne veľa trajektórií na to, aby sme vedeli s prijateľnou presnosťou popísať strednú hodnotu tohto rozdelenia [66].

Porovnanie daných metód uvádzame v grafe (2.7). Vidíme, že ak neplatí $\sigma_F = \sigma_R$ (v tomto prípade $\sigma_R/\sigma_F \approx 2.0$), je oproti F_{exact} výsledok FR metódy F_{FR} vychýlený (v tomto prípade $\approx 10.8\%$). Na druhej strane, výsledok metódy prieniku histogramov $F_{Hist.}$ je oveľa presnejší s vychýlením $\approx 3.6\%$.



Obr. 2.7: Porovnanie FR metódy a metódy prieniku histogramov

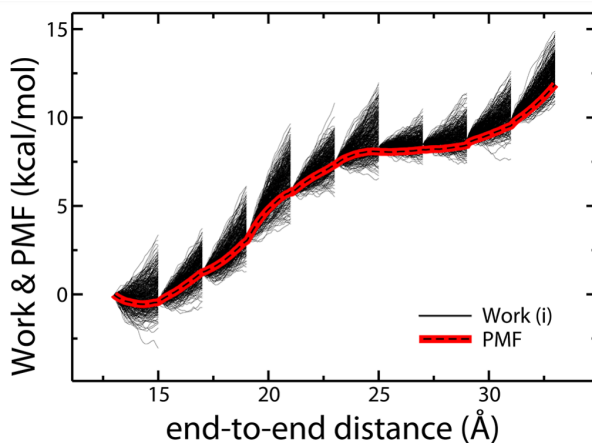
2.3.5 Delenie simulácií na intervaly

Ďalším prístupom na určenie priebehu voľnej energie ΔF , ktorý nepredstavuje novú metódu, ale je spôsobom ako zlepšiť získané výsledky je delenie simulácií na intervaly. Príklad jeho využitia môžeme vidieť v grafe (2.8). Prvým krokom je urobenie jednej rýchlej nerovnovážnej simulácie, z ktorej extrahujeme konfi-

gurácie vo vopred definovanej množine medzikrokov. Tieto konfigurácie následne ekvilibrujeme, pričom počas ekvilibrácie udržujeme konštantnú hodnotu reakčnej koordináty ξ . Po ekvilibrácii získame množinu ustálených konfigurácií, z ktorých môžeme vykonávať jednotlivé čiastkové simulácie. Výsledky z týchto simulácií následne spájame a rekonštruujeme priebeh krivky voľnej energie pre celkový vývoj študovaného procesu.

Výhodou tohto prístupu je jeho zjavná paralelizovateľnosť. Najprv síce musíme vykonať jednu počiatočnú simuláciu (jej nároky sú štandardne zanedbateľné), ale potom môžeme daný výpočet paralelizovať minimálne takým množstvom procesorov, ako je množstvo použitých intervalov.

Ďalšia výhoda sa ukazuje znova na obrázku (2.8), kedy vidíme, že s progresom simulácií na jednotlivých intervaloch sa vo veľkom množstve trajektórií vzdalujeme od presného vývoja aproximovaného krivkou “PMF”. Toto vzdalovanie sa je spôsobené nerovnovážnosťou vykonávaných simulácií a je možné ho potlačiť pomocou delenia celkovej trajektórie na intervaly, kedy v novom intervale znova začíname z rovnovážnej konfigurácie. Pomocou tohto prístupu znižujeme pozorované odchýlky, ktoré by sa priebehom simulácie akumulovali a zhoršovali by kvalitu aproximácie ΔF .



Obr. 2.8: Delenie simulácií na intervaly [7]

3. Ciele práce

Hlavným cieľom tejto diplomovej práce je:

- Získať pomocou nerovnovážnych SMD simulácií profil voľnej energie pri foldingu modelového systému $(Ala)_{10}$ vo vákuu. Vyhodnotiť získané výsledky pomocou Jarzynského identity a jej kumulantov, FR metódy a metódy prieniku histogramov. Rozdeliť simulácie na intervaly a znova aplikovať spomínané metódy. Porovnať získané výsledky s literatúrou.
- Analogicky študovať folding solvatovaného $(Ala)_{10}$ a porovnať získané výsledky s literatúrou.
- Aplikovať metodiku (otestovanú na $(Ala)_{10}$) na komplex adenosínového A_{2A} GPC receptoru s kofeínom, ukotveného vo fragmente bunkovej membrány a obklopeného vodnou obálkou. Získať profil väzbovej voľnej energie ligandu.
- Obdobne pomocou nerovnovážnych SMD simulácií študovať priechod iónu modelovým membránovým kanálom Gramicidínom A. Vzhľadom k rozporuplným výsledkom v literatúre otestovať vplyv rôznej kompozície bunkovej membrány, prítomnosti iónov solí KCl a úprav koncových aminokyselín monomérych jednotiek Gramicidínu A na profil voľnej energie tranzitu testovacieho iónu K^+ .
- Aplikovať metodiku (otestovanú na modelovom systéme Gramicidínu A) na iónový kanál TRPM2 v otvorenom a uzavretom stave. Určiť profil voľnej energie tranzitu testovacieho iónu Ca^{2+} .
- Diskutovať výhody a limity rôznych metód aproximácie voľnej energie.
- Diskutovať ďalšie možnosti využitia prístupov uplatnených pri riešení tejto diplomovej práce.

4. Technické detaily

Simulované systémy boli vytvorené pomocou softwarového balíka VMD. V prípade komplikovanejších systémov (vodná obálka, fragment bunkovej membrány,...) sme ich predprípravu uskutočňovali v prostredí QwikMD [37]. Molekuly vody sme popisovali modelom TIP3P. Pokiaľ bolo nutné niektorý zo systémov vložiť do fragmentu bunkovej membrány, tak sme štandardne používali lipidy typu POPC. V niektorých prípadoch sme používali aj membránu s lipidmi typu POPE. Pokiaľ dôjde k tejto zámene, tak na ňu explicitne upozorníme a dôvody budeme diskutovať. Stručnú charakterizáciu jednotlivých typov lipidov môžeme nájsť v kapitole (1.6).

Všetky nižšie prezentované výsledky boli získané pomocou simulačného programového balíka NAMD [51] v prostredí super-počítačového strediska MetaCentrum. Veľkosť časového kroku Δt bola volená, ako $\Delta t = 2$ fs. Vzhľadom na veľkosť tohto kroku sme uvažovali tuhé vodíkové väzby. Okrem simulácií vo vákuu, boli na všetky systémy aplikované periodické okrajové podmienky uvedené v kapitole (2.1.1). Elektrostatické interakcie boli počítané pomocou Particle mesh Ewald method (PME), ktorú sme diskutovali v kapitole (2.1.5). Hodnota parametra r_{cut} (popísaného v kapitole (2.1.2)) bola zvolená ako $r_{cut} = 12$ Å.

Najprv bola vždy urobená minimalizácia energie systému. Žihanie sme uskutočňovali z teploty 60 K na teplotu 300 K, pričom zmena teploty o 1 K bola nasledovaná vývinom systému po dobu 600 molekulárne-dynamických krokov za atmosférického tlaku (celkovo sme urobili 144000 MD krokov, respektíve sme žihali po dobu 288 ps). Nakoniec sme systém ekvilibrovali v kontexte štandardných laboratórnych podmienok ($T = 300$ K a $p = 1$ atm) a aj počas následného produkčného výpočtu sme systémy udržiavali na štandardnej teplote a tlaku. Teplota bola udržiavaná pomocou Langevinovho termostatu. Tlak systému sme kontrolovali pomocou kombinácie Nose-Hooverovho barostatu a Langevinovej dynamiky (tak ako sme spomínali v kapitole 2.1.4).

Získané dáta sme analyzovali s využitím programového balíka VMD a pomocou vlastných kódov napísaných v jazyku TCL (s ktorým je prostredie VMD kompatibilné) [74, 75]. Ďalšie spracovanie a vytváranie výsledných grafov bolo uskutočnené v programovacom prostredí jazyka Matlab, respektíve pomocou programovacieho jazyka Python [76, 77].

5. Výsledky

5.1 Deca-alanín vo vákuu

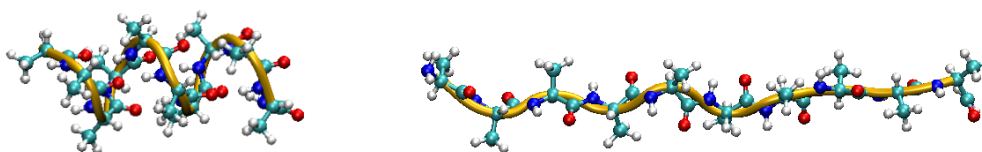
Ako sme už spomenuli v kapitole (1.1)), prvým z nami študovaných systémov bol oligopeptid $(Ala)_{10}$. V prvom prípade sme simulácie tohto modelového systému s veľkosťou 104 atómov vykonávali vo vákuu.

Parametrizácia bola zabezpečená silovým poľom CHARMM22. Počas všetkých nižšie uvedených simulácií sme uvažovali atóm dusíka na N -konci zafixovaný, pričom jeho pozícia bola v počiatku sústavy súradníc. Dusíkový atóm C -konca bol spojený s virtuálnym atómom (používaným počas SMD simulácie) pomocou harmonického potenciálu s tuhosťou k o hodnote $k = 7.2 \text{ kcal/mol/Å}^2$. Osa α -helixu sa prekrývala s osou z , pričom poloha dusíkového atómu C -konca mala súradnice $\{0,0,13\} \text{ Å}$.

Každá z nižšie uvádzaných simulácií musela byť počítaná s využitím aspoň dvoch procesorov. Toto obmedzenie vyplývalo zo zistenia, že v prípade krátkych simulačných časov (20 ps, respektíve 200 ps), za použitia jedného procesoru, plánovací systém priradovania úloh MetaCentra priradí rovnakému stroju (v tom istom čase) dve alebo viac úloh. Avšak, keďže seed generátorov náhodných čísel je aktuálnym časom daného stroja, v týchto prípadoch dochádzalo ku generovaniu identických sekvencií pseudonáhodných čísel. Vďaka tomu sme ale získali identickú distribúciu hybností (pochádzajúcej od Langevinovho termostatu), čo spôsobilo, identický vývoj daných systémov a zhoršenie výslednej štatistiky. Za použitia dvoch a viac procesorov sa tieto komplikácie už nevyskytovali (a to ani v ďalších kapitolách).

5.1.1 Dopredné simulácie

Najpriamočiarejšou metódou určenia profilu voľnej energie pre proces foldingu $(Ala)_{10}$ sú takzvané dopredné simulácie, kedy sa ale simuluje presne opačný proces, to znamená unfolding $(Ala)_{10}$. Prechod deca-alanínu z počiatočného helikálneho do finálneho plne rozvinutého usporiadania môžeme vidieť na obrázku (5.1).



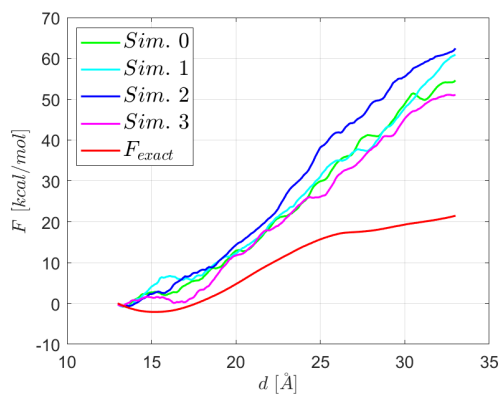
Obr. 5.1: Helikálna (vľavo) a rozvinutá (vpravo) konfigurácia $(Ala)_{10}$

Najprv sme urobili niekoľko dopredných molekulárne dynamických simulácií s narastajúcou hodnotou simulačného času t (20 ps-200 ps-2 ns-20 ns-200 ns) a s postupne klesajúcou rýchlosťou virtuálneho atómu. Pohyb tohto atómu prebiehal v smere osi z po dráhe 20 Å.

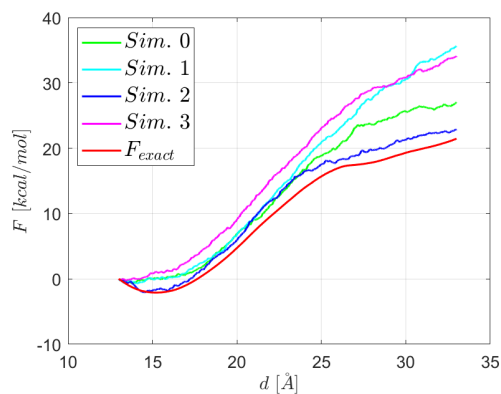
Tento postup sme zopakovali štyrikrát, pričom sme sledovali rozdiely vo vykonanej práci, ktoré sa s narastajúcim simulačným časom (a teda aj klesajúcou rýchlosťou virtuálneho atómu) postupne znižovali. Na grafoch (5.2) až (5.6) uvádzame vývoj spomínaných odhadov ΔF - *Sim. i*, kde i označuje číslo simulácie.

V prípade 200 ns trajektórií boli rozdiely priebehov vykonanej práce \mathcal{W} už zanedbateľné. Tento vývoj (v grafoch označený červenou krivkou F_{exact}) sme následne v rámci tejto kapitoly považovali za referenčný a porovnávali voči nemu zvyšné výsledky.

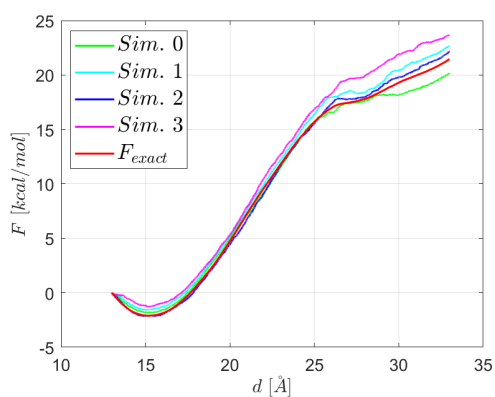
Je zrejmé, že s narastajúcou hodnotou reakčnej koordináty dochádza na začiatku simulácie k dodatočnej stabilizácii α -helikálnej štruktúry $(Ala)_{10}$, kedy minimum voľnej energie pozorujeme v oblasti ≈ 15 Å. S následným prudkým nárastom ΔF počas toho, ako dochádza k narúšaniu vodíkových väzieb v α -helikálnom usporiadaní $(Ala)_{10}$. S ďalším zvyšovaním reakčnej koordináty pozorujeme v intervale $\approx 26 - 28$ Å vytvorenie plata. Tento vývoj je spôsobený rozrušením všetkých intramolekulárnych vodíkových väzieb a následným narovnávaním peptidu. V oblasti $\approx 28 - 33.0$ Å pozorujeme už len natahovanie väzieb v peptidovej kostre, zodpovedných za zmenu energie ≈ 4 kcal/mol, čo tvorí až $\approx 18.5\%$ finálnej hodnoty.



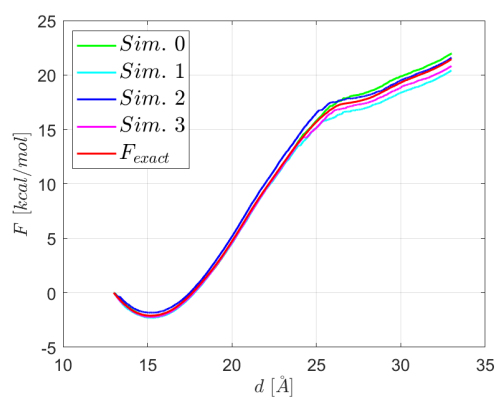
Obr. 5.2: Vývoj počas dopredných 20 ps simulácií



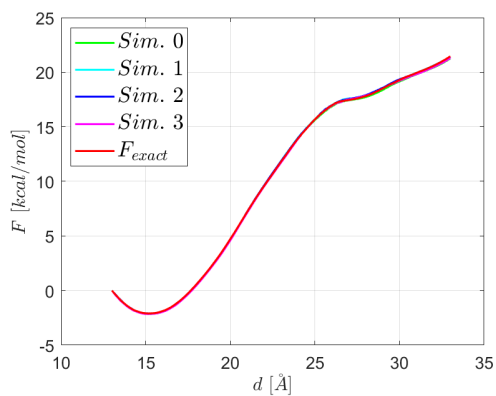
Obr. 5.3: Vývoj počas dopredných 200 ps simulácií



Obr. 5.4: Vývoj počas dopredných 2 ns simulácií



Obr. 5.5: Vývoj počas dopredných 20 ns simulácií



Obr. 5.6: Vývoj počas dopredných 200 ns simulácií

Ďalej sme urobili série kratších simulácií s rôznou dĺžkou simulačného času t (20 ps-200 ps-2 ns-20 ns), pričom počty trajektórií n sme volili tak, aby sme zachovali maximálnu veľkosť kumulatívneho času $t_{cum} = 200$ ns. Konkrétne hodnoty sú uvedené v tabuľke (5.1). Pre každú voľbu parametrov n a t sme simulácie opakovali štyri krát, aby bolo možné odhadnúť ich chybu.

Tabuľka 5.1: Počet n a dĺžka t serií dopredných simulácií $(Ala)_{10}$ vo vákuu

| t [ns] | n [] | | | |
|----------|---------|-----|------|--------|
| 0.02 | 10 | 100 | 1000 | 10 000 |
| 0.20 | 10 | 100 | 1000 | – |
| 2.00 | 10 | 100 | – | – |
| 20.0 | 10 | – | – | – |

Na obrázku (5.7) uvádzame výsledky dopredných simulácií systému $(Ala)_{10}$ vo vákuu. Veličina d predstavuje z -ovú komponentu polohy virtuálneho atómu (mieru natiahnutia $(Ala)_{10}$). Tabuľka na tomto obrázku priraduje k daným grafom počet stredovaných trajektórií n a simulačný čas t . Odhad vývoja ΔF pomocou prostého aritmetického priemeru sme označili F_1 . Ako F_{exp} sme označili aproximáciu pomocou Jarzynského identity a ako F_2 aproximáciu rozvojom do druhého kumulantu. Detailnejšie zobrazenie výsledkov uvádzame v prílohe (E.2).

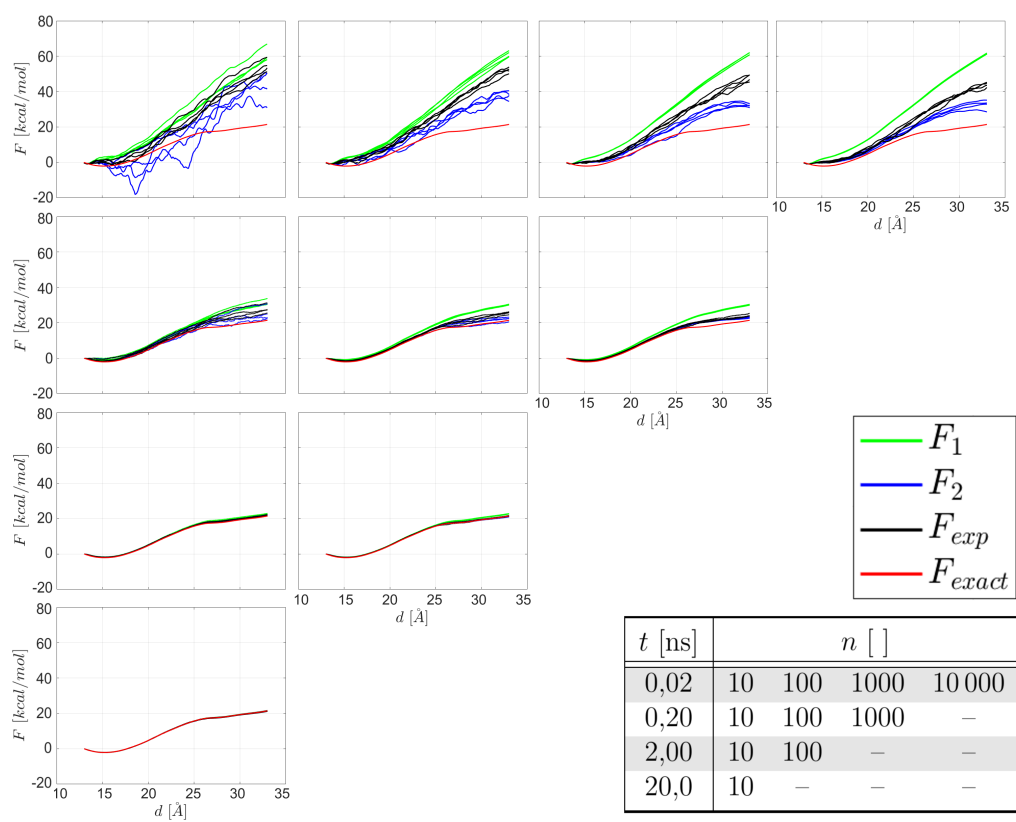
Pre najkratšie molekulárne dynamické simulácie o dĺžke $t = 20$ ps pozorujeme, že všetky tri metódy vyhodnotenia (F_1 , F_2 a F_{exp}) sa výrazne odlišujú od rovnovážneho vývoja F_{exact} a zdieľajú len spoločnú rastúcu tendenciu ΔF .

Ako vidíme na krivke F_1 , dôvodom je veľká miera nevratnosti, kedy značne zvyšujeme entropiu systému, kvôli čomu musíme konať väčšie množstvo práce.

Na týchto príkladoch zároveň vidíme obmedzenie platnosti Jarzynského identity, ktorá (ako sme uviedli v kapitole (2.3.1)) platí len v limite nekonečného počtu stredovaných trajektórií. Pri konečnom počte trajektórií je podstatné, aby sme od rovnovážneho vývoja neboli vzdialení príliš.

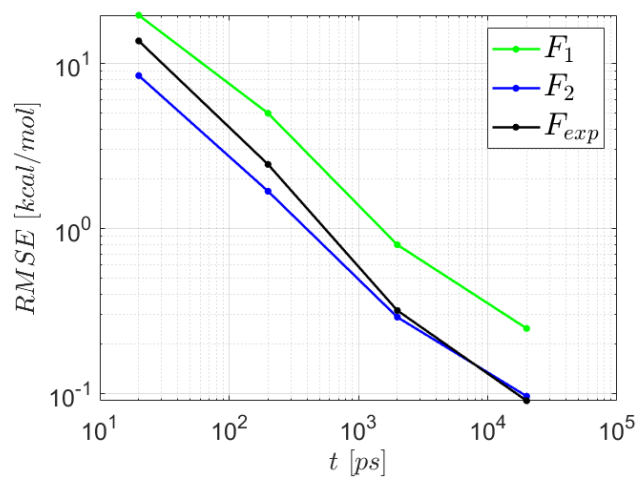
V prípade aproximácie druhým kumulantom pozorujeme pri 10 stredovaných trajektóriách značné oscilácie. Tieto oscilácie sú spôsobené chaotickým vývojom systému (prudko sa mení hodnota rozptylu σ_F^2) a s vyšším počtom stredovaných trajektórií sa strácajú.

Pre vyššie hodnoty simulačných časov pozorujeme, že aj kumulantové rozvoje dávajú pomerne dobré výsledky. Exponenciálne stredovanie F_{exp} prekonáva rozvoj do druhého kumulantu F_2 až pre simulácie o dĺžke $t = 20$ ns. Aproximácia pomocou aritmetického priemeru F_1 systematicky nadhodnocuje rovnovážny vývoj (v súlade so vzťahom (2.40)). Navýšením simulačného času dochádza k zlepšeniu, pričom pre $t = 2$ ns pozorujeme už aj tu veľmi dobrú zhodu s rovnovážnym vývojom.



Obr. 5.7: Aproximácie vývoja ΔF dopredných simulácií $(Ala)_{10}$ vo vákuu

Toto správanie zobrazujeme ešte na grafe (5.8), kde sme na logaritmickú škálu pre rôzne simulačné časy uviedli priemernú odchýlku (v zmysle RMSE, alebo root mean square error) získaných aproximácií od rovnovážneho vývoja. Ako vidíme, pre nerovnovážne simulácie o dĺžke $t = 200$ ps je táto chyba, v prípade F_2 , už len ≈ 1 kcal/mol.



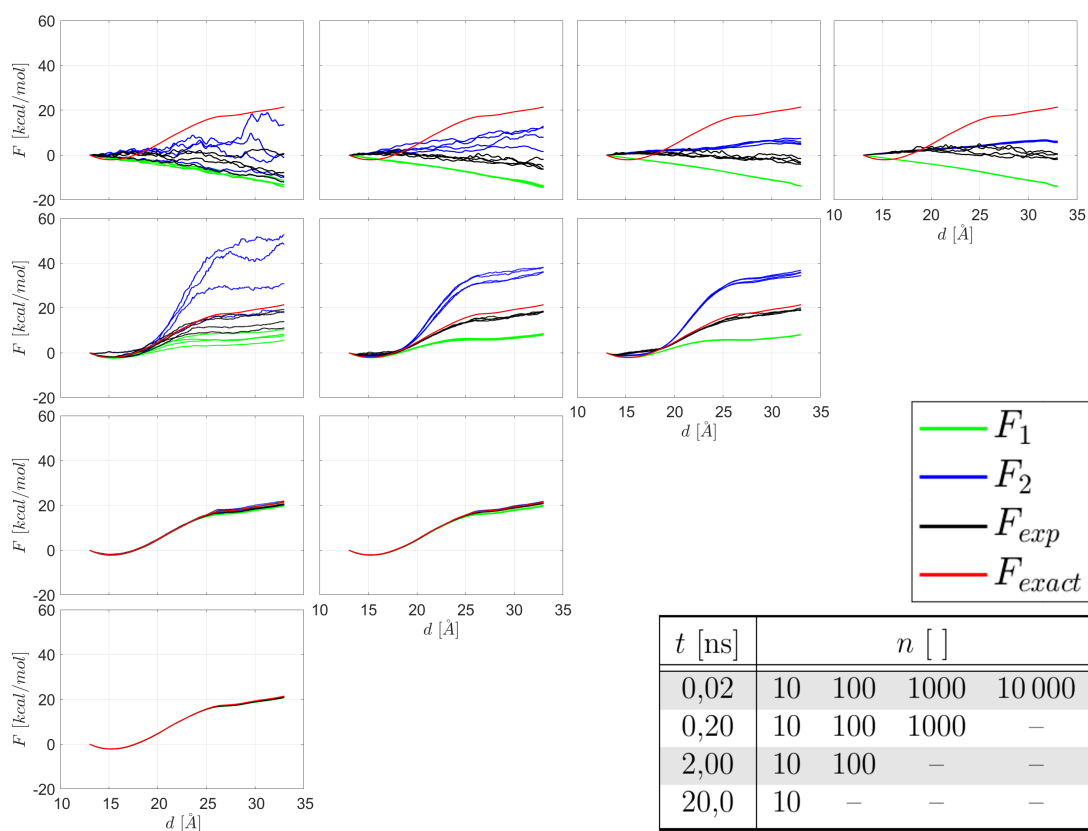
Obr. 5.8: Odchýlky dopredných sim. od ΔF vo vákuu pre rôzne t

5.1.2 Spätne simulácie

Ako vyplýva z kapitoly (2.3), zlepšenie výsledkov dopredných simulácií sa dá realizovať pomocou analogického setu spätých simulácií a s použitím dôsledkov Crooksovho teorému (2.59).

Z hľadiska simulačného času a počtu stredovaných trajektórií sme znova postupovali podľa tabuľky (5.1). Počiatočná konfigurácia bola charakterizovaná rozbaľenou štruktúrou ekvilibrovanou po dobu 4 ns. Pohyb virtuálneho atómu prebiehal v zápornom smere osi z .

Získané výsledky uvádzame na obrázku (5.9). Detailnejšie zobrazenie je dostupné v prílohe (E.3).



Obr. 5.9: Aproximácie vývoja ΔF spätých simulácií $(Ala)_{10}$ vo vákuu

Spätne simulácie vykonávané z rovnovážnej konfigurácie odpovedajú obráteniu časového vektora. Aby sme mohli jednoduchšie porovnávať výsledky dopredných a spätých simulácií (a jednoduchšie ich počas vyhodnocovania kombinovať), posunuli sme v grafoch nulovú hladinu ΔF tak, aby pre hodnotu $d = 13 \text{ \AA}$ platilo

$\langle \mathcal{W} \rangle_R(d) = 0$ kcal/mol. Pripomeňme, že potom bolo nevyhnutné pracovať s Jarzynského rovnicou a jej kumulantmi odvodenými na základe pravdepodobnostnej distribúcie $\mathcal{P}_R(-\mathcal{W})$ (uvedenej v kapitole 2.3.1).

Z kriviek aritmetických priemerov F_1 je zrejmé, že pre všetky získané výsledky platí $\langle \mathcal{W} \rangle_R < \Delta F$. Spolu s krivkami F_1 z dopredných simulácií tak dostávame obmedzenie ΔF z oboch strán, čo využijeme ďalej v prípade FR metódy a metódy prieniku histogramov.

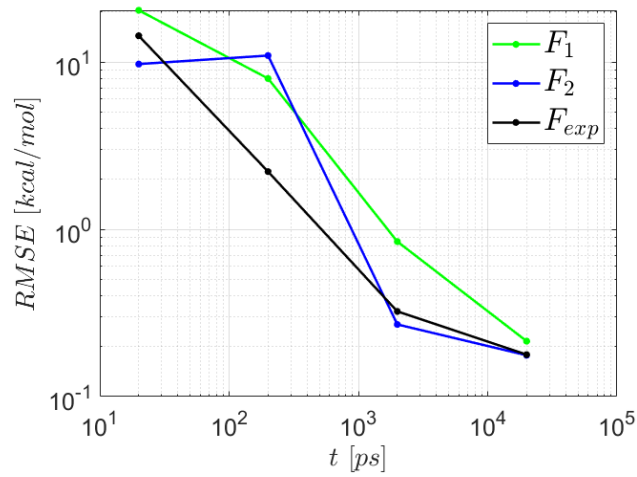
Pokiaľ sa pozrieme na krivku F_{exact} , tak je zrejmé, že plne natiahnutý $(Ala)_{10}$ bude samovoľne konať prácu a prechádzať do energeticky výhodnejšej helikálnej konfigurácie. Kvalitatívne rovnaký priebeh ako referenčná rovnovážna krivka F_{exact} majú aj krivky F_1 v prípade simulácií s časom $t \geq 200$ ps, alebo dlhším. Avšak, v prípade simulačného času s hodnotou $t = 20$ ps vidíme, že krivka F_1 má klesajúcu tendenciu. To znamená, že práca disipovaná v dôsledku pôsobenia virtuálneho atómu mala vyššiu hodnotu ako bola veľkosť vykonanej práce $(Ala)_{10}$ pri spontánnom foldingu.

Z toho dôvodu sme analyzovali, aké percento spätných simulácií vykazuje výsledné nehelikálne usporiadanie $(Ala)_{10}$. V prípade simulácií o dĺžke $t = 20$ ps mal tento mechanizmus foldingu 100% príspevok. S predlžovaním simulačného času sa jeho príspevok postupne znižoval, pričom pre $t = 200$ ps dostávame 12,76% a pre $t = 2$ ns už len 0,68%. Pre vyššie hodnoty t sa už neprejavil.

Simulácie, ktoré tomuto javu prislúchali sme z vyhodnotenia odstránili (okrem 20 ps simulácií). Pokiaľ by sme to neurobili, tak by sme nemohli použiť FR metódu a ani metódu prieniku histogramov kvôli predpokladom Crooksovho teorému, resp. výsledky by boli viac, či menej skreslené. Kvôli tomuto obmedzeniu majú výsledky pre $t = 20$ ps uvádzané v kapitolách (2.3.4) a (2.3.3) len informačný charakter.

Odstránenie nehelikálnych konfigurácií bolo zabezpečené voľbou thresholdu odchýlenia od počiatočnej helikálnej konfigurácie $RMSE = 2.44$ Å. Táto hodnota bola určená, ako maximálne vychýlenie zaznamenané v priebehu rovnovážnej simulácie $(Ala)_{10}$ o dĺžke 4 ns s hodnotou parametra $d = 13$ Å. Sprísňovanie tohto kritéria nemalo na vývoj F_2 pre $t = 200$ ps v podstate žiaden pozitívny vplyv, len dochádzalo k zmenšovaniu kvality dát nedostatočným stredovaním.

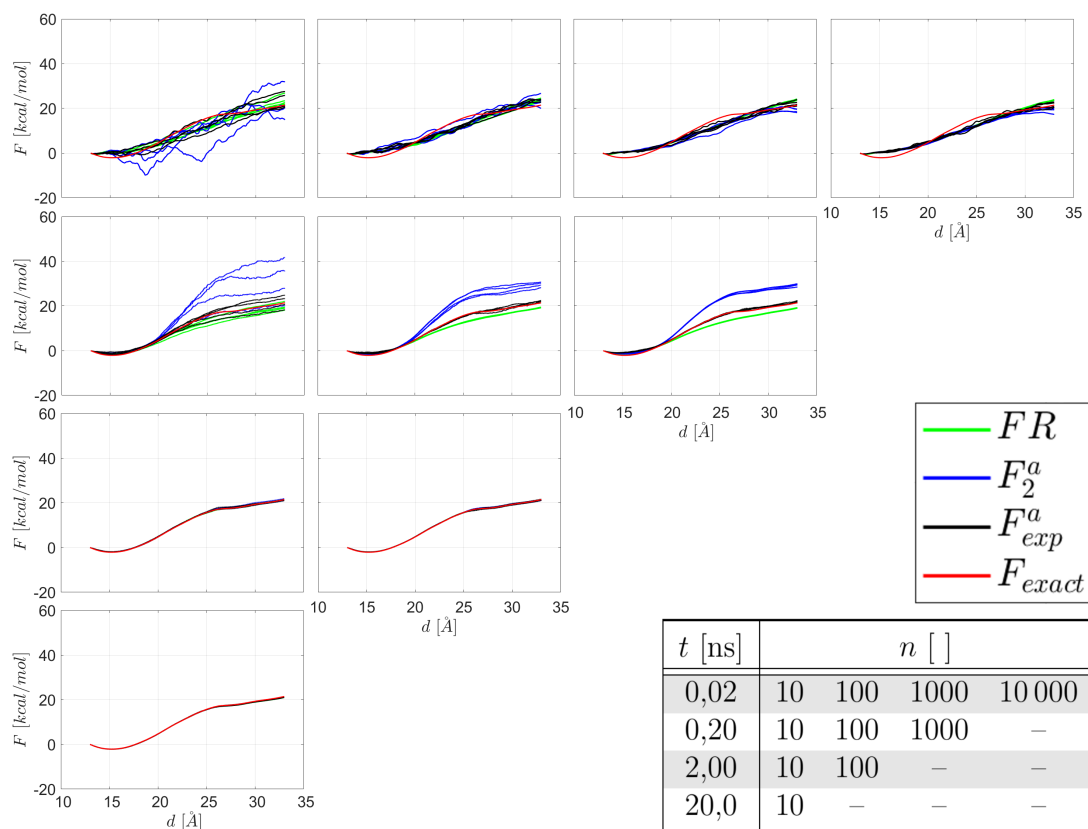
Na grafe (5.10) vidíme, že kvalita jednotlivých metód vyhodnotenia už nie je taká jednoznačná, ako tomu bolo pri dopredných simuláciách. V prípade 200 ps simulácií pozorujeme výraznú chybu F_2 . Táto chyba sa už pre iné časy neprejavuje a je pravdepodobne spôsobená vplyvom čiastočného misfoldingu $(Ala)_{10}$, ktorý sme neboli schopní z našich výsledkov odstrániť a ktorý nutne prispieva k zvýšeniu rozptylu σ_R^2 vystupujúceho vo vzťahu (2.48). Zvyšné metódy F_1 a F_{exp} vykazujú rovnomerné zlepšovanie kvality aproximácie s narastajúcim simulačným časom analogicky ako v predchádzajúcej podkapitole. V prípade Jarzynského identity to je zapríčinené tým, že misfolding sa prejavuje nižšou absolútnou hodnotou práce ako ΔF , čo vďaka transformácií rovnice (2.38) do tvaru (2.44) pre spätné simulácie, nebude exponenciálnym priemerom preferované.



Obr. 5.10: Odchýlky spätných sim. od ΔF vo vákuu pre rôzne t

5.1.3 FR metóda

Vzhľadom na to, že už máme k dispozícii výsledky dopredných a spätných simulácií, môžeme na určenie priebehu ΔF využiť FR metódu z kapitoly (2.3.4), priemer výsledkov získaných pomocou Jarzynského identity F_{exp}^a a jej rozvoja do druhého kumulantu F_2^a (uvedených v kapitole 2.3.1). Získané výsledky uvádzame na obrázku (5.11). Detailnejší náhľad je prístupný v prílohe (E.4).



Obr. 5.11: Aproximácie vývoja ΔF pre $(Ala)_{10}$ vo vákuu pomocou FR metódy

Použitie FR metódy, respektíve priemerovania výsledkov dopredných a spätných behov aj pre zvyšné spôsoby vyhodnotenia výrazne zlepšilo odhady ΔF .

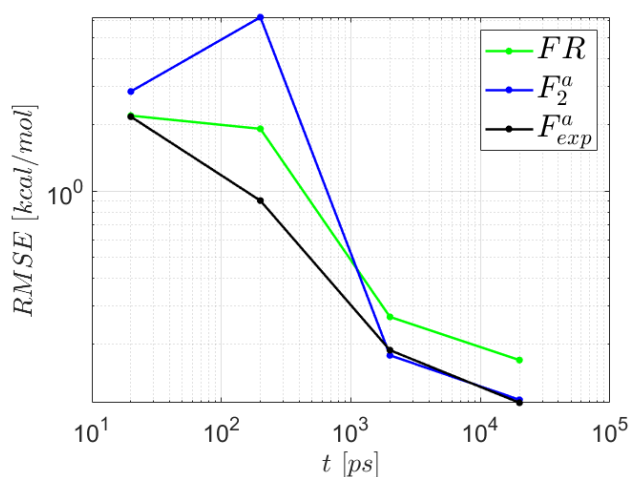
Pre najrýchlejšie simulácie o čase $t = 20$ ps, dostávame odhad finálnej hodnoty ΔF , ktorý sa príliš neodlišuje od referenčnej hodnoty. To ale môže viesť k zavádzajúcim záverom. Je dôležité si všimnúť odlišnosti v priebehu daných kriviek. Tie sa vyskytujú vďaka tomu, že v spätných behoch vôbec nedochádzalo k foldingu do helikálneho usporiadania.

Výsledky pre $t = 200$ ps sú pre FR metódu a F_{exp}^a veľmi dobré už aj z hľadiska

priebehu uvádzaných kriviek. Zlá kvalita výsledkov F_2^a je dôsledkom zlej kvality spätných simulácií.

Pre $t = 2$ ns a $t = 20$ ns sú odhady získané zo spomínaných metód prakticky nerozlíšiteľné od rovnovážneho vývoja. To znamená, že použitím FR metódy sme získali rádové zlepšenie presnosti výsledného odhadu ΔF (v porovnaní s výsledkami dopredných a spätných simulácií uvádzaných v grafoch (5.7) a (5.9)).

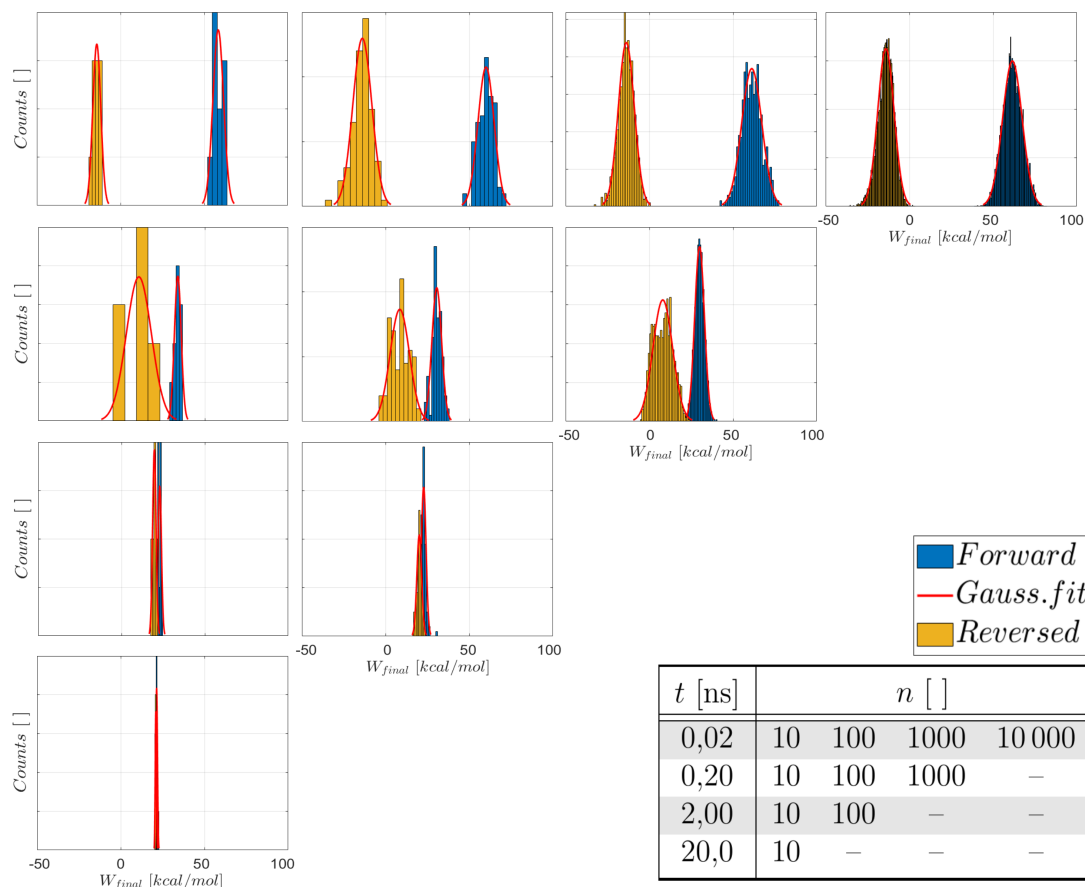
V grafe (5.12) uvádzame kvantitatívne porovnanie jednotlivých odhadov, pričom vidíme, že v prípade $(Ala)_{10}$ (pre $t = 200$ ps) dostávame najlepšie výsledky pomocou priemeru Jarzynského identity. Ten, ako sme už spomínali, nie je citlivý na vplyv misfoldingu $(Ala)_{10}$. Vo zvyšných prípadoch sú získané výsledky (vzhľadom na logaritmickú škálu grafu) veľmi podobné.



Obr. 5.12: Odchýlky FR metódy od ΔF vo vákuu pre rôzne t

5.1.4 Metóda prieniku histogramov

Ďalším prístupom kolektívneho vyhodnotenia spätných a dopredných simulácií, je metóda prieniku histogramov. Pre lepšiu predstavu s akými dátami sme pracovali uvádzame na obrázku (5.13) histogramy (a ich gaussovské aproximácie) z finálnych snímok molekulárne dynamických simulácií.



Obr. 5.13: Histogramy použité v metóde prieniku histogramov pre $(Ala)_{10}$ vo vákuu

V prípade najkratších $t = 200$ ps simulácií sú uvádzané histogramy výrazne posunuté a nevykazujú žiaden spoločný prienik. Ako sme spomínali v kapitole (2.3.3), v takýchto prípadoch sa uplatnila použitá aproximácia, kedy sme získané histogramy fitovali gaussovou distribúciou. Vďaka tomu sme boli schopní odhadnúť polohu hľadaného prieniku.

Absencia spoločného prieniku histogramov pre $\mathcal{P}_{F/R}(\pm\mathcal{W})$ zahŕňa v prvom rade vysokú mieru nevratnosti daných simulácií, ale zároveň aj odlišný mechanizmus

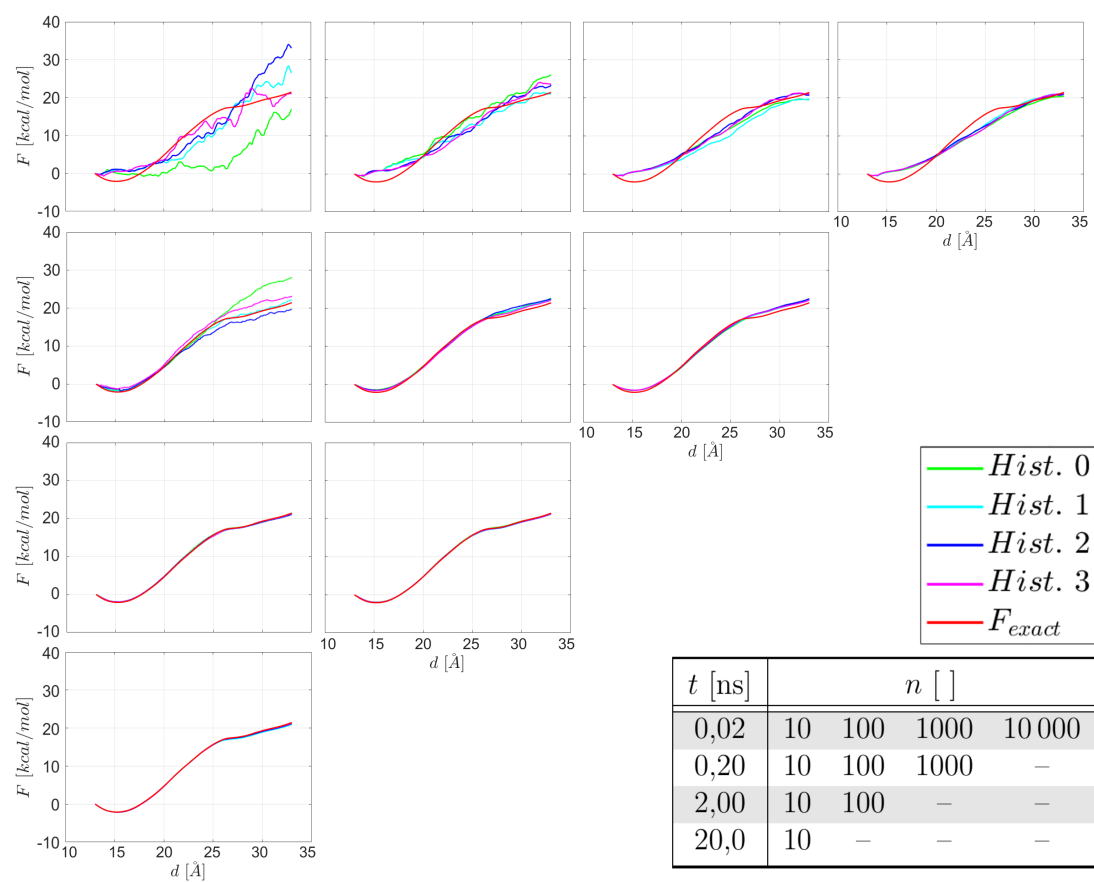
dopredných a spätných behov, kedy pri spätných behoch nedochádza k vráteniu sa $(Ala)_{10}$ do helikálneho usporiadania. Je zaujímavé, že s dostatočným vzorkovaním aj tu získavame gaussovský charakter $\mathcal{P}_{F/R}(\pm\mathcal{W}_{final})$, čo napovedá o dobrej platnosti stiff-spring aproximácie.

V prípade $t = 200$ ps simulácií sa zdá, že distribúcia $\mathcal{P}_R(-\mathcal{W}_{final})$ spätných simulácií je zložená z dvoch gaussových funkcií, čo dobre korešponduje s prítomnosťou dvoch mechanizmov foldingu (respektíve misfoldingu) deca-alanínu, ako sme spomínali v kapitole (5.1.2). V tejto kapitole sme uvádzali, že sme sa spomínaný efekt snažili odstrániť zvýšením nárokov na filtrovanie finálnych konfigurácií, ale bez väčších úspechov (kedy sme pozorovali skôr dodatočné zhoršenie kvality).

Predlžovanie simulačného času vedie k zužovaniu a prekryvaniu sa daných distribúcií vďaka postupnému prechodu od nerovnovážneho k rovnovážnemu vývoju. Porovnaním grafov v jednotlivých stĺpcoch zhora nadol pozorujeme, že sa poloha ich prienikov takmer nemení, čo umožňuje urobiť rozumný odhad hodnoty voľnej energie aj pre kratšie simulačné časy.

Na obrázku (5.14) uvádzame výsledky, ktoré sme získali aplikáciou spomínanej metódy. Tak ako v prechádzajúcich kapitolách, aj v tomto prípade uvádzame detailnejšie verzie čiastkových grafov v prílohe (E.5).

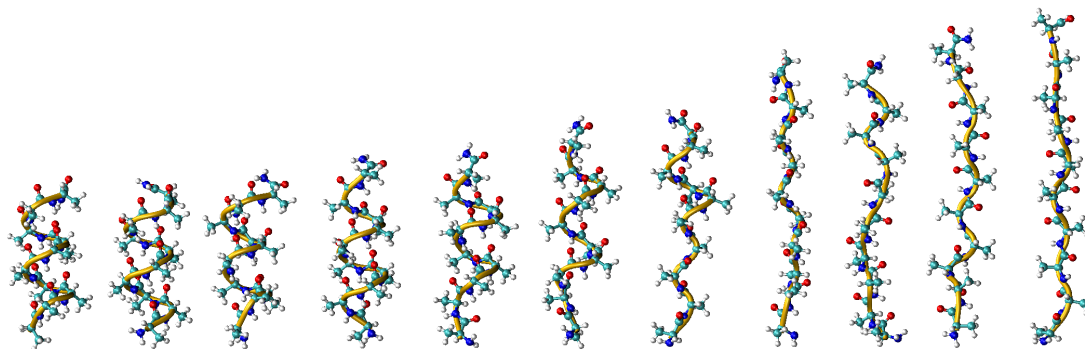
Priebeh kriviek je veľmi podobný priebehu získanému v predchádzajúcej kapitole použitím FR metódy. To nie je až tak prekvapivé vzhľadom k podobnostiam daných metód. Avšak, pri najmenšom počte opakovaní $n = 10$ a krátkych simuláciách ($t = 20$ ps resp. $t = 200$ ps), je táto metóda vďaka nízkej kvalite histogramov trochu horšia ako FR metóda, alebo ako priemerovanie výsledkov získaných pomocou Jarzynského identity. Na druhú stranu, v prípade $t = 200$ ps simulácií dáva metóda prieniku histogramov lepšie výsledky ako FR metóda, ktorá je citlivejšia na prítomnosť dvoch mechanizmov foldingu. Kvalita výsledkov získaných v predchádzajúcej kapitole pomocou Jarzynského identity je v tomto prípade porovnateľná.



Obr. 5.14: Aproximácie vývoja ΔF pre $(Ala)_{10}$ vo vákuu pomocou prieniku histogramov

5.1.5 Delenie trajektórií na podintervaly

Ďalej sme celkový vývoj riadeného unfoldingu, respektíve foldingu $(Ala)_{10}$ rozdelili do 10 separátnych simulácií. Počiatočné konfigurácie jednotlivých medzistavov, pre rôzne hodnoty reakčnej koordináty 13, 15, ..., 31, 33 Å, sme získali z doprednej simulácie o dĺžke 20 ns, pričom sme ich dodatočne ekvilibrovali po dobu 4 ns. Získané konformácie uvádzame na obrázku (5.15).



Obr. 5.15: Východzie konfigurácie $(Ala)_{10}$ v priebehu intervalových simulácií (vákuum)

Potom sme na všetkých desiatich subintervaloch o dĺžke 2 Å urobili série 10 riadených molekulárne dynamických simulácií trvajúcich $t = 20$ ps. Po ich vykonaní, sme aplikovali všetky predtým spomínané metódy vyhodnotenia. Výsledky sme na seba napojili, čím sme dostali finálny priebeh aproximácie ΔF , ktorý uvádzame v grafoch (5.16a) až (5.16d).

Vidíme, že aj pre takto krátke simulácie s kumulatívnou dĺžkou $t = 200$ ps a len malým množstvom stredovaných trajektórií ($n = 10$) dostávame výrazne lepšie výsledky, ako sme získali u rovnako dlhých simulácií pre $t = 200$ ps vykonaných naraz pre celý interval 13–33 Å. Tie môžeme vidieť v grafoch (E.6), (E.18), (E.32) a (E.45) uvádzaných v prílohách.

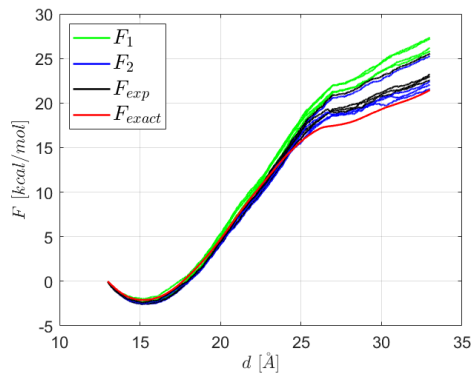
Získané výsledky sú porovnateľné skôr so simuláciami o desaťnásobnej dĺžke $t = 2$ ns, ktorých grafické znázornenie môžeme znova nájsť v prílohách (E.9), (E.22), (E.36) a (E.48).

Ďalšou výhodou je, že výpočty na desiatich podintervaloch je možné realizovať paralelne. Pri dostatočných hardwarových kapacitách je teda možné získať z výpočtov na podintervaloch porovnateľne kvalitný výsledok v sto násobne kratšom čase, ako keď by sme danú simuláciu robili na celom intervale naraz.

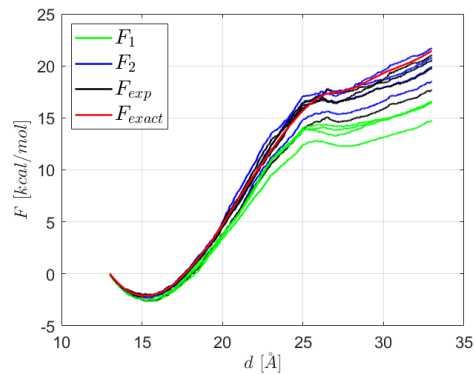
Najvýraznejšie zlepšenie sme, v tomto prípade, pozorovali v kontexte spätných simulácií. Dôvodom je, že ekvilibrované stavy sme vytvárali pomocou priebehu doprednej simulácie (kde bolo prítomné α -helikálne usporiadanie). A zároveň sme

simulovaný systém vyvíjali len na malom úseku, kedy nestačilo dôjsť k takému vzdialeniu sa od rovnováhy, aby došlo k misfoldingu.

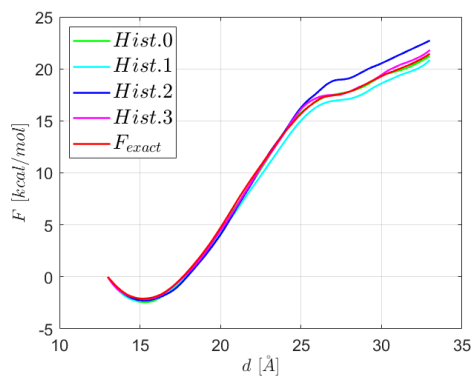
Obr. 5.16: Aproximácie ΔF pre $t = 200$ ps, $n = 10$ a 10 intervalov vo vákuu



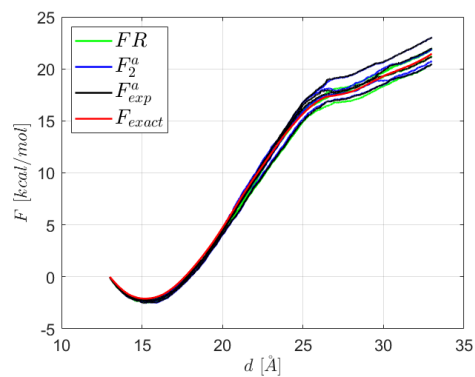
(a) Dopredné simulácie $(Ala)_{10}$



(b) Spätné simulácie $(Ala)_{10}$



(c) Metóda prieniku histogramov



(d) FR metóda

5.1.6 Zhrnutie a diskusia

Výsledky získané v tejto kapitole sú v dobrom súlade s prácami [6, 8, 9, 12, 66, 78]. Najlepšiu aproximáciu priebehu voľnej energie ΔF získavame pomocou aplikácie FR metódy a metódy prieniku histogramov (ktorá vo vyššie uvádzaných prácach použitá nebola).

FR metóda a metóda prieniku histogramov potrebujú simulácie v oboch smeroch časového vektora, čo nie je vždy jednoduché realizovať. Ak sme pracovali len s doprednými, tak sme v súlade s prácami [8] a [9] videli, že vo väčšine prípadov dostávame najlepšiu aproximáciu aplikáciou metódy druhých kumulantov.

Na druhej strane, pokiaľ sa v študovanom procese vyskytovalo viacej súperiáciich mechanizmov, metóda rozvoja do druhého kumulantu zlyháva. Dôvodom je zväčšenie rozptylu získaných dát, čo nepriaznivo vplýva na aproximáciu F_2 . To sa vyskytlo v prípade veľmi krátkych a teda výrazne nerovnovážnych spätných simulácií, kedy dochádzalo k foldingu $(Ala)_{10}$ nie len do klasického alfa-helikálneho usporiadania, ale aj k misfoldingu do rady nehelikálnych vlásenkovitých štruktúr. Pôvod môžeme nájsť v zvýšení entropie systému pri väčších rýchlostiach pohybu virtuálneho atómu.

Zároveň, keďže energia mechanizmu misfoldingu bola štandardne menšia, ako energetická zmena prislúchajúca zbaleniu do α -helikálnej konfigurácie, tak Jarzynského identita pre spätné simulácie nebola voči týmto príspevkom až tak citlivá a nedošlo k znehodnoteniu jej výsledkov. Necitlivosť v prípade metódy prieniku histogramov mala podobný dôvod.

Napriek tomu, že v práci [6] autori pracovali aj so simuláciami o dĺžke 200 ps, neuvádzajú, že by zaznamenali vzájomné súperenie dvoch mechanizmov foldingu. Je možné, že je to len dôsledok veľmi malého počtu trajektórií ($10xF$ a $10xR$), ktoré v tej dobe dokázali naakumulovať. Prítomnosť dvoch súperiáciich mechanizmov bola totiž zaznamenaná v neskorších prácach [12] a [78], kde sa pracovalo s výrazne väčším počtom nerovnovážnych MD trajektórií ($504xF$ a $504xR$ resp. $512xF$ a $512xR$), čo podporuje naše výsledky získané pomocou $1000xF$ a $1000xR$ behov.

Do budúcnosti by bolo zaujímavé systematicky preskúmať, či má na mechanizmus foldingu výraznejší vplyv voľba silovej konštanty. Vo vyššie spomínaných štúdiách boli totiž použité výrazne vyššie hodnoty ([6]-Forney 2008 $50 \text{ kcal/mol}/\text{Å}^2$; [12]-Procacci 2010 $400 \text{ kcal/mol}/\text{Å}^2$; [78]-Procacci 2015 $100 \text{ kcal/mol}/\text{Å}^2$). Avšak, spôsob prezentácie výsledkov väčšinou neumožňuje odhadnúť zastúpenie misfoldovaných štruktúr. Výnimkou je Figure 2. v štúdií [78]-Procacci 2015, kde v najkratších spätných simuláciách (21 ps) autor získal v zlomku 3.6% trajektórií klasické alfa-helikálne usporiadanie, ktoré sme my pri tejto dĺžke simulácií vôbec nedetegovali.

Pre ďalší postup v nasledujúcich kapitolách bolo rozhodujúce, že delením simulovaného vývoja na podintervaly sme získali výrazne lepšie výsledky.

5.2 Deca-alanín vo vodnej obálke

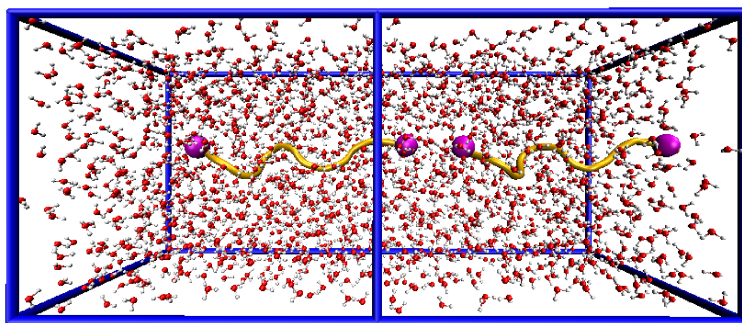
V tejto časti sa znova pozrieme na simulácie deca-alanínu, ale tento raz ho vnoríme do vodnej obálky.

Základné charakteristiky tohto systému boli analogické ako v prípade simulácií vo vákuu. Teda sme znova používali silové pole CHARMM22 a rovnakým spôsobom, ako vo vákuu sme pristupovali k dusíkovým atómom na N a C koncoch.

Veľkosť základnej bunky bola volená takým spôsobom, aby sme v rovine xy a v zápornom smere osi z dosiahli solvatačnú vrstvu o hrúbke 10 Å. V kladnom smere osi z (kde dochádzalo k rozbalovaniu proteínu) sme uvažovali vrstvu o hrúbke 30 Å. Počas solvatacie sme minimálnu vzdialenosť medzi molekulami vody a $(Ala)_{10}$ zvolili vo veľkosti 2.4 Å. Výsledkom bola základná bunka s rozmermi $\{x, y, z\} = \{30.60, 27.83, 57.57\}$ Å. A celkovým počtom 4394 atómov.

Na základe toho bola na konci simulácie vzdialenosť periodických obrazov $(Ala)_{10}$ približne vo veľkosti 20 Å, takže vďaka hodnote r_{cut} nedochádzalo k priamemu ovplyvňovaniu sa týchto kópií (čo by spôsobovalo neželané artefakty).

Avšak, na otestovanie miery vzájomného vplyvu periodických kópií, sme prvotne v každom smere zvolili solvataciu o hrúbke 10 Å. Rozmery získanej simulačnej bunky boli o veľkosti $\{x, y, z\} = \{30.60, 27.83, 35.07\}$ Å. To ale znamená, že vzdialenosť periodických kópií $(Ala)_{10}$ by na konci dopredných simulácií mala byť \sim Å (konkrétne 3.89 Å), čím by malo dochádzať k ovplyvneniu tvaru voľnej energie ΔF . Túto situáciu môžeme vidieť na obrázku (5.17).



Obr. 5.17: Posledný snímok SMD simulácie $(Ala)_{10}$ v malej simulačnej bunke

Napriek blízkosti daných koncov sme ale nepozorovali žiaden vplyv na krivku voľnej energie. To ale mohlo byť spôsobené malou dĺžkou testovacej trajektórie (20 ps), kedy bol tento vplyv prekrytý hodnotou disipatívnej práce $\mathcal{W} - \Delta F$. Graf zobrazujúci spomínaný vývoj, spolu s vývojom pre dostatočne veľkú simulačnú bunku, uvádzame v prílohe (E.1).

5.2.1 Dopredné simulácie

V prípade dopredných simulácií sa virtuálny atóm znova pohyboval v kladnom smere osi z , pričom celková dĺžka jeho trajektórie bola vo veľkosti 20 \AA .

Vodná obálka spôsobuje šum a spomaľuje konvergenciu vývoja \mathcal{W} k rovnovážnej hodnote voľnej energie ΔF . Preto sme celkovú dĺžku simulácií zvýšili ešte o jeden rád. Konkrétne hodnoty sú uvedené v tabuľke (5.2).

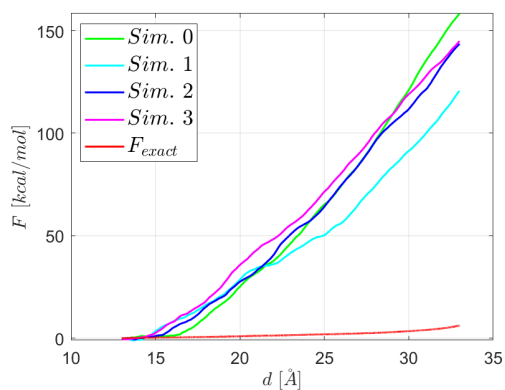
Tabuľka 5.2: Počet n a dĺžka t dopredných simulácií systému $(Ala)_{10}$ vo vodnej obálke

| t [ns] | n [] | | | | |
|----------|---------|----|-----|------|--------|
| 0.02 | 1 | 10 | 100 | 1000 | 10 000 |
| 0.20 | 1 | 10 | 100 | 1000 | 10 000 |
| 2.00 | 1 | 10 | 100 | 1000 | – |
| 20.0 | 1 | 10 | 100 | – | – |
| 200 | 1 | 10 | – | – | – |
| 2000 | 1 | – | – | – | – |

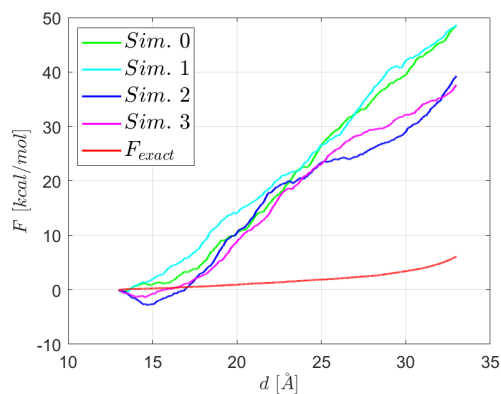
Ani pri maximálnej dĺžke trajektórií (teda $2 \mu\text{s}$) nebol vývoj ΔF plne rovnovážny (napriek tomu, že daný výpočet trval viac ako týždeň). Z toho dôvodu sme uvažovali stredovanie štyroch získaných $2 \mu\text{s}$ trajektórií metódou rozvoja do druhého kumulantu (keďže vo vákuu dávala najlepšiu aproximáciu). Získaný výsledok sme zobrali ako referenčný a v grafoch tejto kapitoly sme ho označovali červenou krivkou F_{exact} .

Vývoje získaných trajektórií pre rôzne hodnoty simulačného času t uvádzame v grafoch (5.18) až (5.23).

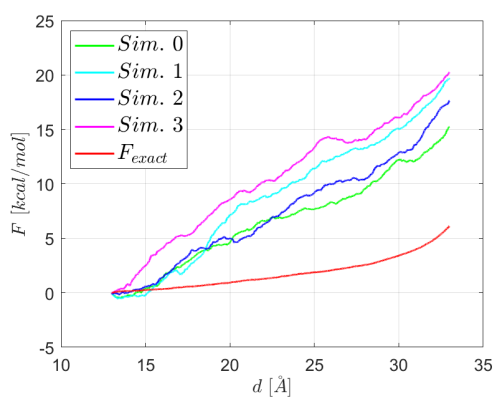
V porovnaní s vývojom vo vákuu má rovnovážna krivka teraz oveľa pomalší rast a nevykazuje ani spomínané minimum v oblasti $\approx 15 \text{ \AA}$. Jej finálna hodnota je $F_{exact}^{final} \approx 6 \text{ kcal/mol}$, čo je približne 3.5 krát menej, ako sme dosiahli vo vákuu ($F_{exact}^{final} \approx 21 \text{ kcal/mol}$).



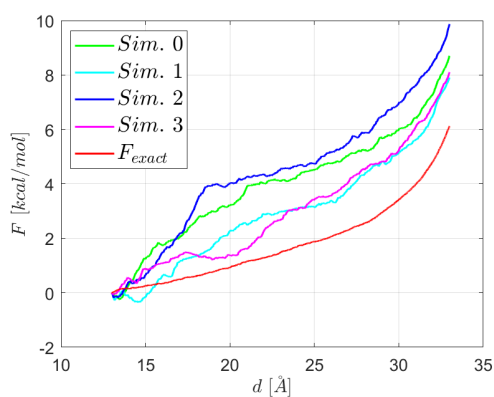
Obr. 5.18: Vývoj počas dopredných 20 ps simulácií



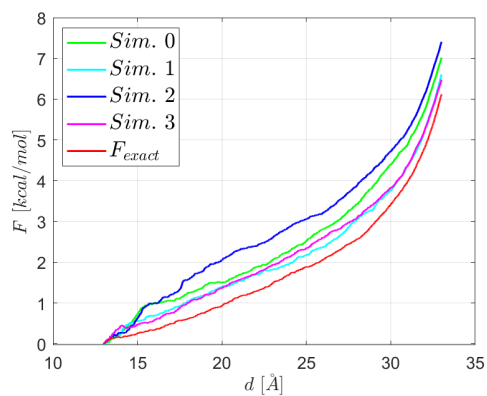
Obr. 5.19: Vývoj počas dopredných 200 ps simulácií



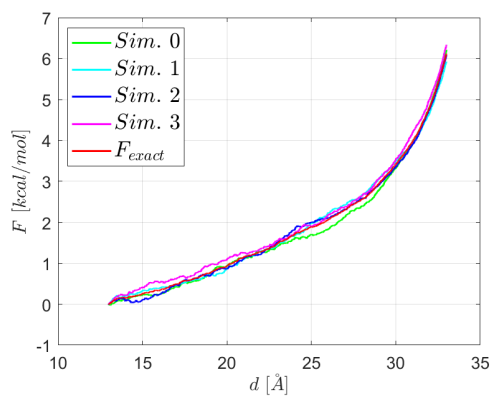
Obr. 5.20: Vývoj počas dopredných 2 ns simulácií



Obr. 5.21: Vývoj počas dopredných 20 ns simulácií

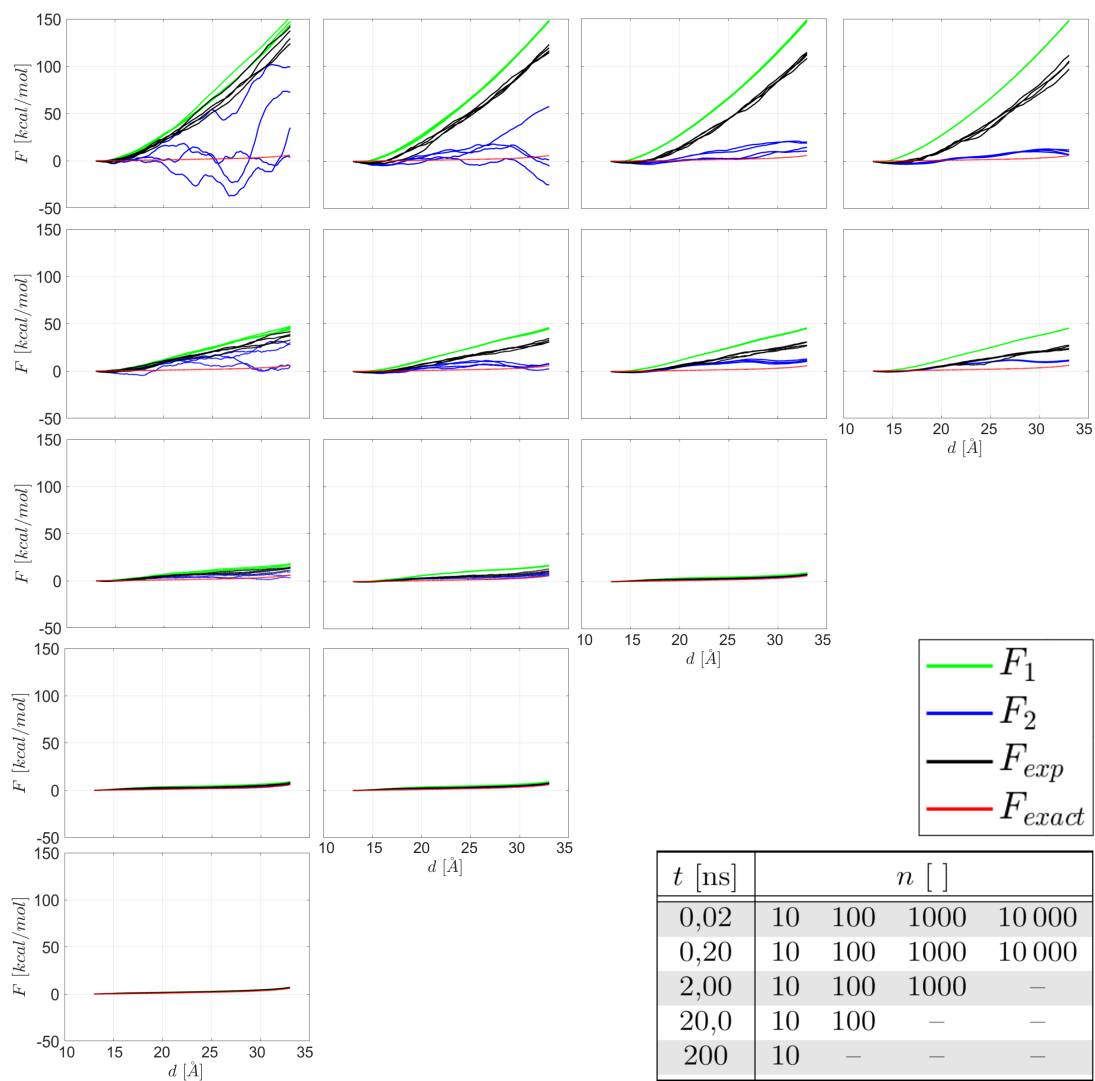


Obr. 5.22: Vývoj počas dopredných 200 ns simulácií



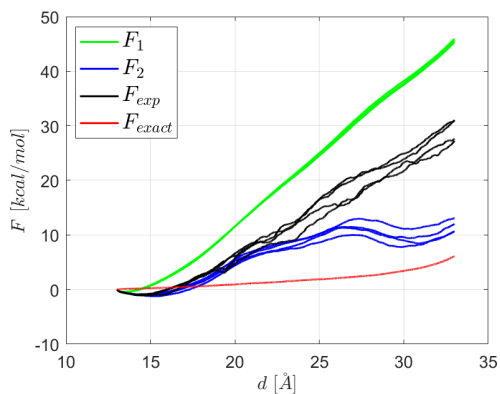
Obr. 5.23: Vývoj počas dopredných 2 μs simulácií

Na obrázku (5.24) uvádzame všetky výsledky z dopredných simulácií systému $(Ala)_{10}$ vo vodnej obálke. Detailnejšie zobrazenie všetkých spomínaných výsledkov je v prílohe (E.6).

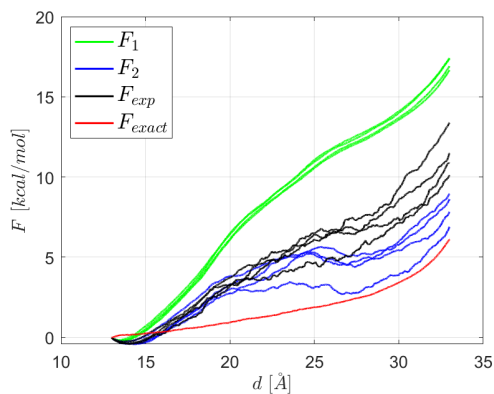


Obr. 5.24: Aproximácie vývoja ΔF dopredných simulácií $(Ala)_{10}$ vo vodnej obálke

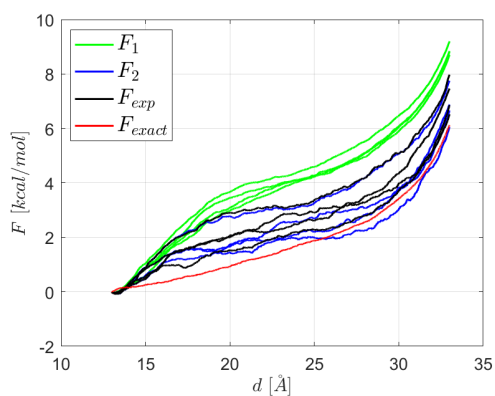
Pre uľahčenie porovnávania s výsledkami v ďalších podkapitolách prikladáme niekoľko vybraných detailnejších grafov aj sem (konkrétne grafy (5.25) až (5.28)).



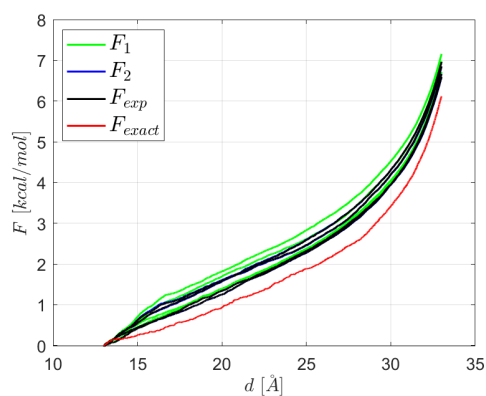
Obr. 5.25: Aproximácie ΔF pre dopredné sim. a $t = 200$ ps, $n = 1000$



Obr. 5.26: Aproximácie ΔF pre dopredné sim. a $t = 2$ ns, $n = 100$

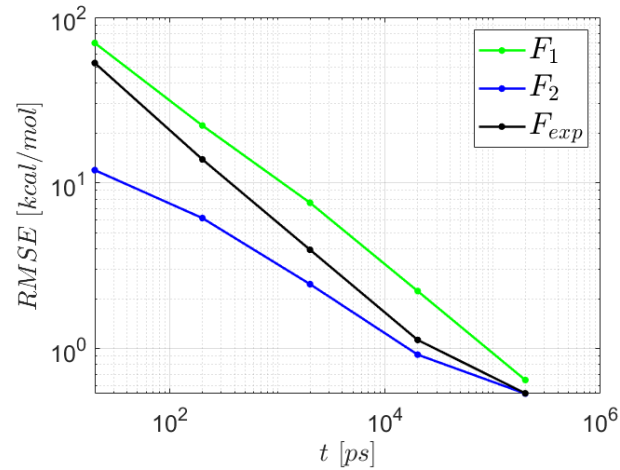


Obr. 5.27: Aproximácie ΔF pre dopredné sim. a $t = 20$ ns, $n = 10$



Obr. 5.28: Aproximácie ΔF pre dopredné sim. a $t = 200$ ns, $n = 10$

V prípade rýchlych nerovnovážnych simulácií je odchýlka ΔF niekoľkonásobne vyššia, ako v prípade simulácií vo vákuu. Finálne hodnoty práce W_{final} sú pre $t = 20$ ps na úrovni $W_{final}^{20ps} \approx 150$ kcal/mol, čo je zhruba 1.5 krát väčšie, ako pri rovnakých simuláciách vo vákuu a približne 25 krát väčšie ako je hodnota získaná z rovnovážneho vývoja. Zároveň pozorujeme, že ku konvergencii nami použitých metód k rovnovážnemu vývoju dochádza až pre $t = 2$ ns, čo je o jeden rád vyššie, ako v prípade vákuu. To môžeme vidieť na grafe (5.29).



Obr. 5.29: Odchýlky dopredných sim. od ΔF vo vodnej obálke pre rôzne t

5.2.2 Spätne simulácie

V prípade spätých simulácií vo vodnej obálke sme vychádzali z rozbalenej štruktúry ekvilibrovanej po dobu 8 ns. Pohyb virtuálneho atómu prebiehal analogicky ako vo vákuu v zápornom smere osi z .

V tejto časti sme simulovali len niektoré z možných hodnôt parametrov n a t , uvedených v tabuľke (5.2) v predchádzajúcej podkapitole. Dôvodom tejto zmeny boli zvýšené výpočtové nároky spôsobené pridaním molekúl vody. Kvôli tomu sme sa snažili optimalizovať voľbu n a t tak, aby sme videli podstatné charakteristiky daného systému, ale zároveň, aby sme neplytvali výpočtovou kapacitou.

Tabuľka 5.3: Hodnoty t a n spätých simulácií $(Ala)_{10}$ vo vodnej obálke

| t [ns] | n [] |
|----------|---------|
| 0.20 | 1000 |
| 2.00 | 100 |
| 20.0 | 10 |
| 200 | 10 |

Získané výsledky sme pre uľahčenie vzájomného porovnávania usporiadali rovnakým spôsobom ako v prípade grafov (5.25) až (5.28) v predchádzajúcej podkapitole a uvádzame ich v grafoch (5.30) až (5.33).

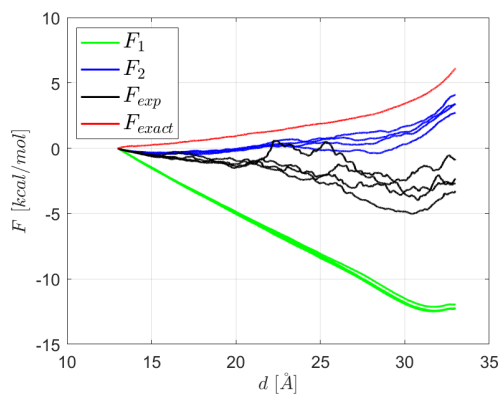
Rovnako ako pri dopredných simuláciách pozorujeme, že kvalitatívne charakteristiky sú vo vodnej obálke (v porovnaní s vákuom) posunuté o jeden rád vyššie.

V prípade najkratších simulácií ($t = 200$ ps a $n = 1000$) dostávame najlepšie výsledky použitím rozvoja do druhého kumulantu F_2 . Pri dlhších simuláciách ($t = 2$ ns a $n = 100$) sú už výsledky F_2 a F_{exp} porovnateľné. Pre najdlhšie simulácie ($t = 20$ ns a $n = 10$, respektíve $t = 200$ ns a $n = 10$) získavame porovnateľné výsledky pri všetkých troch spôsoboch vyhodnotenia.

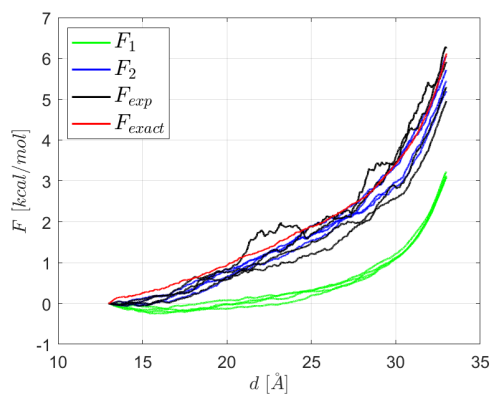
Z dopredných simulácií vyplývalo, že už pre veľmi malé natiahnutie $(Ala)_{10}$ pozorujeme preferenciu prechodu z α -helikálnej do rozbalenej neusporiadanej konfigurácie stabilizovanej interakciou so solventom.

Analýzou finálnych konfigurácií $(Ala)_{10}$ zo spätých priebehov sme zistili, že za prítomnosti vodnej obálky nedošlo ani v jednej z vykonaných simulácií k zbaleniu do ideálneho helikálneho usporiadania. V prípade 90,6% výsledkov bola hodnota odchýlky od helikálnej konfigurácie väčšia ako $RMSE = 3.5 \text{ \AA}$ (teda o $\approx 44\%$ vyššia ako threshold vo vákuu). Vzhľadom k tomu, že ani jedna z konfigurácií nebola helikálna sme sa rozhodli dané výsledky nefiltrovať. Zároveň tento výsledok naznačuje, že nehelikálny mechanizmus foldingu je vo vode pravdepodobne preferenčný.

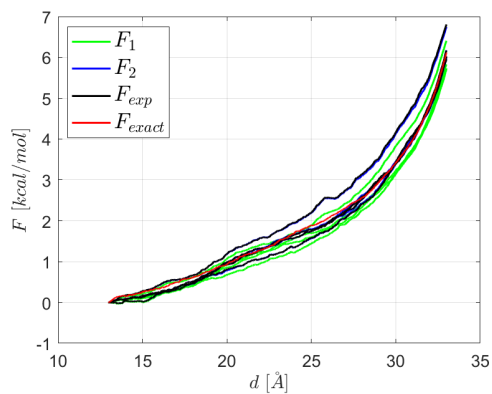
Napriek tomu je ale zhoda nami získaných výsledkov s referenčnou krivkou pre časy $t = 20$ ns a $t = 200$ ns veľmi dobrá. Čo vyplýva z rýchleho zaniknutia helikálnej konfigurácie v prípade dopredných simulácií.



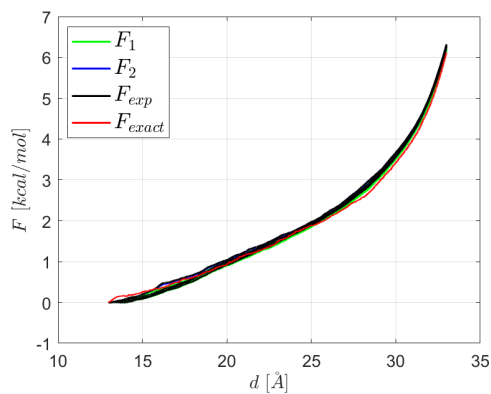
Obr. 5.30: Vývoj aproximácií ΔF spätných simulácií pre $t = 200$ ps a $n = 1000$



Obr. 5.31: Vývoj aproximácií ΔF spätných simulácií pre $t = 2$ ns a $n = 100$



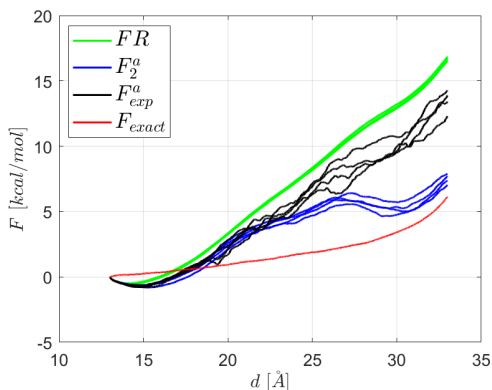
Obr. 5.32: Vývoj aproximácií ΔF spätných simulácií pre $t = 20$ ns a $n = 10$



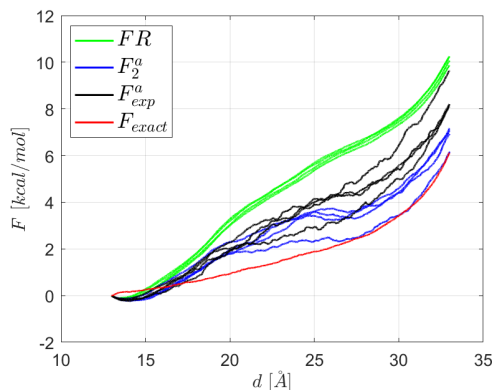
Obr. 5.33: Vývoj aproximácií ΔF spätných simulácií pre $t = 200$ ns a $n = 10$

5.2.3 FR metóda

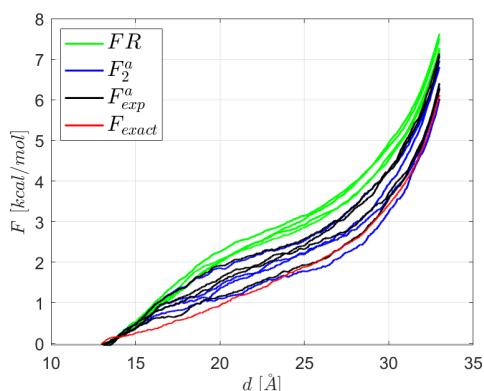
Vzhľadom na to, že už máme k dispozícii výsledky dopredných a spätných simulácií, môžeme na určenie priebehu ΔF znova využiť FR metódu. Výsledky, ktoré sme pomocou nej získali uvádzame na grafoch (5.34) až (5.37).



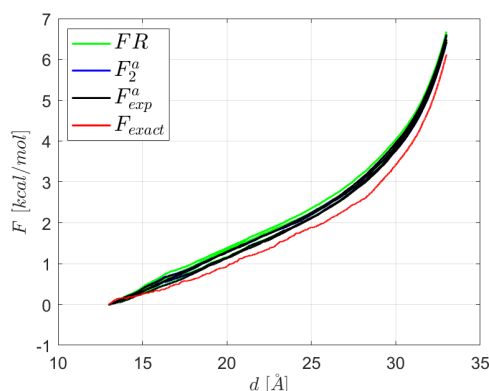
Obr. 5.34: FR metóda pre $t = 200$ ps a $n = 1000$



Obr. 5.35: FR metóda pre $t = 2$ ns a $n = 100$



Obr. 5.36: FR metóda pre $t = 20$ ns a $n = 10$



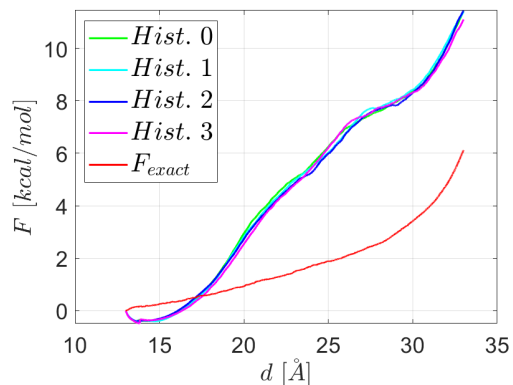
Obr. 5.37: FR metóda pre $t = 200$ ns a $n = 10$

V tomto prípade zlepšenie nie je až také jednoznačné, ako v kontexte simulácií vo vákuu. Pokiaľ získané krivky porovnáme s výsledkami dopredných simulácií, pozorujeme výrazné zvýšenie kvality daného vývoja. Pokiaľ ich ale porovnáme so spätnými simuláciami vo vodnej obálke, tak pre FR metódu dostávame porovnateľnú, alebo dokonca horšiu zhodu s referenčným vývojom.

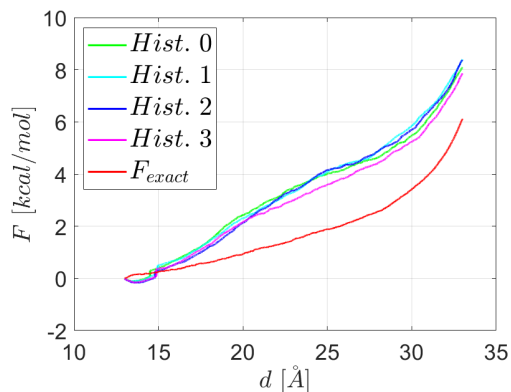
Dôvodom je rozdielna kvalita výsledkov spätných a dopredných simulácií. Konkrétne, dopredné simulácie sú oproti spätným znehodnotené, keďže sa na ich začiatku $(Ala)_{10}$ nachádzalo v helikálnej konformácii. Čo vo vodnej obálke zrejme nie je jeho preferenčná sekundárna štruktúra.

5.2.4 Metóda prieniku histogramov

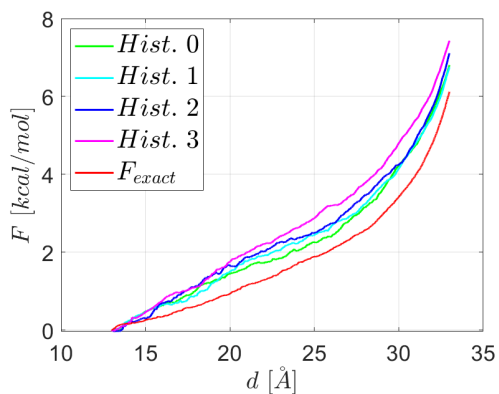
Pri použití metódy prieniku histogramov pozorujeme porovnateľnú kvalitu s výsledkami FR metódy. Výsledky, získané aplikáciou tejto metódy môžeme vidieť na grafoch (5.38) až (5.41).



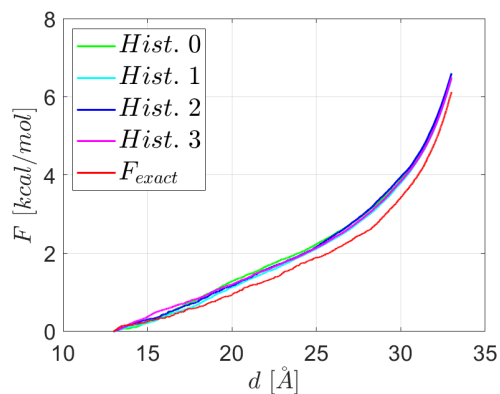
Obr. 5.38: Metóda prieniku histogramov pre $t = 200$ ps a $n = 1000$



Obr. 5.39: Metóda prieniku histogramov pre $t = 2$ ns a $n = 100$



Obr. 5.40: Metóda prieniku histogramov pre $t = 20$ ns a $n = 10$



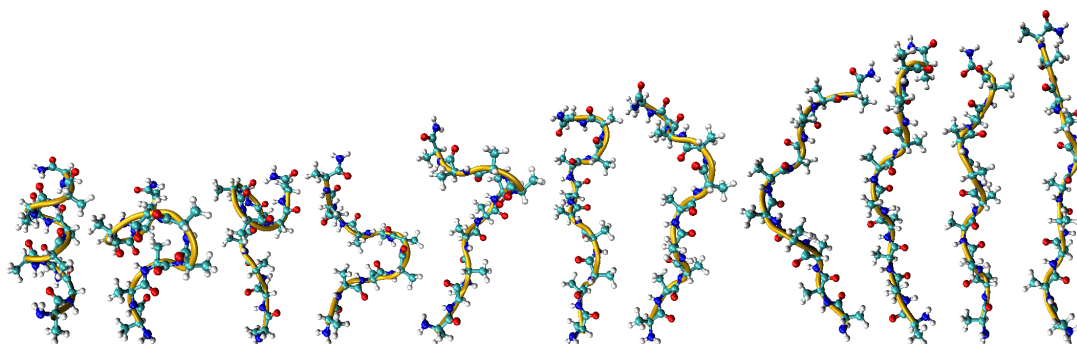
Obr. 5.41: Metóda prieniku histogramov pre $t = 200$ ns a $n = 10$

5.2.5 Delenie trajektórií na podintervaly

Nakoniec sme celkový vývoj riadeného unfoldingu, respektíve foldingu $(Ala)_{10}$ znova rozdelili do 10 separátnych simulácií.

Počiatkové konfigurácie jednotlivých medzistavov, pre rôzne hodnoty reakčnej koordináty (13, 15, ..., 31, 33 Å), sme získali z doprednej simulácie o dĺžke 20 ns a následne sme ich ekvilibrovali po dobu 8 ns. Na konci každej z ekvibrácií sme vyhodnotili, či došlo ku stabilizácii celkovej energie systému.

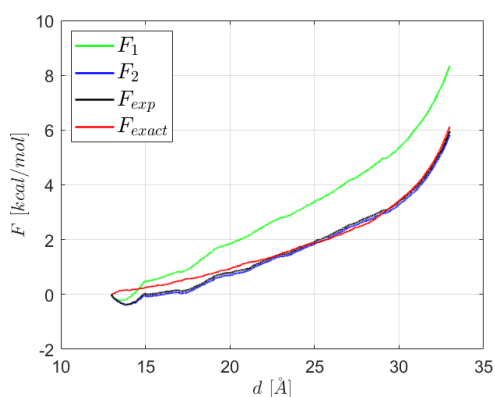
Tieto konfigurácie by mohli vypovedať o nejakých stabilných misfoldovaných usporiadaniach. Avšak, takýto záver vôbec nie je smerodajný, keďže sme $(Ala)_{10}$ počas ekvibrácie fixovali na oboch jeho koncoch. Konfigurácie získané z ekvilibračných simulácií uvádzame na obrázku (5.42).



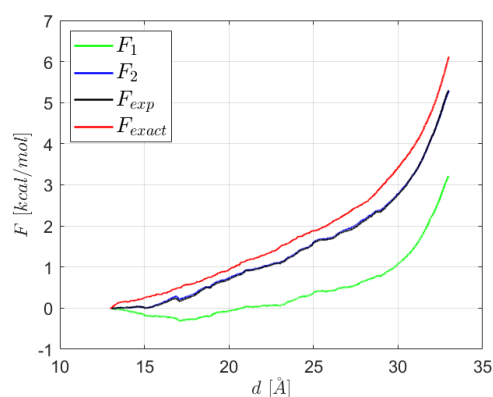
Obr. 5.42: Východzie konfigurácie $(Ala)_{10}$ v priebehu intervalových simulácií (voda)

Potom sme na všetkých desiatich podintervaloch o dĺžke 2 Å realizovali série 100 SMD simulácií trvajúcich $t = 200$ ps. Výsledky aplikovaných metód sme na seba napojili, čím sme dostali finálny priebeh aproximácie ΔF , ktorý uvádzame v grafoch (5.43a) až (5.43d).

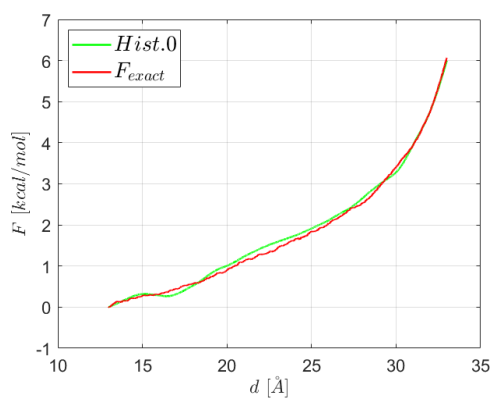
Obr. 5.43: Aproximácie ΔF pre $t = 2$ ns, $n = 100$ a 10 intervalov vo vodnej obálke



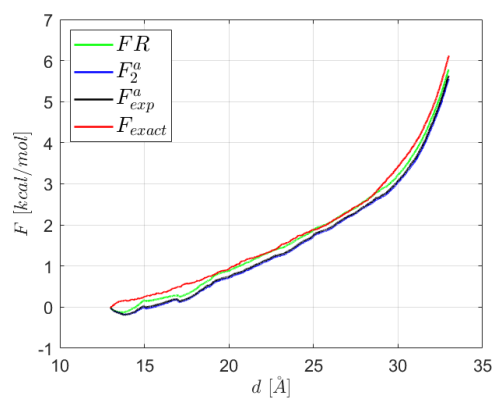
(a) Dopredná simulácia



(b) Spätaná simulácia



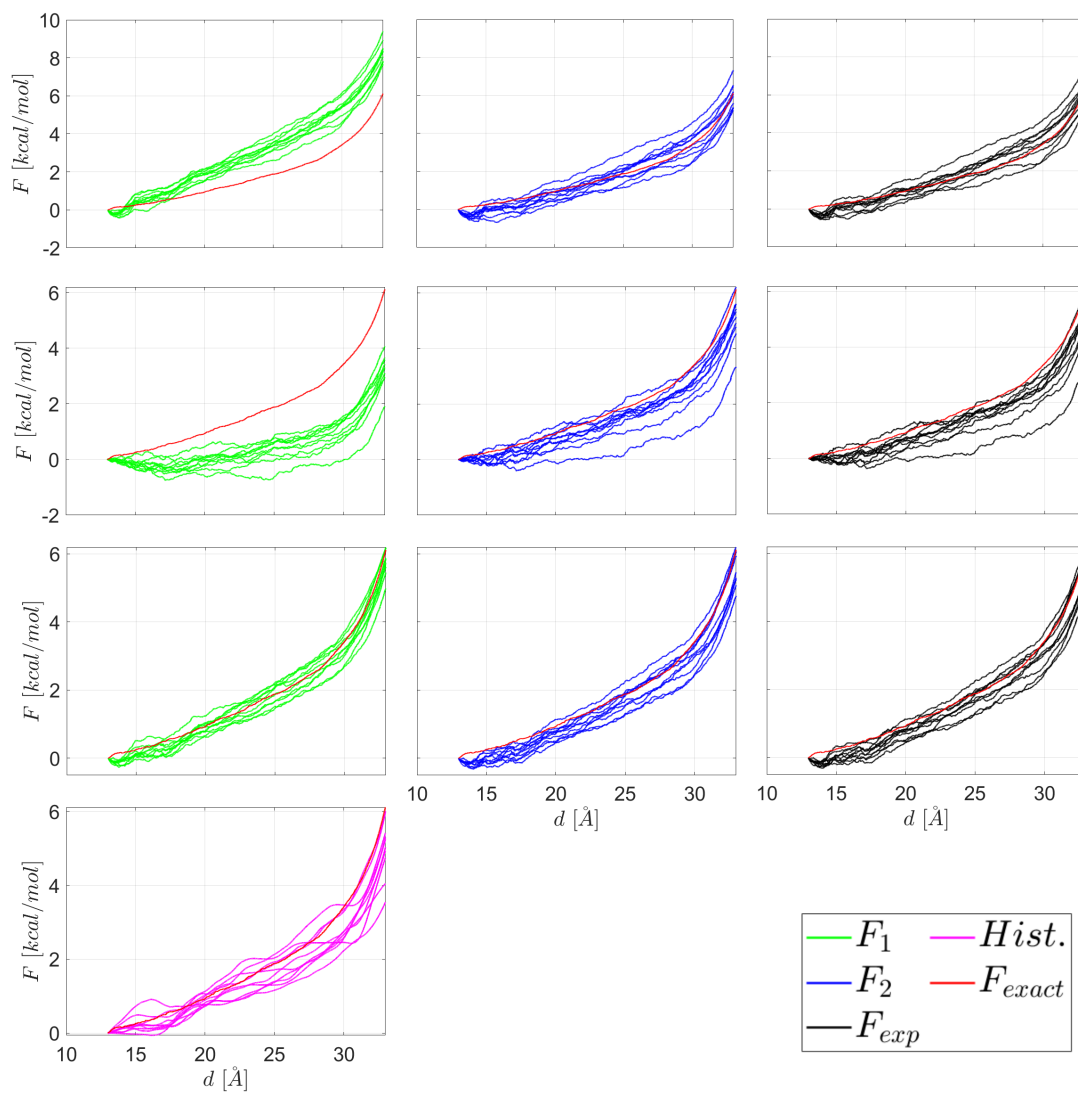
(c) Metóda prieniku histogramov



(d) FR metóda

Zlepšenie výsledkov je, tak ako v prípade simulácií vo vákuu, zase jednoznačné a použitím vyššie uvedených metód (okrem aritmetického priemeru) dostávame dobrú zhodu s referenčným vývojom.

Okrem toho sme na získanie odhadu rozptylu daných výsledkov rozdelili 100 predtým stredovaných trajektórií na 10 setov po 10 trajektóriách. Delenie prebiehalo náhodne. Priebiehy, ktoré sme týmto postupom získali uvádzame, pre všetky aplikované metódy, na obrázku (5.44).



Obr. 5.44: Aproximácie ΔF pre $t = 2$ ns, $n = 10$ a 10 intervalov vo vodnej obálke

5.2.6 Zhrnutie a diskusia

V prípade simulácií $(Ala)_{10}$ vo vodnej obálke sme pozorovali, že ku konvergencii k rovnovážnemu vývoju dochádzalo neskôr ako v prípade vývoja vo vákuu. Ani pre simulácie o dĺžke $t = 2 \mu\text{s}$ sme nepozorovali ideálnu zhodu získaných výsledkov.

Dôvodom je fakt, že pridaním solventu sa výrazne zvýši počet dostupných stupňov voľnosti fázového priestoru. Vďaka tomu môže systém nadobúdať oveľa väčšie množstvo konfigurácií a vývojov pozorovaných v trajektóriách.

Trenie medzi molekulou $(Ala)_{10}$ a medzi vodným prostredím je zodpovedné za vysoké hodnoty práce, ktoré sme pozorovali pre kratšie simulácie (hlavne o dĺžke $t = 20 \text{ ps}$). Okrem natahovania tohto peptidu zároveň urýchľujeme a ťaháme aj molekuly vody.

Na druhú stranu, vytvorenie intermolekulárnych vodíkových väzieb medzi vodou a študovaným peptidom je zodpovedné za zhruba 3.5 násobné zníženie výslednej hodnoty voľnej energie (v porovnaní s vákuom). Vďaka molekulám vody dochádza k jednoduchšiemu narušeniu intramolekulárneho usporiadania tvoriaceho deca-alanínový α -helix. V neskorších častiach už len dochádza k postupnému narovnávaniu peptidu. Pričom, v oblasti 27.5 – 33.0 Å pozorujeme už len natahovanie väzieb v peptidovej kostre, zodpovednej za zmenu energie $\approx 3.5 \text{ kcal/mol}$, čo tvorí až $\approx 58,3\%$ finálnej hodnoty.

Rovnovážne MD simulácie, v kombinácii s alternatívnymi metódami pre výpočet profilu voľnej energie (US - umbrella sampling a ABF - adaptive biasing force), poskytujú rozporuplné výsledky a priame porovnanie je náročné [10]. Autori totiž experimentovali s rôznymi spôsobmi obmedzenia na geometriu $(Ala)_{10}$ a aj napriek enormným výpočtovým nárokom sa im nepodarilo odstrániť zjavné artefakty v získaných výsledkoch [10]. Je ale zrejmé, že výsledný profil voľnej energie je veľmi plochý. Tento záver potvrdzuje aj jedna z našich simulácií, kedy počas ekvibrácie došlo k samovoľnému prechodu z α -helixu do neusporiadanej cievky.

V štúdií [7] použili takzvanú ASMD metódu len pre dopredné behy. Uplatnili popritom delenie celkového intervalu na čiastkové podintervaly. S pomocou Jarzynského identity popritom vyberali trajektóriu, z ktorej sa bude pokračovať na ďalšom podintervale. Avšak, zďaleka nedosiahli ideálneho výsledku. Je zrejmé, že nami získaný rovnovážny vývoj má hodnoty voľnej energie ešte skoro o polovicu menšie.

V nadväzujúcej štúdií [79] sa autorom vďaka použitiu enormného množstva trajektórií (až 800), respektíve modifikáciou metódy na FR-ASMD (kedy medzi jednotlivými podintervalmi robili veľmi krátku 50 ps ekvibráciu), podarilo viac priblížiť k referenčnej krivke (získanej v implicitnom solvante), ktorá má porovnateľný priebeh, ako naša referenčná krivka (získaná s explicitnou vodnou obálkou).

Naša metóda, kedy dobrý odhad profilu voľnej energie získame už prostredníctvom desiatich 2 ns dopredných a spätných behov, ktoré sa navyše realizujú (na

rozdiel od [7], respektíve [79]) na jednotlivých podintervaloch nezávisle (teda paralelne, čo pri dostatočných hardwarových zdrojoch znamená reálne ako $2 \times 10 \times 10$ behov o dĺžke iba 200 ps), je nepochybne efektívnejšia.

Na druhú stranu si je treba uvedomiť, že východzie konforméry pre jednotlivé subintervaly sme získali z predchádzajúceho behu o dĺžke 20 ns a pred začiatkom vlastných SMD simulácií sme realizovali na každom z desiatich podintervalov ekvilibračiu o dĺžke 8 ns. V tejto oblasti bude ešte treba v budúcnosti experimentovať a určiť, aké sú minimálne nároky spomínanej prípravnej fázy.

Avšak, aj keď je naša metóda náročnejšia na prípravu, umožnila nám získať výsledky, ktoré dávajú veľmi dobrý a robustný odhad profilu voľnej energie. Ku ktorému sme sa inak pomocou takmer rovnovážnych SMD simulácií dostali za cenu extrémnych nárokov na počítačový čas (4 trajektórie po 2 μ s, teda celkovo 8000 ns).

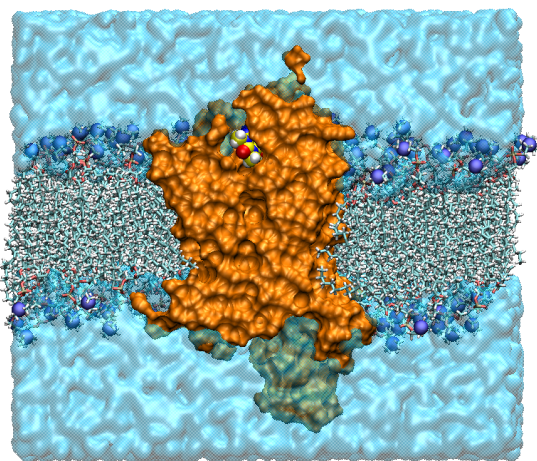
5.3 A_{2A} adenzínový receptor

V tejto kapitole sa budeme venovať SMD simuláciám A_{2A} receptoru v komplexe s kofeínom. Rovnakými metódami, ako sme použili v prípade molekuly $(Ala)_{10}$, budeme študovať profil väzbovej voľnej energie ΔF a porovnávať efektivitu použitých metód.

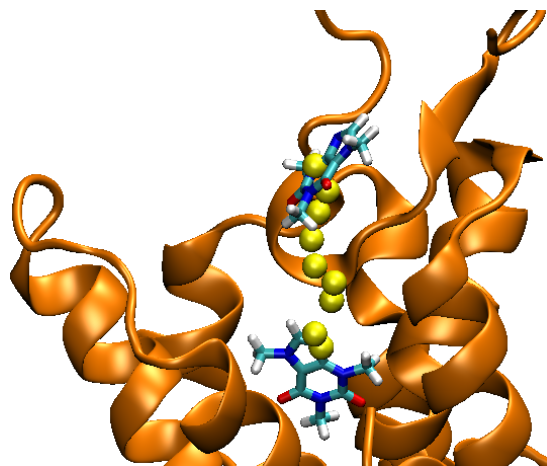
Ako východzia štruktúra bola použitá konformácia s PDB kódom 3RFM, vložená do fragmentu bunkovej membrány (s plochou $60 \times 55 \text{ \AA}^2$) lipidov typu POPC, solvatovaná vrstvou molekúl vody o hrúbke 6 \AA . Elektroneutralita bola zabezpečená pridaním 6 chloridových iónov a 13 molekúl $NaCl$ tak, aby bola celková koncentrácia solí 0.15 mol L^{-1} .

Výsledná simulačná bunka o rozmeroch $\{x, y, z\} = \{62.554, 56.585, 90.066\} \text{ \AA}$ sa skladala celkovo z 22580 atómov, z toho 2264 tvorilo adenzínový receptor spolu s kofeínom. 4600 častíc odpovedalo molekulám vody. Zvyšok systému vo veľkosti 6516 atómov tvorilo lipidovú dvojvrstvu a vyššie uvádzané ióny Na^+ a Cl^- .

Daný systém uvádzame na obrázkoch (5.45) a (5.46). Na obrázku (5.45) vidíme bočný pohľad na spomínaný receptor (označený oranžovou farbou), vizualizovaný izohodnotou gaussovského povrchu všetkých jemu prislúchajúcich atómov. Šedou farbou zobrazujeme fragment bunkovej membrány. Molekuly vody sme pre prehľadnosť explicitne nevykreslovali. Na tomto obrázku môžeme taktiež vidieť ligand kofeínu, detailnejšie zobrazený na obrázku (5.46), kde uvádzame jeho počiatočnú a koncovú konfiguráciu. Žlté guľičky označujú medzikonfigurácie atómu uhlíka $C4$, na ktorý bol aplikovaný harmonický potenciál (reprezentovaný virtuálnym atómom). Tieto polohy boli následne využité na získanie výsledkov intervalových simulácií uvádzaných v kapitole (5.3.2).



Obr. 5.45: Systém A_{2A} receptora v komplexe s kofeínom



Obr. 5.46: Východzie polohy kofeínu v komplexe s A_{2A} receptorom

Parametrizácia receptoru a fragmentu bunkovej membrány bola zabezpečená silovým poľom CHARMM36. Kofeín sme parametrizovali na základe analógie s inými molekulami, knižnicou CGenFF spomínanou v kapitole (2.1.2).

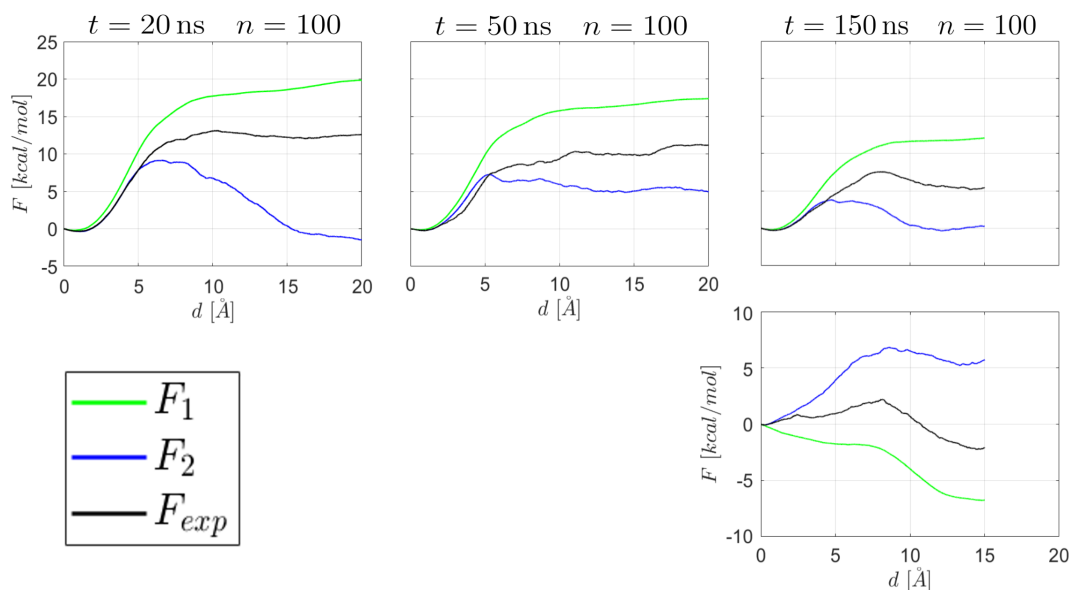
Posledná časť pozostávala z minimalizácie systému v 2000 krokoch. Tá bola nasledovaná žíhaním a nakoniec bol systém ekvilibrovaný po dobu 4 ns. Táto doba bola dostatočná na stabilizáciu energie systému a nebolo nutné vykonávať ďalšiu ekvilibráciu. V priebehu všetkých troch častí sme uvažovali obmedzenie na konštantný pomer rozmerov simulačnej bunky v rovine xy . Nasledujúce simulácie už boli vykonávané bez tohto obmedzenia.

Počas riadenej molekulárnej dynamiky sme virtuálny atóm pripojili na molekulu kofeínu, konkrétne na uhlík $C4$ a zároveň sme fixovali C_α uhlík tryptofánu 246 (aby nedochádzalo k rovnomernému pohybu receptoru spolu s fragmentom membrány). Ten sa nachádzal približne pod molekulou kofeínu v blízkosti jeho väzbového miesta. Parameter tuhosti harmonického potenciálu k (identický pre virtuálny atóm a aj pre potenciál fixujúci atóm tryptofánu) mal hodnotu $k = 7.2 \text{ kcal/mol/\AA}^2$. K pohybu virtuálneho atómu dochádzalo v smere osi z (kolmej k rovine fragmentu bunkovej membrány).

5.3.1 Simulácie na jednom intervale

Z hľadiska výpočtov na jednom intervale sme robili tri série dopredných simulácií pre $n = 100$ trajektórií, so simulačným časom $t = \{20, 50, 150\}$ ns a jednu sériu spätných simulácií pre $n = 100$ a $t = 150$ ns.

V kratších simuláciách sme ním od pôvodnej polohy vo väzbovom mieste receptora pohybovali do vzdialenosti 20 Å. Avšak, v prípade dlhších simulácií nebol takýto postup z hľadiska výpočtových nárokov realizovateľný, čím sme túto vzdialenosť skrátili na 15 Å. Získané výsledky, uvádzame na obrázku (5.47).



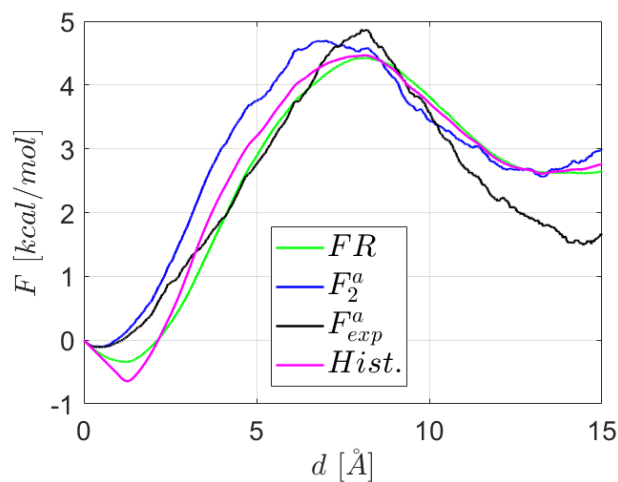
Obr. 5.47: Dopredné (prvý riadok) a spätné (druhý riadok) simulácie A_{2A} receptora v komplexe s kofeínom

Ako môžeme vidieť kvalita získaných výsledkov nie je dobrá ani pre $t = 150$ ns. Pozorujeme výrazné odchýlky dopredných a spätných behov a teda zlú aproximáciu ΔF . V prípade spätných behov dokonca pozorujeme, že aritmetický priemer vykonanej práce $\langle W \rangle_R$ má klesajúcu tendenciu a dosahuje záporných hodnôt. To analogicky, ako v prípade $(Ala)_{10}$ vypovedá o tom, že proces naviazania kofeínu neprebíhal samovoľne, ale bol nami po danej trajektórií vynútený.

Správania sa rozvoja do druhého kumulantu tiež nie je optimálne, pretože pozorujeme jeho značné fluktuácie. Napríklad, pre $t = 50$ ns vidíme stabilizáciu vývoja okolo hodnoty $F_2 = 4$ kcal/mol, avšak pre $t = 20$ ns a $t = 150$ ns pozorujeme v oblasti 15 – 20 Å pokles do nulových alebo až záporných hodnôt. Tieto fluktuácie sú spôsobené veľkým rozptylom získaných trajektórií, kvôli nerovnováženosti uvádzaných výsledkov (analogicky ako pre $(Ala)_{10}$).

Graf (5.48) uvádza vyhodnotenie simulácií o čase $t = 150$ ns pomocou FR metódy a metódy prieniku histogramov. Všetky získané krivky vykazujú zlepšenie pozorovaného priebehu, ale vzhľadom k vysokej hodnote kumulatívneho simulačného času ($15 \mu\text{s}$) sa od seba stále značne odchyľujú.

S ohľadom na nízku kvalitu získaných výsledkov sme rýchlejšie spätné simulácie nerealizovali. Navýšenie simulačného času zase nebolo rentabilné kvôli výpočtovým nárokom (simulácie by už trvali rádovo dva týždne).



Obr. 5.48: FR metóda a prienik histogramov pre $t = 150$ ns a $n = 100$

5.3.2 Simulácie na 10 podintervaloch

Na základe vyššie uvedených výsledkov bola ďalším krokom aplikácia delenia simulácií na intervaly, kedy sme pracovali s 10 intervalmi s dĺžkou 1.5 \AA , pre $n = 100$ a $t = \{1, 2, 5, 10, 25, 50, 100, 150\} \text{ ns}$.

Príprava čiastkových medzistavov, bola realizovaná extrakciou konfigurácií z rýchlej 2 ns trajektórie, ktoré sme následne ekvilibrovali po dobu 5 ns.

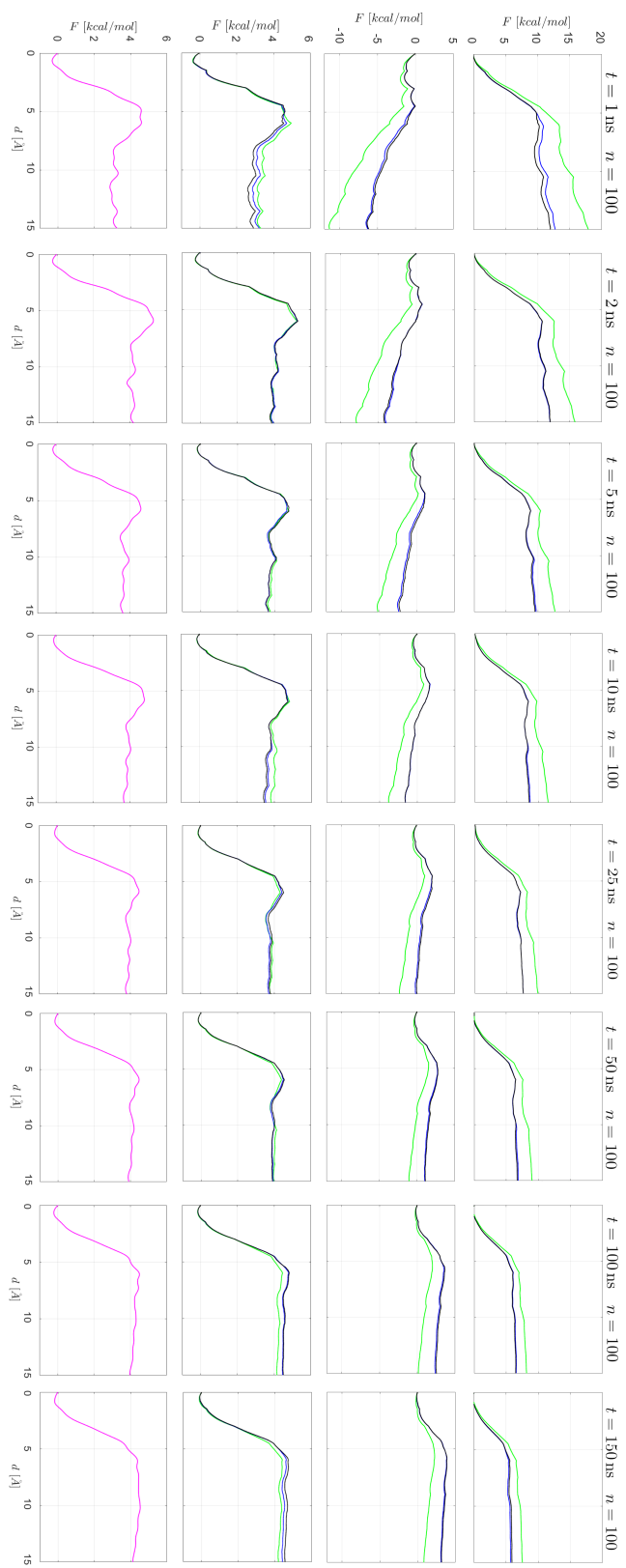
Výsledky získané v prípade dopredných (prvý riadok) a spätných (druhý riadok) simulácií, pri použití FR metódy (tretí riadok) a metódy prieniku histogramov (štvrtý riadok) uvádzame na obrázku (5.49). Na obrázku (5.50) ešte uvádzame výsledky, obdržané náhodným rozdelením simulovaných priebehov na 10 podskupín. Kvôli priestorovým podmienkam v nich neuvádzame legendu, ale zachovali sme doteraz používané farebné označenie. Zelená odpovedá krivke F_1 , čierna charakterizuje výsledky Jarzynského identity F_{exp} , modrá farba rozvoj F_2 a fialová farba odpovedá výsledkom metódy prieniku histogramov.

Obrázok (5.49) ukazuje, že s navyšovaním simulačného času t dochádza ku konvergencii výsledkov k vývoju ΔF . Dopredné behy k nemu konvergujú zhora a spätné zdola. Pozorujeme, že pre $t = 150 \text{ ns}$ sa tieto aproximácie k sebe znateľne približujú. Fluktuácie F_2 , ktoré sme videli na grafoch (5.47) sa kompletne stratili a zhoda s F_{exp} vypovedá o gaussovskom charaktere práce \mathcal{W} .

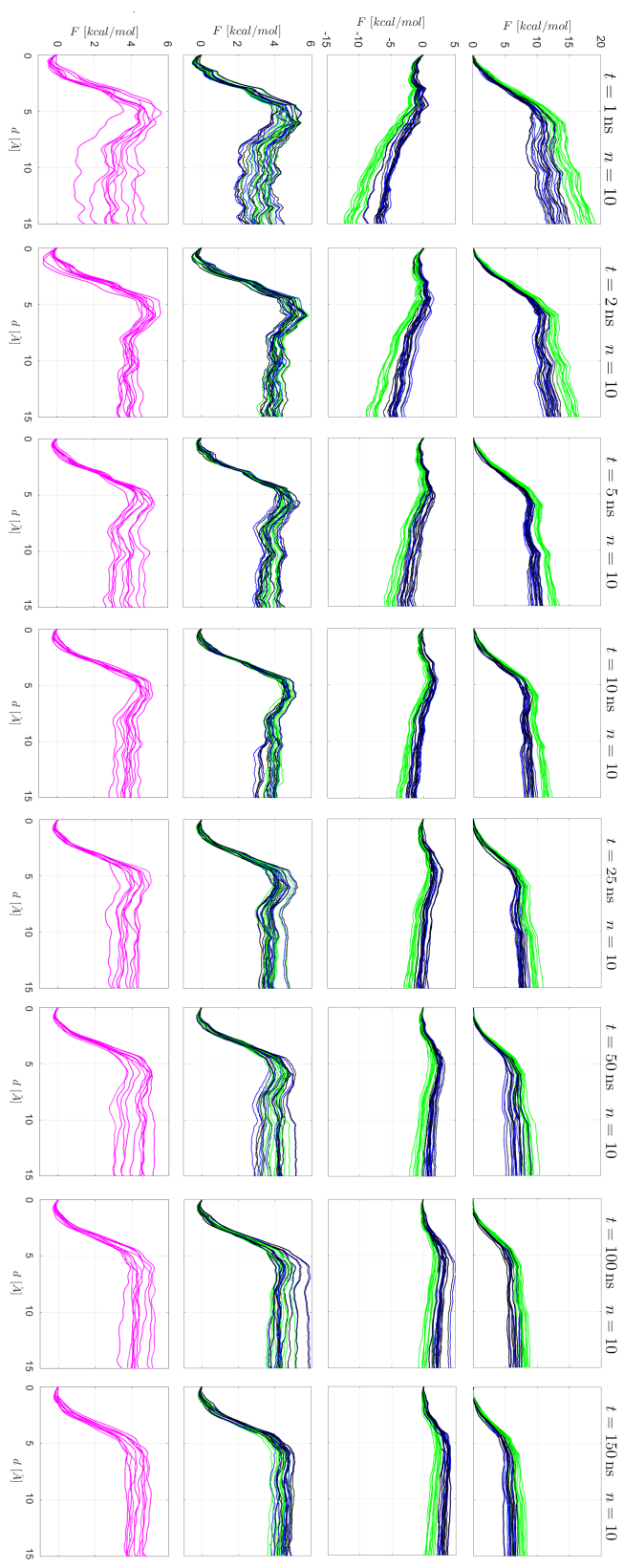
Avšak, najpodstatnejším výsledkom týchto simulácií je fakt že priebehy, získané pomocou metódy prieniku histogramov, respektíve s využitím FR metódy, sú okrem $t = 1 \text{ ns}$ v podstate identické. Jediným rozdielom (okrem fluktuácií okolo hodnoty 4 kcal/mol) je výška energetickej bariéry pre $d \approx 6 \text{ \AA}$, ktorá sa s narastajúcim simulačným časom postupne znižuje. Toto pozorovanie vypovedá o významnej prediktívnej sile uvádzaných metód, ktorá nám umožňuje získať experimentálne korektné výsledky aj pre veľmi rýchle simulácie ďaleko od rovnováhy.

Teraz sa pozrime na grafy uvádzané na obrázku (5.50), kde vidíme kvalitatívne zachovanie vývoja aj za použitia $n = 10$ trajektórií. Rozdielom je rozptyl pozorovaných výsledkov, ktorý je ale len vo veľkosti $\approx 2 \text{ kcal/mol}$ v porovnaní s hodnotami získanými pre $n = 100$ stredovaných trajektórií.

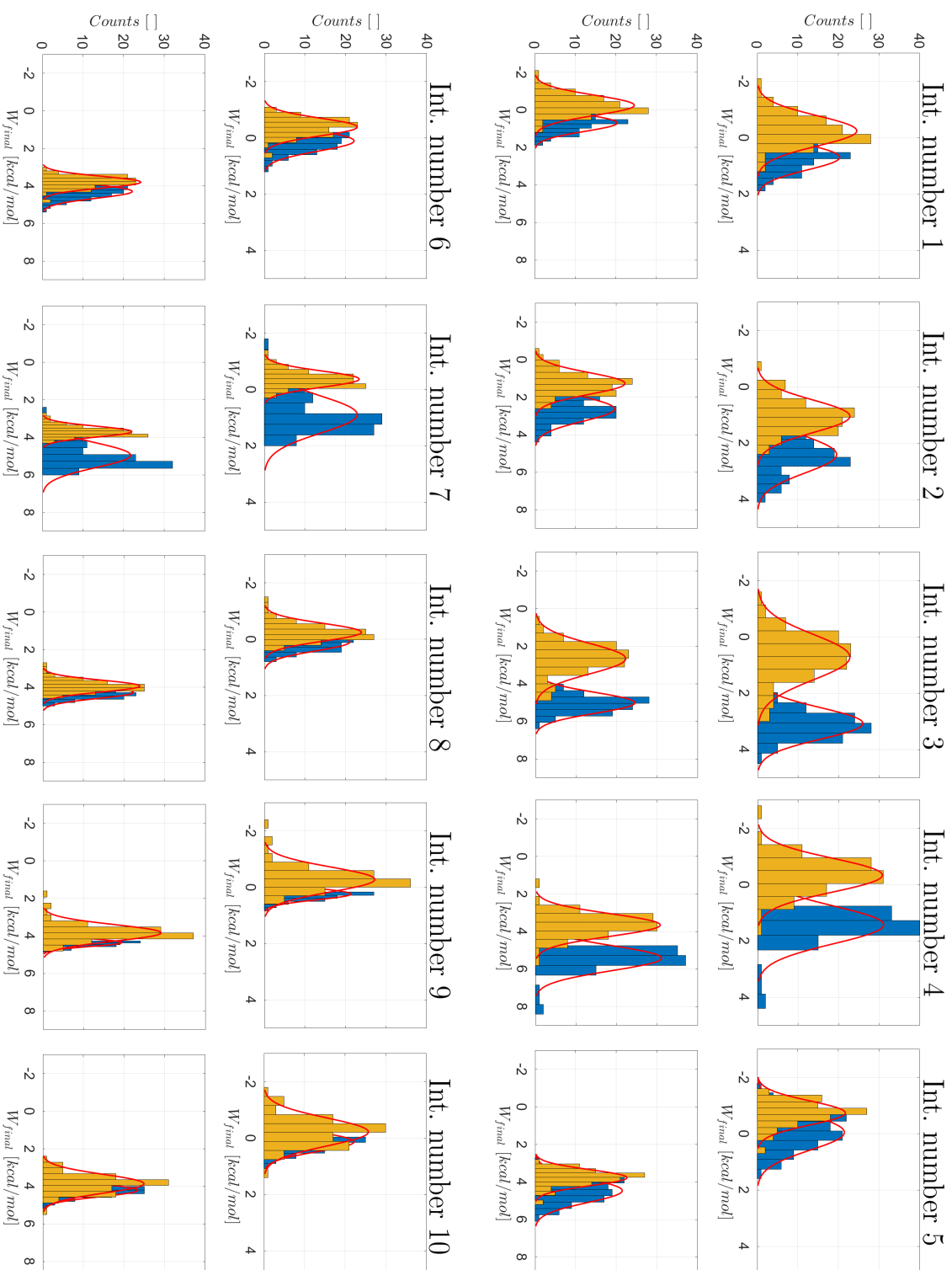
Obrázok (5.51) ukazuje histogramy použité metódou prieniku histogramov pre $t = 150 \text{ ns}$ (výsledky na obrázku (5.49)). Žltá farba označuje $\mathcal{P}_R(-\mathcal{W})$, modrá $\mathcal{P}_F(\mathcal{W})$. Červená krivka fit gaussovským rozdelením. Pri intervalových simuláciách sme volili stratégiu čiastkového vyhodnocovania na jednotlivých intervaloch (prvý a tretí riadok). Tieto výsledky sme posunuli o hodnotu voľnej energie v poslednom bode predchádzajúceho intervalu (druhý a štvrtý riadok). Ďalším prístupom je nalepiť na seba práce \mathcal{W} a vyhodnocovať až celkový vývoj. Avšak, toto nie je korektné, kvôli závislosti na lepení, kedy pre rôzne priradenia čiastkových výsledkov na intervaloch dostávame rôzne vývoje a rôznu distribúciu vykonanej práce.



Obr. 5.49: Simulácie A_{2A} receptoru na 10 intervaloch pre $n = 100$



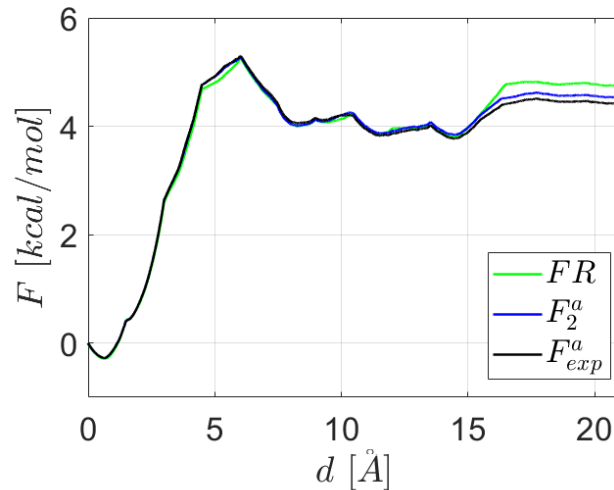
Obr. 5.50: Simulácie A_{24} receptoru na 10 intervaloch pre $n = 10$



Obr. 5.51: A_{2A} receptor a vyhodnocovanie metódou prieniku histogramov ($n = 100$)

Na oboch vyššie spomínaných obrázkoch (5.49) a (5.50) vidíme, že maximálna vzdialenosť pohybu virtuálneho atómu d odpovedá $d_{max} = 15 \text{ \AA}$. Táto hodnota je dostačujúca, aby sa ligand oddelil od väzbového miesta, avšak ešte nie je plne vzdialený od receptora a membrány, tak aby nedochádzalo k ich vzájomnej interakcií.

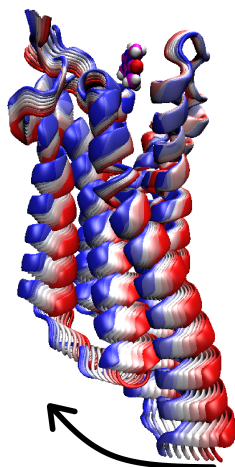
Z toho dôvodu sme urobili dodatočnú simuláciu do vzdialenosti $d = 21 \text{ \AA}$ s časom $t = 2 \text{ ns}$. Jej výsledky v kontexte FR metódy (metódu prieniku histogramov sme vynechali kvôli jej podobnosti) uvádzame v grafe (5.52). Pre vzdialenosť d väčšiu ako 15 \AA pozorujeme nárast aproximácií ΔF , spôsobený spomínanou interakciou ligandu s receptorom a s bunkovou membránou. Na druhej strane, toto zvýšenie nie je výrazné, dosahuje $\approx 0.5 \text{ kcal/mol}$ (okrem krivky FR, kde sa ale pravdepodobne prejavuje rýchlosť simulácie). Pri pomalších simuláciách sa dá ešte očakávať dodatočné zhladenie vývoja a zmiernenie pozorovaného vplyvu.



Obr. 5.52: Aproximácia ΔF pre $t = 2 \text{ ns}$,
 $n = 100$ a $d_{max} = 21 \text{ \AA}$

5.3.3 Rotácia A_{2A} receptoru

Analýzou rovnovážnych konfigurácií intervalových simulácií, uvedených na obrázkoch (5.49) a (5.50), sme zistili, že ukotvenie receptoru pomocou jedného atómu tryptofánu 246 nie je dostatočné. Počas ekvilibračných behov a dostatočne pomalých simulácií dochádza k rotácii receptoru (uvedenej na obrázku (5.53)) a k jeho odkláňaniu od osi z . Červená farba na obrázku (5.53) označuje prvotnú konformáciu receptoru, modrá zase jeho finálny stav.



Obr. 5.53: Rotácia A_{2A} receptoru počas ekvilibračíí

Na zamedzenie tohto javu sme zvolili dodatočnú fixáciu C_α uhlíku na rezíduách prolínu 215 a serínu 305 na vnútrobunkovej strane membrány (aby sa minimalizovalo ovplyvnenie väzbového miesta). Tri fixačné body boli dostatočné vďaka vysokej miere rigidity A_{2A} receptoru. Zo získaných výsledkov sme ale pozorovali výrazné odchýlenie od aproximácií pre $t = 150$ ns, ktoré vykazovali dobrú mieru konvergencie a teda sa dá predpokladať, že sa nachádzajú blízko rovnovážnej hodnoty ΔF . Konkrétne sme pozorovali, že finálna hodnota pre $d = 15$ Å bola ≈ 9 kcal/mol.

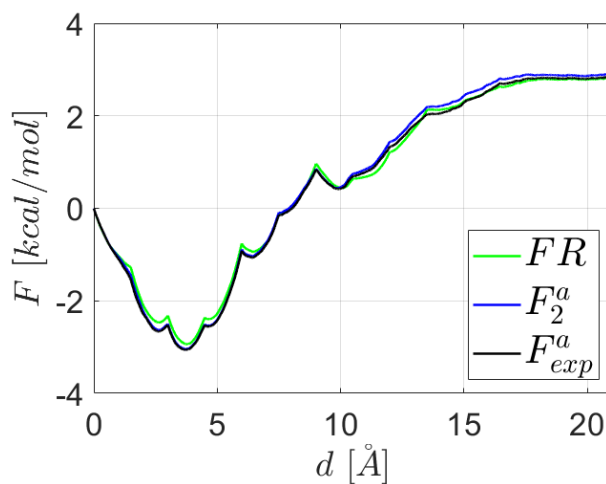
Na základe týchto výsledkov sme usúdili, že rotovanie A_{2A} receptoru v skutočnosti nie je parazitickým javom. Skôr predstavuje korekciu k nelineárnosti cesty z extracelulárnej strany membrány do väzbového miesta receptoru, ktorú pri ťahaní ligandu v smere osi z neuvažujeme.

Samozrejme, charakter tejto korekcie je len krátkodosahový, kvôli čomu pozorujeme pre menšie hodnoty t zlomy vo vývoji získaných výsledkov. Pre väčšie hodnoty t sa natáčanie aplikuje aj počas simulácií, čo pozorované priebehy zhladi.

5.3.4 Obmedzenie pohybu ligandu v rovine xy

Počas vyššie uvedených simulácií bol na $C4$ uhlík kofeínu aplikovaný harmonický potenciál (v smere všetkých troch súradnicových osí), ktorý v smere osi z pohyb kofeínu urýchlil a v rovine xy ho zase obmedzoval. Toto obmedzenie malo ale nepriaznivý vplyv na krivky spätných simulácií z hľadiska vyššie spomínaných zlomov, ktoré sa v získaných priebehoch nachádzajú hlavne pre menšie hodnoty t . Ako uvádzame vyššie, ich pôvod je vo vychýlení ligandu z prirodzenej oblasti, ktorou dochádza k jeho naviazaniu, čo viedlo k zvýšeniu hodnoty voľnej energie. Ako korekciu sme sa pokúsili zobrať rôzne hodnoty parametra tuhosti k_{xy} v rovine xy , konkrétne $k_{xy} = \{0.0, 0.1, 0.5\}$ kcal/mol/Å². Simulácie sme robili pre $n = 100$ a pre $t = 2$ ns. Ale, nedá sa povedať, že by získané výsledky vykazovali v tomto smere nejaké zlepšenie. V niektorých prípadoch sa dané správanie dokonca zhoršilo, keďže ligand získal väčšiu voľnosť a mohol častejšie zachádzať do steny receptora.

Avšak, veľmi zaujímavý (z hľadiska celkového priebehu) bol výsledok, ktorý sme získali pre $k_{xy} = 0.0$ kcal/mol/Å². V tomto prípade došlo k radikálnej zmene charakteru celkového vývoja, ako môžeme vidieť na obrázku (5.54), kde uvádzame výsledky získané aplikáciou FR metódy na spätné a dopredné behy.

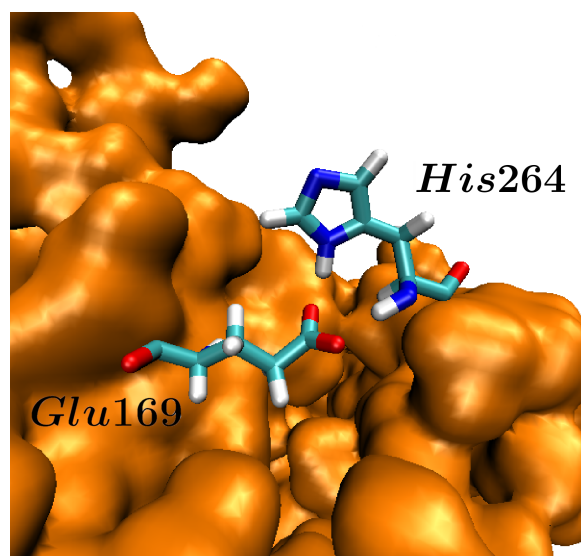


Obr. 5.54: Aproximácia ΔF pre $t = 2$ ns, $n = 100$ a $k_{xy} = 0.0$ kcal/mol/Å²

Prvotný počiatočný pokles voľnej energie bol spôsobený tým, že kofeín nebol počas niektorých simulácií vhodne orientovaný a postupne dochádzalo k nadobudnutiu prirodzenej konformácie. Ďalej je zaujímavé, že nepozorujeme typický prudký nárast získaných kriviek, ale postupné zvyšovanie hodnoty voľnej energie.

5.3.5 *His* – *Glu* solný mostík

Analýzou tohto priebehu sme zistili, že zmena charakteru je spôsobená vytvorením analógie solného mostíka medzi aminokyselinami histidínu 264 a kyseliny glutamovej 169. K vytvoreniu skutočného mostíka nemohlo dôjsť, pretože v danej štruktúre nebol histidín protonovaný. Napriek tomu došlo k priblíženiu kyseliny glutamovej ku kostre v blízkosti histidínu a k interakcií s jej kladne nabitým parciálnym $\delta+$ nábojom na vodíku (ako môžeme vidieť na obrázku (5.55)). Táto interakcia ostala zachovaná počas celej simulácie a spôsobila zmenšenie väzbového miesta receptora.



Obr. 5.55: Interakcia reziduí *His*264 a *Glu*169

5.3.6 Zhrnutie a diskusia

Kumulatívna dĺžka (15 μ s) pre sto najdlhších (150 ns) dopredných simulácií realizovaných na celom intervale naraz je značná. A ani v tomto prípade sme neboli schopní dosiahnuť plne skonvergovaný profil ΔF (ako ukazuje porovnanie s výsledkami rovnako dlhých spätných simulácií). Toto správanie je dôvodom, prečo sa SMD na kvantitatívny odhad väzbovej voľnej energie ligandov prakticky nepoužíva [5]. Hodnotenie (ranking) ligandov sa často realizuje len pomocou tzv. „rupture force“ metódy (kedy ligand prudko vytrhneme z väzbového miesta [80]).

To, či môžeme použiť spätné SMD simulácie v kontexte A_{2A} GPC receptora bola pre nás otvorená otázka. Ako sme ale ukázali, pri dostatočne pomalých spätných simuláciách, konvergujú získané výsledky k dopredným behom. Čo do istej miery vypovedá o ich korektnosti. V prípade MD simulácií realizovaných na celom intervale bolo ale nevyhnutné uplatniť obmedzenie na pohyb ligandu v rovine xy , aby sa neodchýlil a aby našiel cestu do väzbového miesta na extracelulárnej strane A_{2A} GPCR. V prípade MD simulácií realizovaných na subintervaloch sa ukázalo, že takýto problém nenastáva (respektíve, nie je taký výrazný).

Ďalej nebolo dopredu jasné, či pri spätnom pohybe ligandu do väzbového miesta nebude dochádzať k jeho rotácií a k zaujatiu prirodzene sa nevyskytujúcej konformácie. Avšak, pozorovali sme, že minimálne u kofeínu dochádza aj v prípade jeho nesprávnej počiatočnej konformácie vo väzbovom mieste k jej spontánnemu skorigovaniu behom MD simulácie.

Celkovo sme ukázali, že pri použití spätných a dopredných simulácií súčasne, v kontexte FR metódy, respektíve metódy prieniku histogramov a v prípade výpočtov realizovaných na subintervaloch dostávame veľmi dobré výsledky. Konkrétne pozorujeme, že získaný priebeh je až na malé zmeny prakticky nezávislý od použitého simulačného času (od $t = 2$ ns vyššie).

Celkovo má náš prístup veľký potenciál z hľadiska klasifikácie veľkého množstva potenciálnych ligandov (v našom prípade vygenerovaných programom Autogrow), kedy už len na základe pár rýchlych simulácií (získaných v priebehu niekoľkých hodín), by sme boli schopní odhadnúť hodnotu väzbovej voľnej energie a následne, pre tých najperspektívnejších kandidátov, priebeh ΔF ďalej upresňovať pomocou väčšieho množstva SMD trajektórií.

Experimentálne určená hodnota väzbovej voľnej energie kofeínu je $F_e^{cof} \approx 6.35$ kcal/mol [3]. K tejto hodnote sa pomerne dobre približujeme. Avšak, je potrebné si uvedomiť, že v časti našich MD simulácií bola daná zhoda pravdepodobne spôsobená kanceláciou niekoľkých proti sebe pôsobiacich nepresností.

V prvom rade to, že v časti trajektórií bol pohyb kofeínu výrazne obmedzený v rovine xy , efektívne zvyšuje profil voľnej energie v oblasti, kedy je ligand uvoľnený z väzbového miesta. Vďaka tomu je potrebné počítať s takzvanou korekciou štandardného stavu (Standard State Correction, alebo SSC). Tá by znížila profil

väzbovej voľnej energie až o ≈ 4 kcal/mol [23, 81].

Na druhú stranu, nami používaná štruktúra A_{2A} GPC receptoru neobsahovala solný mostík medzi aminokyselinou histidínu *His264* a kyselinou glutamovou *Glu169*. Ten bol pozorovaný napríklad v štruktúre 5MPZ. Avšak, mimo kontext kryštálových štruktúr je jeho prítomnosť diskutabilná [82, 83]. Realizácia danej interakcie protonáciou histidínu a pootočením postranného reťazca kyseliny glutamovej by nepochybne niekoľko kcal/mol do výsledného profilu naopak pridala.

Najpriamočiarejšie porovnateľný s výsledkom experimentu je teda zrejme profil voľnej energie zo simulácie, kedy ligand nebol fixovaný v rovine xy , došlo k spontánnej úprave jeho počiatočnej konformácie vo väzbovom mieste A_{2A} GPC receptoru a zároveň došlo k spontánnemu vytvoreniu interakcie medzi postranným reťazcom *Glu169* a kostrou proteínu v oblasti *His264*. Zhoda s experimentom je až prekvapivo dobrá.

Kvantitatívna zhoda medzi experimentom a výpočtami sa totiž v prípade štandardnej väzbovej voľnej energie zatiaľ bežne nedosahuje. A to ani pri použití špecializovaných superpočítačov, ktorých výkon výrazne prevyšuje nám dostupné zdroje [84] a ani v prípade oveľa jednoduchších systémov, ako sú konformačne flexibilné GPC receptory, ktorých štruktúry sa darí úspešne určovať až v poslednej dekáde (iné štruktúry boli vyriešené už v 50. rokoch). V aktuálnych kryštálových štruktúrach sú extracelulárne slučky GPC receptorov priamo nad väzbovým miestom podrobené takzvaným „crystal packing forces“ a teda sú viac alebo menej deformované.

V budúcom pokračovaní tejto práce by sme mohli dosiahnuť zlepšenie doterajších výsledkov generovaním súboru rôznych počiatočných konformácií A_{2A} GPC receptoru, pre ktoré by sme separátne získali riadenou molekulárnou dynamikou profily voľnej energie. Tieto vývoje by sme následne skombinovali na určenie finálnej závislosti ΔF .

Ďalšou možnosťou je fixácia receptoru (aby nedošlo k narušeniu jeho prirodzenej štruktúry) počas prípravných rýchlych SMD simulácií, potrebných na generovanie počiatočných konformácií ligandu pre subintervalové simulácie. Tieto počiatočné konforméry by dokonca ani nemuseli byť generované pomocou SMD simulácií. Stačilo by ligand umiestniť do vhodných polôh pozdĺž reakčnej koordináty pomocou skriptov vo VMD a potom urobiť krátke minimalizácie energie.

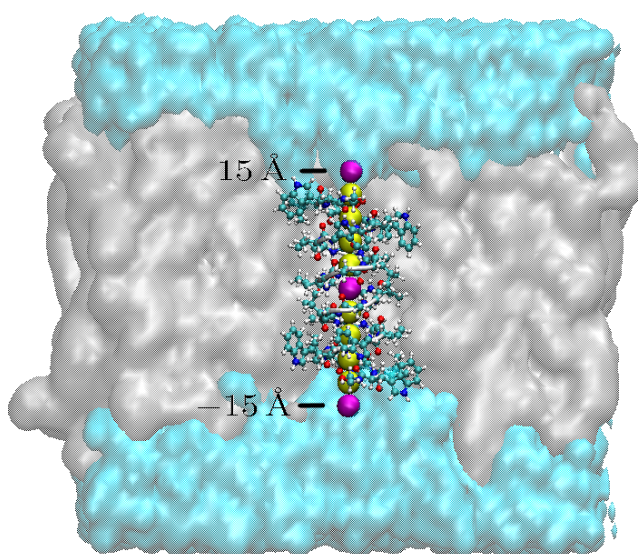
Okrem toho môžeme skúsiť aplikovať rôzne druhy silových polí a to buď na receptor, bunkovú membránu alebo na molekuly vody. Môžeme urobiť presnejšiu parametrizáciu nami používaného ligandu pomocou ab initio výpočtov (napríklad pomocou Force field Toolkitu). Prípadne uvažovať presun a teda reparametrizáciu náboja v dôsledku zmeny konformácie ligandu [85]. Ďalej si je potrebné uvedomiť, že použitie konštantných bodových nábojov v súčasných silových poliach vôbec nie je ideálne. Avšak, už existujú aj polarizovateľné alternatívy, samozrejme za cenu

vyšších výpočtových nárokov (Drude [86] alebo AMOEBA [87]). Okrem toho by bolo zaujímavým príspevkom zahrnutie anizotropie van der Waalsovských síl (ne-uvažovať o atómoch ako o ideálnych guľičkách), čo by sa značne prejavilo napríklad v kontexte atómu síry [88, 89].

Vďaka týmto a mnohým iným vylepšeniam sa budeme mať možnosť postupne dostávať od semikvantitatívnej relatívnej zhody s experimentom ku kvantitatívnej zhode a k vylepšovaniu získaných výsledkov.

5.4 Gramicidín A

Táto kapitola sa bude zaoberať riadenými molekulárne dynamickými simuláciami prechodu katiónu K^+ iónovým kanálom Gramicidínu A (s PDB kódom 1JNO). Jeho vizualizáciu uvádzame na obrázku (5.56). Pomocou izohodnoty gaussovského povrchu sme zobrazili molekuly vody (modré oblasti) a fragment lipidovej membrány (šedá farba). Okrem vyobrazenia študovaného systému uvádzame aj medzikonfigurácie testovacieho iónu K^+ (označeného žltou, respektíve fialovou farbou). Fialovou farbou označujeme hraničné konfigurácie K^+ , z ktorých sme uskutočňovali simulácie na dvoch intervaloch. Žltou farbou zase vyobrazujeme medzikonfigurácie využité v intervalových simuláciách na 10 intervaloch.



Obr. 5.56: Vizualizácia jedného zo simulačných prostredí Gramicidínu A

Gramicidín A obsahuje neštandardné terminálne rezíduá FVA a ETA. V štúdiách prezentovaných v literatúre nie je vždy explicitne popísané, či ich autori zahrnuli do simulovaného systému poprípade, ako sa vysporiadali s ich parametrizáciou.

Preto sme v počiatočných simuláciách pracovali s upravenou verziou Gramicidínu A, ktorá spočívala v odstránení neštandardných FVA a ETA rezíduí a ich nahradením štandardnými patchmi. V následných simuláciách sme potom pracovali aj s kompletnou verziou Gramicidínu A, pričom sme využili, že helix Gramicidínu je dostatočne malý na to, aby mohol byť ako celok parametrizovaný knižnicou CGenFF (<https://cgenff.umaryland.edu/>). Označenie “Patch” a “Whole” v ďalšom texte teda predstavuje upravený a pôvodný/kompletný Gramicidín A.

Pre tento membránový kanál sme v našich simuláciách volili niekoľko rôznych

typov simulačných prostredí. Pracovali sme s membránami typu POPC a POPE a okrem toho sme uvažovali aj rôzne veľkosti použitých membránových fragmentov. Taktiež sme testovali vplyv solí KCl s koncentráciou $c_{KCl} = 0.20 \text{ mol L}^{-1}$.

V tabulke (5.4) uvádzame volby použitých simulačných podmienok, spolu s prislúchajúcim počtom charakteristických skupín atómov alebo molekúl. S_{mem} a n_{lip} označuje plochu fragmentu bunkovej membrány a prislúchajúci počet lipidových atómov. n_{sys} a n_{gA} označujú celkový počet atómov v systéme a počet atómov gramicidínu. n_{H_2O} a n_{KCl} zodpovedajú počtu molekúl vody a KCl .

Tabulka 5.4: Simulačné podmienky Gramicidínu A

| Gram. A | Lipidy | $S_{mem} [\text{Å}^2]$ | $n_{sys} []$ | $n_{gA} []$ | $n_{lip} []$ | $n_{H_2O} []$ | $n_{KCl} []$ |
|---------|--------|------------------------|---------------|--------------|---------------|----------------|---------------|
| Patch | POPC | 50x50 | 12089 | 532 | 5734 | 1941 | 7 |
| Patch | POPC | 72x72 | 27787 | 532 | 15618 | 3879 | 15 |
| Patch | POPC | 72x72 | 27847 | 532 | 15678 | 3879 | 0 |
| Patch | POPE | 50x50 | 11363 | 532 | 5347 | 1828 | 7 |
| Patch | POPE | 72x72 | 26721 | 532 | 14819 | 3790 | 14 |
| Patch | POPE | 72x72 | 26777 | 532 | 14875 | 3790 | 0 |
| Whole | POPC | 72x72 | 27733 | 552 | 15544 | 3879 | 0 |
| Whole | POPE | 50x50 | 11536 | 552 | 5500 | 1828 | 0 |
| Whole | POPE | 72x72 | 26666 | 552 | 14750 | 3788 | 0 |

Vyššie uvedené systémy sme minimalizovali po dobu 2000 krokov. Následne sme aplikovali žihanie a ekvilibračiu po dobu 20 ns.

V priebehu simulácií sme pohybovali draslíkovým iónom v smere osi z harmonickým potenciálom s tuhosťou $k = 20.0 \text{ kcal/mol/Å}^2$. Pohyb bol uskutočnený do vzdialenosti 30 Å, zo spodnej alebo z vrchnej časti kanála (s polohou $\{0, 0, \pm 15\} \text{ Å}$).

V smere osí x a y bol pohyb K^+ niekedy obmedzený harmonickým potenciálom s tuhosťou $k = 20.0 \text{ kcal/mol/Å}^2$. Rovnakým potenciálom bola fixovaná aj kostra gramicidínu, aby sa zamedzilo jej rozpochybovaniu v dôsledku pohybu K^+ . V tomto prípade bola fixácia aplikovaná len v smere osi z (korešpondujúcej s osou symetrie kanálu).

Vo všetkých prípadoch sme po vložení testovacieho K^+ (a prislúchajúceho Cl^- , na ktorý sme žiadne obmedzenie neuplatnili a nechali sme ho voľne difundovať simulovaným systémom) aplikovali dodatočnú minimalizáciu vo veľkosti 10000 krokov a následné žihanie a ekvilibračiu po dobu 6 ns.

5.4.1 Delenie na 2 intervaly a $S_{mem} = 50 \times 50 \text{ \AA}^2$

Počiatočné simulácie, s upravenou verziou kanálu, boli rozdelené na dva intervaly prislúchajúce jednotlivým helixom o veľkosti 15 \AA . Simulácie boli realizované pre oba typy bunkovej membrány s rozmermi $S_{mem} = 50 \times 50 \text{ \AA}^2$ a s koncentráciou solí $c_{KCl} = 0.20 \text{ mol L}^{-1}$. Ich výsledky uvádzame na (5.57a) a (5.57b). V prvom prípade bol pohyb katiónu K^+ v rovine xy obmedzený, v druhom prípade nie. Dĺžka simulácií odpovedala $t = 2 \text{ ns}$ a uvádzané priebehy sme získali pre $n = 10$ trajektórií.

Z hľadiska farebných označení sa držíme vyššie zaužívanej konvencie. Priebeh F_1 označujeme zelenou farbou, vývoj F_2 modrou a F_{exp} označujeme čiernou. Fialová farba zodpovedá aproximácií metódou prieniku histogramov.

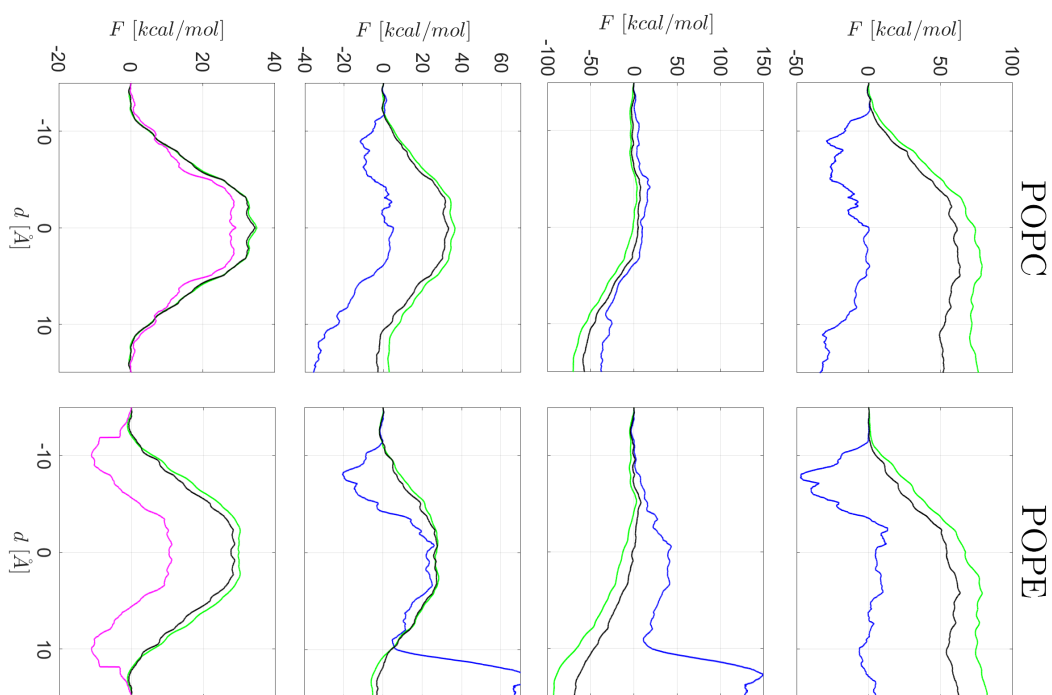
Vo všetkých grafoch platí, že prvý riadok zodpovedá dopredným simuláciám, kedy K^+ prechádzal na prvom intervale z pozície $\{0, 0, -15\} \text{ \AA}$ do polohy $\{0, 0, 0\} \text{ \AA}$ a na druhom intervale z polohy $\{0, 0, 0\} \text{ \AA}$ do polohy $\{0, 0, 15\} \text{ \AA}$. Druhý riadok odpovedá výsledkom získaným v prípade spätných simulácií. Tretí riadok je produktom aplikácie FR metódy na predchádzajúce dva súbory. Na štvrtom riadku sme pre skvalitnenie priebehov aplikovali symetrizáciu okolo stredu Gramicidínu (vzhľadom k jeho priestorovej symetrii).

V prípade metódy prieniku histogramov sme symetrizáciu zahrnuli priamo do použitého kódu, kvôli čomu ju neuvádzame v prechádzajúcom riadku.

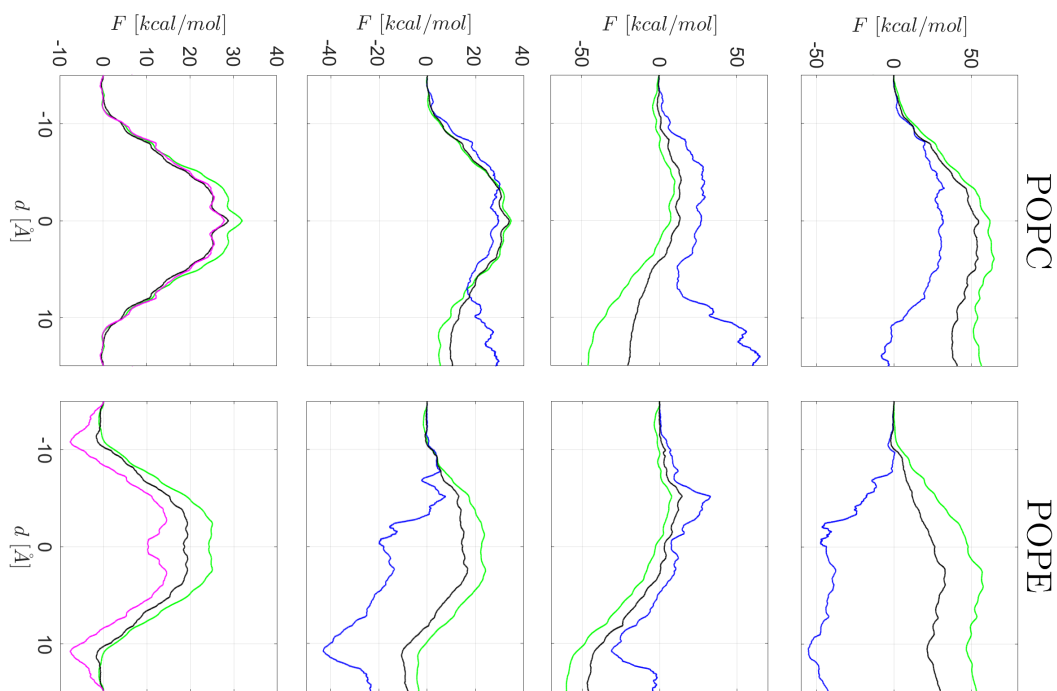
Naopak, priebeh F_2 sme sa v poslednom riadku rozhodli vynechať, lebo nedáva rozumné výsledky. Obdržaný vývoj javí len minimálne známky symetrie voči stredu kanálu a prudko osciluje. Toto zlyhanie bolo zapríčinené nedostatkom stredovaných trajektórií a ich veľkým rozptylom v dôsledku značnej rýchlosti vykonávanej simulácie.

Celkovo získané výsledky nejavia žiadne významnejšie rozdiely medzi rôznymi typmi použitých lipidov. Žiadne výraznejšie zmeny nespôsobila ani fixácia pohybu K^+ v smere osí x a y .

Obr. 5.57: Aproximácia ΔF pre $t = 2$ ns, $n = 10$ a $S_{mem} = 50 \times 50 \text{ \AA}^2$



(a) Fixácia K^+ v rovine xy



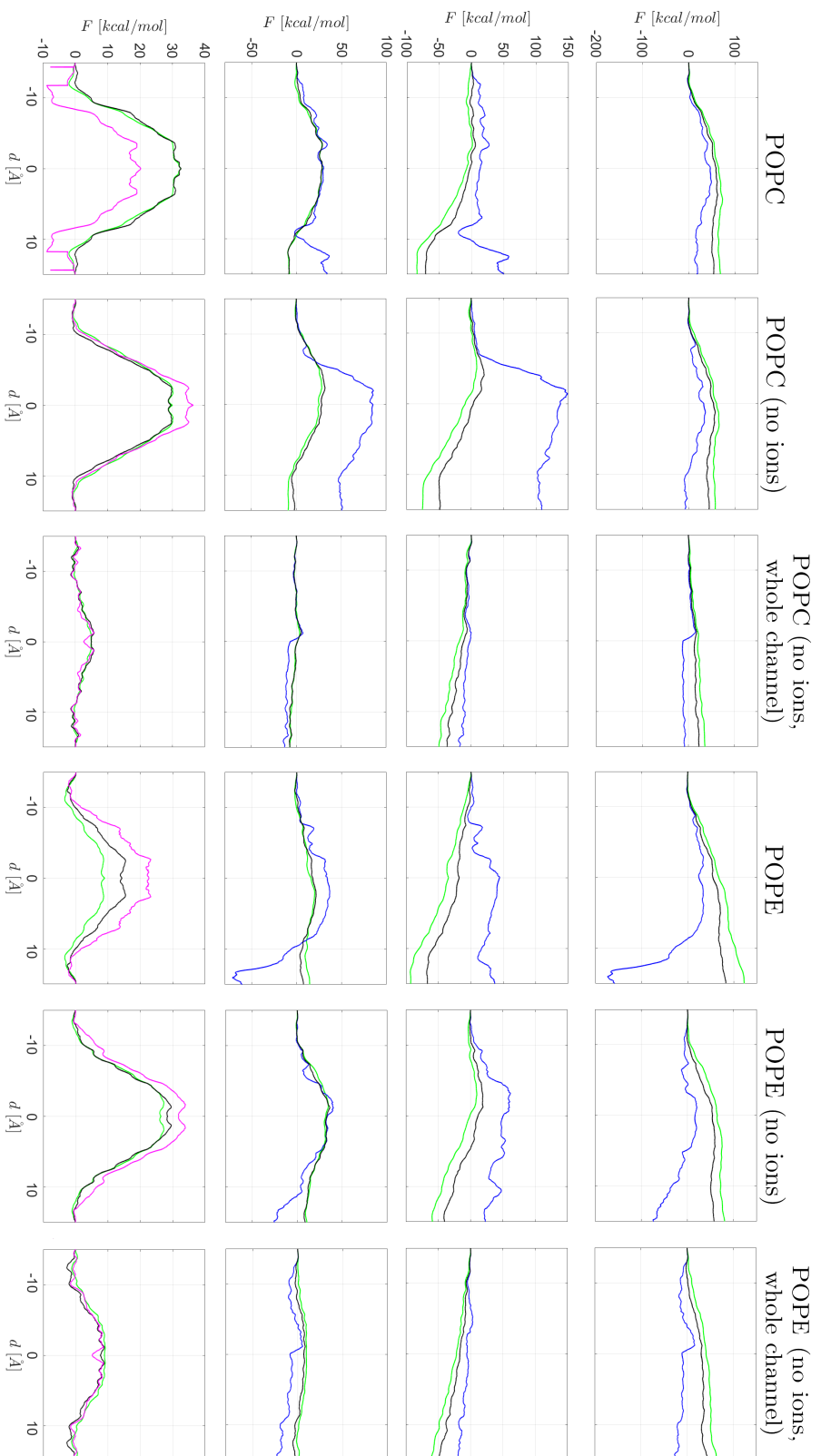
(b) Uvolnenie K^+ v rovine xy

5.4.2 Delenie na 2 intervaly a $S_{mem} = 72 \times 72 \text{ \AA}^2$

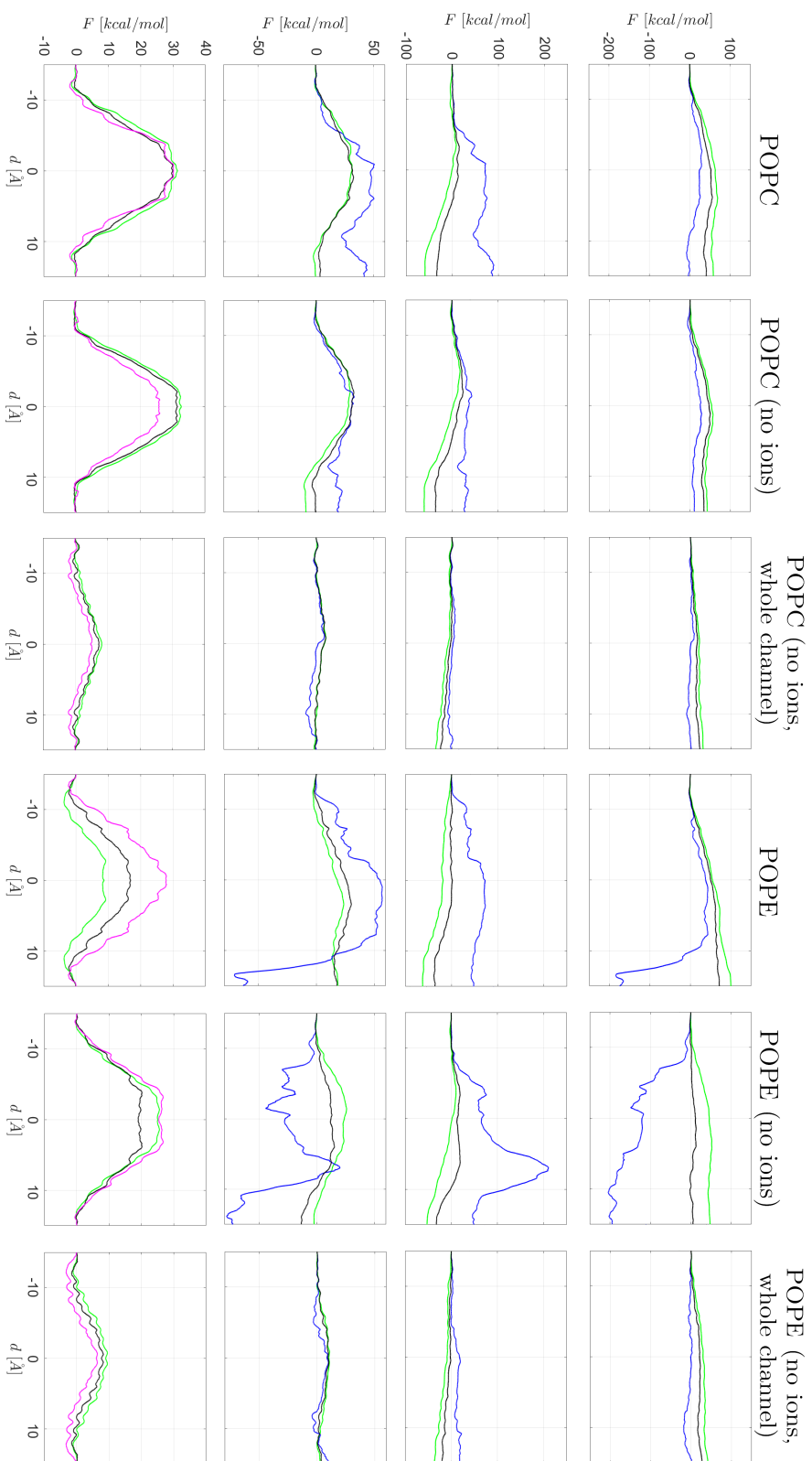
Na obrázkoch (5.58) a (5.59) uvádzame v 1. a 4. stĺpci výsledky pre bunkovú membránu POPC a POPE o rozmeroch $S_{mem} = 72 \times 72 \text{ \AA}^2$, za analogických podmienok ako v predchádzajúcej podkapitole pre $S_{mem} = 50 \times 50 \text{ \AA}^2$. Z porovnania s predchádzajúcou kapitolou je zrejmé, že zmena plochy bunkovej membrány S_{mem} nemala na simulácie s lipidmi typu POPC prakticky žiaden závažnejší vplyv. Avšak, medzi výsledkami “POPC” a “POPE” si môžeme všimnúť značný rozdiel, ktorý po symetrizácii pre FR metódu predstavuje až $\approx 20 \text{ kcal/mol}$ (pri vyhodnotení metódou prieniku histogramov a F_{exp} sme taký výrazný pokles nezaznamenali). Bližšou analýzou sme zistili, že tento rozdiel nebol spôsobený inou kompozíciou membrány (ako napovedajú aj výsledky z predchádzajúcej kapitoly pre $S_{mem} = 50 \times 50 \text{ \AA}^2$), ale prítomnosťou iónov solí KCl . Pozorovali, sme že v jednej z rovnovážnych medzikonfigurácií došlo k asociácii Cl^- s vnútornými koncami helixov Gramicidínu A (ktoré boli v upravenej verzii gramicidínu kladne nabité). Vďaka tomu mal daný anión značný vplyv na priebeh ΔF , keďže efektívne tienil elektrostatické pôsobenie nabitých koncov na testovací kation K^+ . Okrem toho sme pozorovali, že dochádzalo k asociácii kationov K^+ so vstupom kanála, čo taktiež skresľovalo vývoj ΔF .

Vzhľadom na tieto vplyvy sme sa rozhodli odstrániť dodatočne pridané ióny a uvažovať len prítomnosť solventu (2. a 5. stĺpec - “no ions”).

Ďalej, ako sme uviedli v kapitole (1.4), by daný kanál mal byť pre anióny nepriepustný a teda by malo byť veľmi nepravdepodobné, aby sa Cl^- dostal až do jeho stredu. Z toho dôvodu sme usúdili, že aplikované koncové patche nie sú vôbec korektné a rozhodli sme sa ich odstrániť a prinavrátiť neštandardné terminálne rezíduá FVA a ETA (3. a 6. stĺpec - “whole channel”). V prípade tejto pôvodnej verzie Gramicidínu A vidíme výrazné zníženie maximálnej hodnoty ΔF (podobne ako predtým, v kontexte tienenia kladne nabitého koncového patchu pomocou Cl^-). Tento výsledok je rozumný, keďže plná štruktúra Gramicidínu A sa vyznačuje elektroneutrálnymi koncami helixov.



Obt. 5.58: Aproximação ΔF pre $t = 2$ ns, $n = 10$ a $S_{mem} = 72 \times 72 \text{ \AA}^2$ (plná fixácia K^+)

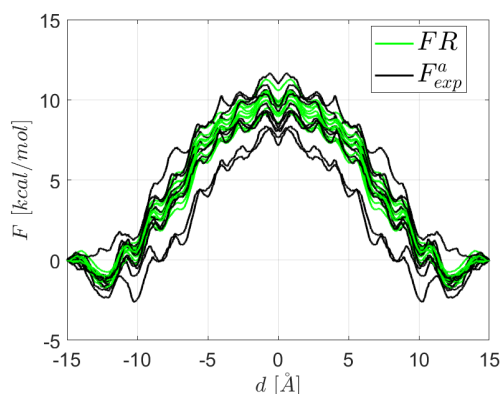


Obr. 5.59: Aproximácia ΔF pre $t = 2$ ns, $n = 10$ a $S_{mem} = 72 \times 72 \text{ \AA}^2$ (fixácia v smere osi z)

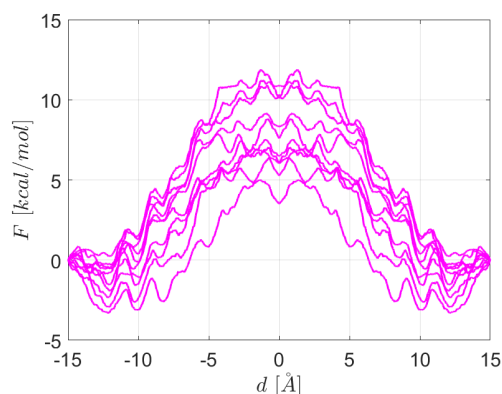
5.4.3 Delenie na 2 intervaly a $S_{mem} = 72 \times 72 \text{ \AA}^2 - 10 \times 10$ trajektórií

Ďalej sme urobili dodatočné simulácie (100 trajektórií) určené na odhadnutie rozptylu predtým získaných dát s pôvodnou verziou Gramicidínu A. Všetky boli urobené na dvoch intervaloch pre $S_{mem} = 72 \times 72 \text{ \AA}^2$, POPE a bez prítomnosti solí. Harmonický potenciál pôsobil na K^+ len v smere osi z . Celkový simulačný čas zodpovedal $t = 2 \text{ ns}$.

Symetrizované FR aproximácie priebehu ΔF uvádzame na obrázkoch (5.60) a (5.61). Pozorujeme, že priebeh F_1 má rozptyl získaných kriviek (v zmysle rozdielu maximálneho a minimálneho vývoja) približne vo veľkosti $\approx 2 \text{ kcal/mol}$. F_{exp} vykazuje rozptyl vo veľkosti $\approx 2 - 3 \text{ kcal/mol}$, čo nie je prekvapivé vzhľadom na nízke $n = 10$. Taktiež pozorujeme výrazný rozptyl získaných trajektórií v prípade metódy prieniku histogramov, ktorý dosahuje hodnôt $\approx 6 - 7 \text{ kcal/mol}$. Tieto rozdiely sú pravdepodobne spôsobené zlou kvalitou získaných histogramov (znova vzhľadom k nízkemu $n = 10$). Kvalita F_2 bola, tak ako predtým, veľmi zlá, kvôli čomu ju vôbec neuvádzame.



Obr. 5.60: Priebehy F_1 a F_{exp} pre $t = 2 \text{ ns}$ a $n = 10$

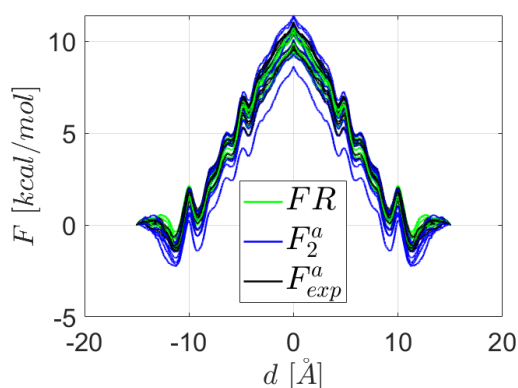


Obr. 5.61: Metóda prieniku histogramov pre $t = 2 \text{ ns}$ a $n = 10$

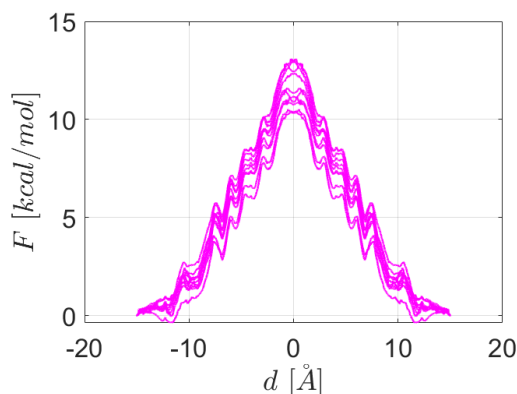
5.4.4 Delenie na 10 intervalov a $S_{mem} = 72 \times 72 \text{ \AA}^2$

V tejto podkapitole uvidíme výsledky zo simulácií na 10 intervaloch (s veľkosťou 3 \AA). Dĺžka simulácií na jednotlivých intervaloch bola 15 ns s celkovým časom $t = 150 \text{ ns}$. Ich účelom bolo čo najlepšie aproximovať rovnovážny vývoj ΔF .

Výsledky, ktoré sme počas týchto simulácií získali uvádzame v prípade použitia FR metódy na grafe (5.62). V grafe (5.63) zase uvádzame priebehy získané použitím metódy prieniku histogramov.



Obr. 5.62: Priebehy F_1 , F_2 a F_{exp} pre $t = 150 \text{ ns}$ a $n = 10$



Obr. 5.63: Metóda prieniku histogramov pre $t = 150 \text{ ns}$ a $n = 10$

V porovnaní s grafmi (5.60) a (5.61) môžeme vidieť, že použitím 10 intervalov a predĺžením simulačného času sa kvalita získaných aproximácií výrazne zvýšila. Konkrétne pozorujeme, že je už použiteľná aj F_2 , ale zároveň aj zmenšenie rozptylu ostatných aproximácií. V prípade F_1 a F_{exp} vidíme, že došlo k redukcii približne na hodnotu $\approx 1 \text{ kcal/mol}$. Metóda prieniku histogramov vykazuje polovičnú redukciiu na $\approx 3 - 3.5 \text{ kcal/mol}$.

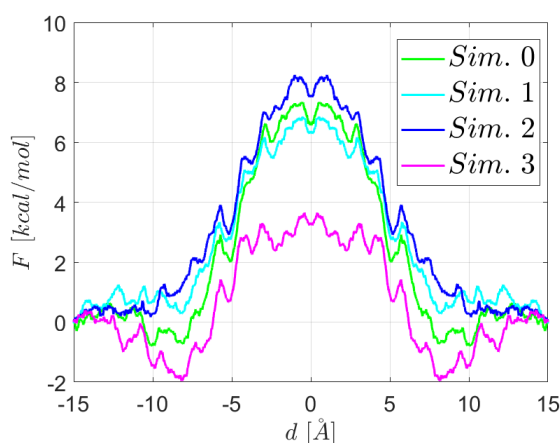
Napriek výraznému zlepšeniu je ale nutné si uvedomiť značnú náročnosť realizovaných simulácií. Konkrétne sme museli na zredukovanie rozptylu aproximácií ΔF na polovicu vykonať 75-násobne dlhšie simulácie s 5-násobným množstvom použitých intervalov. Okrem toho pozorujeme, že metóda prieniku histogramov (pri nízkom $n = 10$) systematicky nadhodnocuje výsledky získané zo zvyšných aproximácií.

5.4.5 Aproximácia rovnovážneho priebehu

Poslednou množinou realizovaných výpočtov boli 4 simulácie o dĺžke $t = 500$ ns na dvoch intervaloch s lipidmi typu POPE a $S_{mem} = 50 \times 50 \text{ \AA}^2$, s pôvodnou verziou gramicidínu A a bez výskytu dodatočných iónov solí KCl .

Pomocou separátnych trajektórií sme sa snažili získať vývoje, ktoré by s rozumnou presnosťou aproximovali rovnovážny priebeh ΔF . Prvotná myšlienka predpokladala použitie FR metódy (na prienik histogramov sme nemali dostatok trajektórií). Avšak, v prípade, keď sme sa ku gramicidínu približovali z vonkajšej strany došlo k vzájomnému vzdialeniu sa daného kanála a K^+ a k prechodu K^+ priamo do lipidovej dvojvrstvy. Dôvodom bola pomalá rýchlosť pohybu virtuálneho atómu a voľnosť membránového kanála a testovacieho iónu K^+ z hľadiska pohybu v rovine xy .

Kvôli tomu sme používali len výsledky získané počas dopredných a spätných behov vychádzajúcich zo stredu gramicidínu. Tieto priebehy môžeme vidieť na grafe (5.64). Je zrejmé, že uvádzaný vývoj je ešte pomerne ďaleko od rovnovážneho. Avšak, okrem jednej trajektórie sa maximálna hodnota \mathcal{W} pohybuje okolo $\approx 7 - 8$ kcal/mol. Získanie týchto výsledkov bolo značne výpočtovo náročné, ale vidíme, že zvýšenie počtu stredovaných trajektórií n alebo počtu intervalov, by pravdepodobne viedlo k trajektóriám v dobrej zhode s vývojom ΔF .



Obr. 5.64: Vývoj \mathcal{W} prechodu K^+ gramicidínom pre $t = 500$ ns

5.4.6 Zhrnutie a diskusia

Gramicidín A je veľmi obľúbený modelový systém, ktorý bol pomocou výpočtov skúmaný prvýkrát už v roku 1984 [90]. Motiváciou pre naše výpočty boli do značnej miery zjavné rozdiely v profiloch voľnej energie, ktoré boli v toku času prezentované v literatúre. Výsledky, ktoré sme získali v prípade pôvodnej verzie iónového kanálu Gramicidínu A sú vo veľmi dobrej zhode s výsledkami uvádzanými v prácach [6] (nerovnovážne SMD simulácie) a [23] (rovnovážne MD a metóda US). Výsledky, ktoré sme získali v prípade upravenej verzie iónového kanálu Gramicidínu A sa naopak blížia výsledkom zo štúdií [91, 92] (nerovnovážne SMD simulácie).

Ako najpravdepodobnejšie vysvetlenie pre nesúlad vo výsledkoch vyššie uvedeníých štúdií sa nám teda teraz javí použitie rôznych verzií Gramicidínu A rôznymi autormi.

Okrem toho nám naakumulované trajektórie umožnili ďalej otestovať výhody a obmedzenia aproximácií používaných pri výpočtoch voľnej energie.

V prípade počiatočných výsledkov, ktoré sme pre Gramicidín uvádzali, sme pozorovali výrazné zlyhanie aproximácie ΔF získanej rozvojom Jarzynského identity do druhého kumulantu F_2 . Ako sme ale videli, so zvýšením simulačného času a počtu použitých intervalov sa táto aproximácia značne zlepšila. Z toho vyplýva, že pozorované zlyhanie bolo zapríčinené nedostatkom stredovaných trajektórií a ich veľkým rozptylom v dôsledku značnej rýchlosti vykonávanej simulácie.

V prípade vývojov, získaných počas tienenia kladného náboja v strede upravenej verzie Gramicidínu pomocou Cl^- , sme pozorovali nekonzistenciu výsledkov získaných metódou FR, F_{exp} a prieniku histogramov. Z hľadiska F_{exp} tento vývoj nie je až tak prekvapivý, vzhľadom na citlivosť exponenciálneho stredovania na vychýlené trajektórie. V prípade metódy prieniku histogramov je ale tento výsledok zaujímavejší, aj keď je pravdepodobne spôsobený nekvalitným popisom distribúcií $\mathcal{P}_{F/R}(\pm W)$ charakterizovanými len 10 trajektóriami.

Pri porovnaní dopredných a spätných simulácií sme pre rôzne verzie Gramicidínu pozorovali nezanedbateľné rozdiely v charaktere daného vývoja. Tieto odchýlky sú zapríčinené prítomnosťou kladne nabitých koncov helixov upravenej verzie kanálu. Pri vstupe do kanála musíme kvôli elektrostatickej repulzii konať značné množstvo práce, aby sme sa k týmto koncom priblížili. Následne, nám ale po prechode touto oblasťou, spomínaná repulzia kompenzuje časť vykonanej práce, vďaka čomu sa hodnoty F_1 a F_{exp} už výraznejšie nemenia.

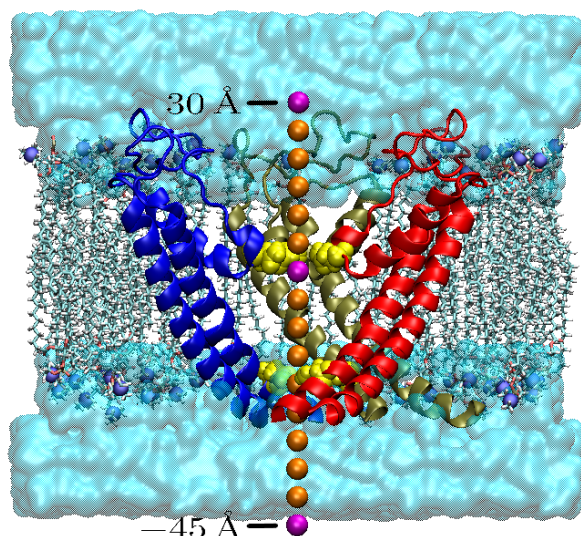
Tak, ako v predchádzajúcich častiach pozorujeme, že výsledky, získané metódou prieniku histogramov sú porovnateľné s výsledkami získanými aplikáciou FR metódy. Avšak, nízka kvalita použitých histogramov sa v prípade výsledkov pre "POPC" pre $S_{mem} = 72 \times 72 \text{ \AA}^2$ a pre "POPE" pre $S_{mem} = 50 \times 50 \text{ \AA}^2$ prejavuje vo výrazných nespojitostiach v priebehu daných závislostí. Dá sa očakávať, že so

zvýšením počtu stredovaných trajektórií dôjde k zlepšeniu uvádzaných priebehov.

Vlnenie, prítomné vo všetkých priebehoch, je dôsledkom helikálnej štruktúry kanálu. Jednotlivé lokálne nárasty sú spôsobené prechodom K^+ okolo závitú helixu a vzájomnou interakciou so záporným parciálnym nábojom δ^- kyslíkových atómov, zodpovedných za selektivitu kanálu.

5.5 Iónový kanál TRPM2

Ako poslednému sa budeme v tejto kapitole venovať iónovému kanálu TRPM2. Konkrétne sa budeme snažiť určiť, čo najlepšiu aproximáciu priebehu voľnej energie ΔF prechodu vápnikového iónu Ca^{2+} v prípade, že pracujeme s otvorenou, respektíve so zatvorenou konformáciou tohto kanálu. Vizualizáciu otvoreného TRPM2 kanálu uvádzame na obrázku (5.65).



Obr. 5.65: Východzie konfigurácie Ca^{2+} intervalových simulácií kanálu TRPM2

Žltou farbou označujeme aminokyseliny *Asn997* a *Asn1064* prislúchajúce k filtru selektivity a spodnej bráne TRPM2. Pre lepšiu prehľadnosť sme jednu z jednotiek tetramérneho usporiadania nevykreslovali.

Okrem implicitnej reprezentácie vodnej obálky a zobrazenia bunkovej membrány uvádzame na obrázku (5.65) aj medzikonfigurácie prechádzajúceho vápnikového iónu, ktorým sme pohybovali na vzdialenosti 75 Å, s parametrom tuhosti harmonického potenciálu virtuálneho atómu $k = 20.0 \text{ kcal/mol/\AA}^2$. Fialovou farbou sú označené polohy Ca^{2+} , ktoré odpovedajú hraničným súradniciam a polohe s nulovou komponentou na osi z . Uvádzané medzikonfigurácie označujú polohy vápnikového iónu použité v prípade realizácie simulácií na intervaloch.

V tomto prípade sme sa museli kvôli jeho značným rozmerom (≈ 30000 atómov) obmedziť na α -helixy S5 a S6, ktoré v tetramérnom usporiadaní tvorili oblasť póru, ktorým dochádza k prechodu iónov kanálom. Pokiaľ by sme toto obmedzenie nezavedli, tak by sme získali systém s celkovou veľkosťou ≈ 500000 atómov, čo bolo z hľadiska výpočtových nárokov neúnosné.

Helixy S5 a S6 sme vložili do fragmentu bunkovej membrány typu POPC o rozmeroch $95 \times 95 \text{ \AA}^2$ a následne solvatovali vrstvou vody o hrúbke 6 \AA (na oboch stranách membrány). Po ekvilibračných behoch sme ale zistili, že táto hrúbka nie je dostatočná a dochádza k vzájomnému ovplyvňovaniu sa periodických obrazov a narúšaniu profilu voľnej energie prechodu Ca^{2+} systémom. Vzhľadom k tomu, sme sa rozhodli zostaviť nový systém s vrstvou vody o hrúbke 9 \AA pre zatvorenú konformáciu (s PDB kódom 6DRK) a 13 \AA pre otvorenú (s PDB kódom 6DRJ).

Dôvodom tejto voľby bolo pozorovanie, že v prípade otvorenej konformácie je vzájomné ovplyvňovanie sa periodických kópií výraznejšie. Zároveň sme chceli dosiahnuť, aby otvorenej a zatvorenej konformácií odpovedal približne rovnaký počet molekúl vody a teda aj rovnaká výpočtová náročnosť. Výsledky, ktoré sme získali z prvotného usporiadania, kvôli ich technickým problémom a kvôli ich nízkej kvalite, z dôvodu vysokých simulačných rýchlostí (15 \AA ns^{-1}), neuvádzame.

Vzhľadom na nízku kvalitu výsledkov získaných v prvotných simuláciách sme tieto simulácie realizovali na 15 intervaloch o veľkosti 5 \AA . Na jeden interval sme vyhradili simulačný čas o veľkosti $t = 15 \text{ ns}$.

Potenciálom s hodnotou parametra tuhosti $k = 20.0 \text{ kcal/mol/\AA}^2$ boli fixované aj C_α uhľíky α -helixov. Vzhľadom na vymazanie značnej časti kanála sme ale volili fixáciu v smere všetkých súradnicových osí, aby nedošlo k rozpadnutiu pozorovaného usporiadania. Respektíve, aby nedošlo k zaujatiu biologicky neexistujúcej konformácie, kedy by stačila len malá zmena polomeru kanála na značnú zmenu priebehu voľnej energie.

V oboch prípadoch sme systém neutralizovali pridaním siedmych atómov Ca^{2+} (okrem testovacieho vápnikového kationu).

V prípade zatvorenej konformácie bol celkový počet atómov 60745. Z toho 11652 častíc tvorili molekuly vody a 9052 atómov tvorilo tetramér póru TRPM2. Fragment bunkovej membrány bol tvorený 16729 atómami. Výsledná simulačná bunka mala rozmer $\{x, y, z\} = \{98.870, 95.747, 85.384\} \text{ \AA}$.

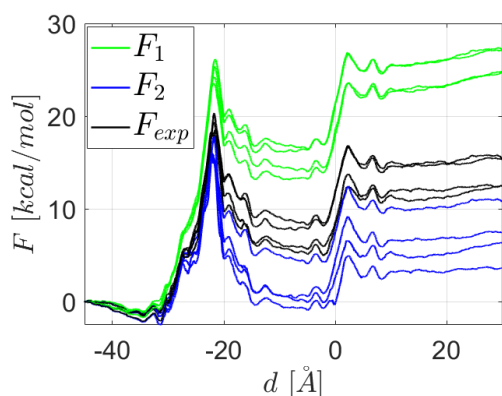
Otvorená konformácia mala celkovo 61265 atómov. Z toho 12138 molekúl tvoril solvent a 9052 atómov prislúchalo ku TRPM2 helixom. Fragment bunkovej membrány pozostával z 15791 atómov. Výsledná simulačná bunka mala rozmer $\{x, y, z\} = \{98.870, 95.747, 86.879\} \text{ \AA}$.

V oboch prípadoch sme simulované systémy minimalizovali v 2000 krokoch. Následne sme systém podrobili žíhaniu na $T = 300 \text{ K}$ a ekvilibračii po dobu 11 ns.

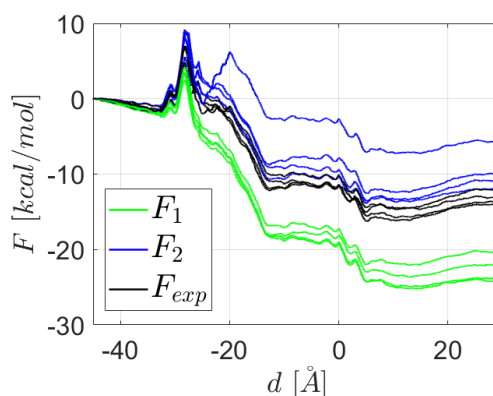
5.5.1 Dopredné a spätné simulácie

Výsledky, ktoré sme získali počas simulácií na 15 intervaloch s celkovým simulačným časom o hodnote $t = 225$ ns a dĺžkou trajektórie vo veľkosti $d = 75$ Å uvádzame v grafoch (5.66) až (5.69). Pre obe konformácie sme robili štyri série simulácií po $n = 10$ trajektórií.

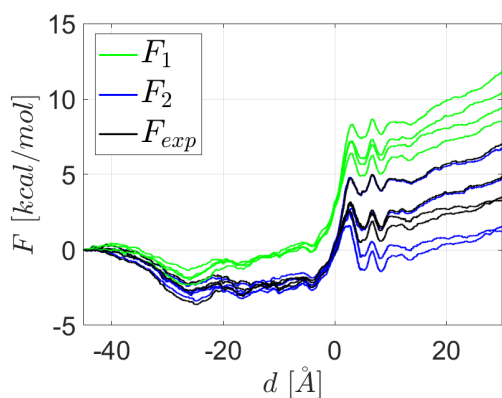
Rýchlosť, akou sme pohybovali iónom Ca^{2+} je pre tento systém ešte stále príliš vysoká, kvôli čomu sú priebehy jednotlivých simulačných protokolov značne nerovnovážne a teda z hľadiska určenia priebehu voľnej energie nemajú veľkú výpovednú hodnotu.



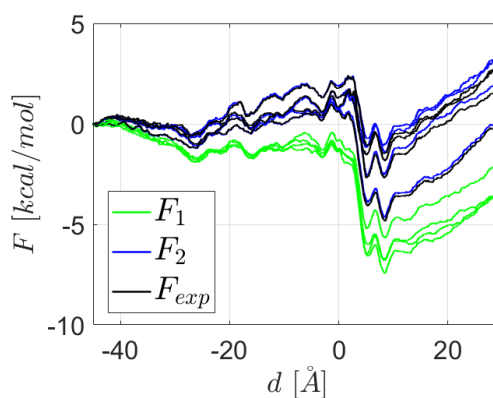
Obr. 5.66: Dopredné simulácie tranzitu Ca^{2+} uzavretým kanálom TRPM2



Obr. 5.67: Spätné simulácie tranzitu Ca^{2+} uzavretým kanálom TRPM2



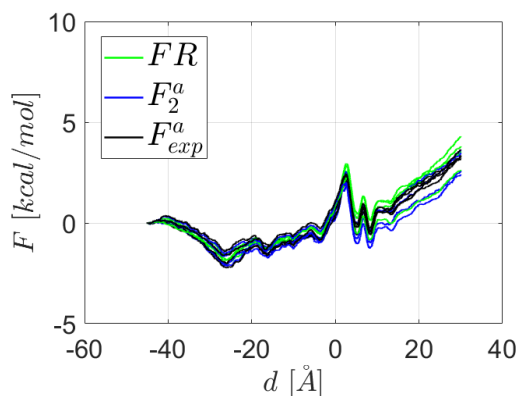
Obr. 5.68: Dopredné simulácie tranzitu Ca^{2+} otvoreným kanálom TRPM2



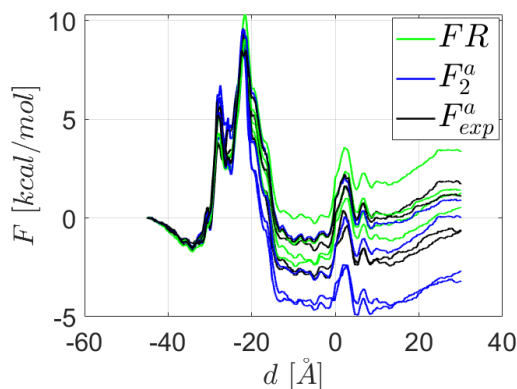
Obr. 5.69: Spätné simulácie tranzitu Ca^{2+} otvoreným kanálom TRPM2

5.5.2 FR metóda

Výrazne lepšie výsledky sme získali pomocou FR metódy, získané kombináciou dopredných a spätných behov, ktoré uvádzame na obrázkoch (5.72) a (5.73).



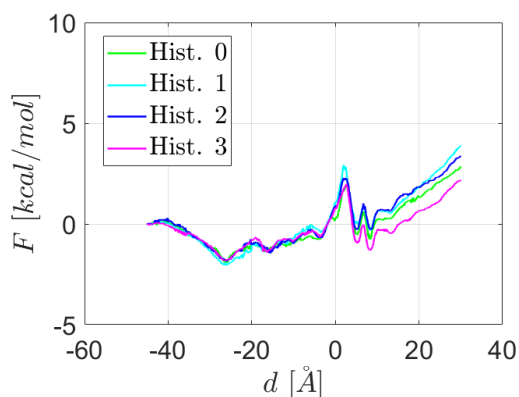
Obr. 5.70: FR metóda pre tranzit Ca^{2+} otvoreným kanálom TRPM2



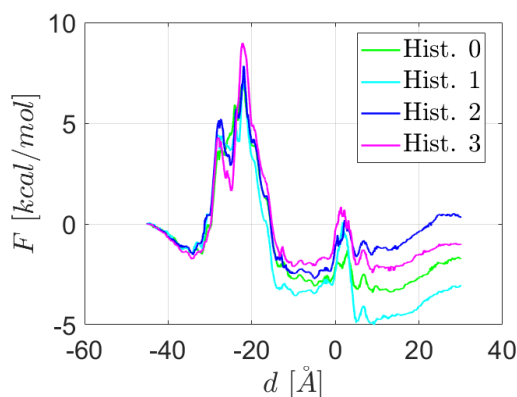
Obr. 5.71: FR metóda pre tranzit Ca^{2+} uzavretým kanálom TRPM2

5.5.3 Metóda prieniku histogramov

Tak, ako vo väčšine predchádzajúcich prípadov vidíme, že výsledky, ktoré sme získali metódou prieniku histogramov sú veľmi podobné výsledkom získaným FR metódou. Spomínané grafy môžeme vidieť na obrázkoch (5.72) a (5.73).



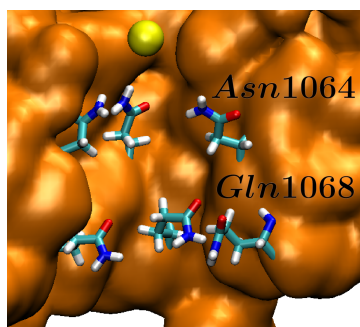
Obr. 5.72: Metóda prieniku histogramov pre tranzit Ca^{2+} otvoreným kanálom TRPM2



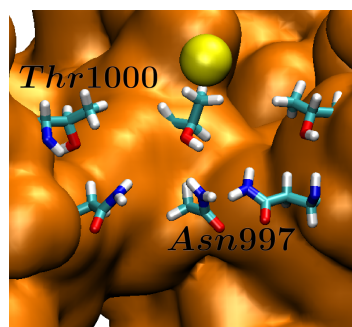
Obr. 5.73: Metóda prieniku histogramov pre tranzit Ca^{2+} uzavretým kanálom TRPM2

5.5.4 Vlastnosti získaných aproximácií

Pokiaľ porovnáme priebehy v prípade otvorenej konformácie s priebehmi získanými pre uzavretú konformáciu, tak vidíme výrazné rozdiely v energetike daného procesu. V prvom rade, prechod iónu oblasťou okolo hodnoty $d = -20 \text{ \AA}$ je pre otvorenú konfiguráciu bezproblémový, nepozorujeme žiadne výraznejšie zmeny priebehu ΔF . Dokonca pozorujeme jej jemný pokles (teda tento proces je ešte podporovaný). Na druhej strane, pre uzavretú konformáciu pozorujeme výrazné maximum ΔF o veľkosti $\approx 10 \text{ kcal/mol}$. Hlavné maximum je nasledované menším píkom, ktorý dosahuje hodnoty $\approx 6 \text{ kcal/mol}$. Tieto píky odpovedajú takzvanej spodnej bráne kanálu (ktorá je pre túto konformáciu uzavretá), skladajúcej sa z dvoch častí tvorených aminokyselinami asparagínu 1064 (hlavné maximum) a glutamínu 1068 (vedľajšie maximum). Znázornenie danej štruktúry, spolu so spomínanými aminokyselinami uvádzame na obrázku (5.74). Môžeme si všimnúť, že $-NH_2$ konce asparagínu a glutamínu sú orientované do stredu kanálu, v dôsledku čoho dochádza k pôsobeniu parciálneho $\delta+$ náboja vodíkov na vápnikový kation, následnému odpudzovaniu a pozorovanému zvýšeniu priebehu voľnej energie. Rozdielom oproti otvorenej konformácii je fakt, že po uzavretí dochádza k priblíženiu daných aminokyselín a v dôsledku elektrostatického odpudzovania k efektívnemu uzavretiu kanála.



Obr. 5.74: Vizualizácia spodnej brány uzavretého TRPM2 kanálu

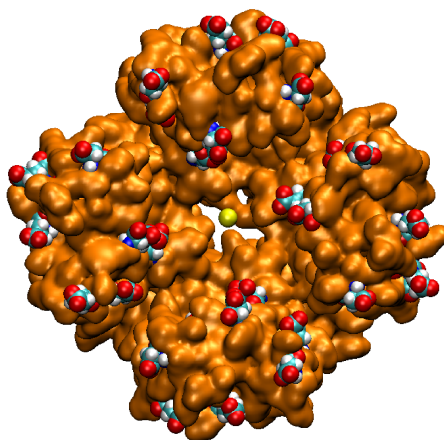


Obr. 5.75: Vizualizácia filtra selektivity otvoreného TRPM2 kanálu

V oblasti okolo hodnoty $d = 0 \text{ \AA}$ pozorujeme v prípade oboch konformácií nárast voľnej energie. Táto zmena je pre obe konformácie približne rovnaká a odpovedá prechodu iónu filtrom selektivity. Ten je zodpovedný za špecificitu kanálu (ako sme spomínali v kapitole (1.5)) a v tomto prípade ho charakterizuje aminokyselina asparagínu 997. Ako uvádzame na obrázku (5.75), $-NH_2$ konce asparagínu sú orientované do stredu kanálu, analogickým spôsobom, ako pre spodnú bránu. To znova vďaka elektrostatickému odpudzovaniu sa parciálneho $\delta+$ náboja vodíkov a vápnikového kationu vedie k pozorovanému zvýšeniu priebehu voľnej energie. Po-

čas prechodu z otvorenej do uzavretej konformácie nedochádza k výraznejšej zmene štruktúry filtra, čo vedie k zachovaniu spomínanej zmeny ΔF v oboch priebehoch. Menší pík, ktorý pozorujeme pred prechodom cez daný filter, je pravdepodobne zapríčinený prítomnosťou aminokyselín threonínu 1000, nachádzajúcich sa v tesnej blízkosti.

Okrem vyššie uvedených charakteristík pozorujeme v oblasti $d \approx 10 - 30 \text{ \AA}$ prudké zvýšenie hodnoty voľnej energie (hlavne v kontexte otvoreného kanála). Táto zmena je zapríčinená prítomnosťou veľkého množstva záporne nabitých asparágových a glutámových kyselín vo vonkajšej oblasti TRPM2. Spomínané aminokyseliny priťahujú testovací ión Ca^{2+} , čím spôsobujú pozorované zmeny vo voľnej energii. Ich pozície môžeme vidieť na obrázku (5.76).



Obr. 5.76: Vizualizácia extracelulárnej strany otvoreného TRPM2 spolu s aminokyselinami *Glu* a *Asp*

Ďalej v tejto oblasti pozorujeme zvýšenie rozptylu získaných závislostí. V prípade otvorenej konformácie k nemu došlo v dôsledku prítomnosti vápnikových iónov (nutných k neutralizácii systému) pred filtrom selektivity. Ich vzdialenosť od testovacieho katiónu bola len niekoľko \AA , čo viedlo k repulzii a ovplyvneniu charakteru jednotlivých trajektórií.

V kontexte zatvorenej konformácie sa zvýšenie rozptylu aproximácií ΔF prejavuje ešte pred prechodom cez filter selektivity. A to v podstate hneď po prechode spodnou bránou kanála (čo ale pri vyhodnotení metódou prieniku histogramov nie je tak výrazné). Okrem analogického vplyvu dodatočných vápnikových iónov pred filtrom selektivity sa v tomto prípade uplatňuje, že prechádzame Ca^{2+} iónom uzavretou spodnou bránou. Tento prechod je značne energeticky náročný, kedy aminokyseliny brány pôsobia na Ca^{2+} repulzívne. Vzhľadom na to, že ich postranné refazce nie sú rigidné má toto pôsobenie za následok zvýšenie rozptylu získaných trajektórií (ako vidíme na vyššie uvedených grafoch).

5.5.5 Zhrnutie a diskusia

Počas simulácií bola na pór iónového kanála aplikovaná fixácia C_α uhlíkov, aby nedošlo k rozpadnutiu danej štruktúry s obmedzeným počtom α -helixov. Z toho dôvodu sme (okrem fixácie Ca^{2+} v rovine xy) vnášali do systému dodatočnú rigiditu. Dá sa predpokladať, že jej vplyvom bude zvýšenie niektorých potenciálových bariér a to hlavne v prípade uzavretého kanálu pri prechode Ca^{2+} spodnou bránou.

Uvoľnenie spomínaných atómov by mohlo viesť k upraveniu konformácie α -helixov (konkrétne k oddialeniu postranných reťazcov asparagínu a glutamínu) počas prechodu Ca^{2+} , čím by sa znížila pozorovaná hodnota potenciálovej bariéry a zároveň by sa mohol zmenšiť aj rozptyl aproximácií ΔF .

Vďaka tomu sa naskytuje ďalšia možnosť štúdia tohto systému, kedy by sme buď rozšírili študovanú oblasť (čo by ale viedlo ku značnému zvýšeniu výpočtových nárokov), čím by sme potenciálne mohli zmenšiť mieru aplikovaných reštrikcií.

Alebo by sme mohli prejsť k fixácii len niektorých častí póru, ktoré nezohrávajú až tak významnú úlohu z hľadiska celkového priebehu ΔF , avšak by zabezpečili zachovanie globálnej štruktúry α -helixov.

Ďalšou možnosťou, ktorou by sme mohli dosiahnuť mierne zlepšenie pozorovaných výsledkov, by bola zmena solí, pomocou ktorých sme neutralizovali simulovaný systém. Konkrétne by sme namiesto Ca^{2+} mohli použiť sodíkové Na^+ katióny. Tie by potenciálne mohli zabezpečiť rovnomernejšie rozloženie náboja a zmenšiť mieru rozptylu získaných aproximácií ΔF .

Každopádne, realizované MD simulácie umožnili odlíšiť otvorený a uzavretý stav kanálu. Tento postup je teraz možné aplikovať na ďalšie TRP kanály, ktorých je celkovo približne tridsať. Ďalej je možné študovať vplyv bodových mutácií aminokyselín experimentálne skúmaných v FgU AVČR alebo vzniknutých v dôsledku takzvaných single-nukleotidových polymorfizmov v genómoch pacientov a identifikovaných vo FNHK. Okrem toho je možné študovať vplyv známych inhibítorov TRP kanálov a to či už na báze malých molekúl alebo najrôznejších toxínov, na priechod iónu kanálom. Pomocou softwarového balíka AutoGrow je potom možné takéto malé molekuly vygenerovať a ich väzbové schopnosti preveriť pomocou MD simulácií.

Záver

V predloženej diplomovej práci sme aplikovali nerovnovážne SMD simulácie a rôzne metódy pre určenie profilu voľnej energie na modelové, ako aj medicínsky zaujímavé systémy.

- Pomocou SMD simulácií sme určili profil voľnej energie počas foldingu, respektíve unfoldingu $(Ala)_{10}$ vo vákuu. Získané priebehy sme vyhodnotili pomocou Jarzynského identity a jej kumulantov, FR metódy a metódy prieniku histogramov. Okrem otestovania výhod a obmedzení uvádzaných metód sme testovali aj vplyv rozdelenia simulácií na podintervaly. Výsledky jednotlivých metód a prístupov sme porovnali navzájom, ako aj s výsledkami obdobných štúdií v literatúre [6, 8, 9, 12, 66, 78]. V prípade rýchlejších spätných simulácií sme sa stretli s výskytom dvoch rôznych mechanizmov zbalovania (okrem α -helixu aj do neusporiadanej, respektíve vlásenkovitej konfigurácie).
- Analogicky sme študovali folding a unfolding $(Ala)_{10}$ vo vodnej obálke. Pozorovali sme, že ani v jednej zo spätných simulácií nedochádzalo k zbaleniu sa do helikálnej konfigurácie. Pomocou extrémne dlhých (2000 ns) trajektórií sme získali referenčnú krivku profilu voľnej energie. Ukázali sme, že jej priebeh ide pomerne dobre aproximovať pomocou veľmi malého počtu (2×10) veľmi krátkych (2 ns) dopredných a spätných trajektórií, pokiaľ sú realizované na desiatich podintervaloch (teda ako $2 \times 10 \times 10$ behov o dĺžke 200 ps). Náš prístup je efektívnejší ako ASMD a FR-ASMD metódy prezentované v literatúre [7, 79].
- Pomocou metodiky otestovanej na modelovom systéme $(Ala)_{10}$ sme určili profil väzbovej voľnej energie ligandu pro komplex A_{2A} adenosínového GPC receptora s kofeínom (vo vodnom prostredí a po vložení do fragmentu bunkovej membrány). Otestovali sme vplyv rôznych simulačných podmienok na výsledný profil (fixácie či uvoľnenie kofeínu v rovine xy , zvýšenie miery fixácie A_{2A} adenosínového receptora, prítomnosť analógie solného mostíka *His264* a *Glu169*). Zistili sme, že aplikáciou metódy prieniku histogramov, respektíve FR metódy dostávame najkvalitnejšie výsledky. Zároveň sme videli, že v intervale od 2 ns do 150 ns sú zmeny vývoja daných aproximácií ΔF len minimálne. So znížením počtu stredovaných trajektórií bola hodnota rozptylu získaných vývojov ≈ 2 kcal/mol. To umožňuje využitie daného postupu pre rýchle určenie najperspektívnejších ligandov z nejakého väčšieho súboru (vygenerovaného napríklad pomocou softwarového balíka AutoGrow).
- Ďalej sme pomocou nerovnovážnych SMD simulácií študovali prechod iónu modelovým membránovým kanálom Gramicidínom A. Získané priebehy sme

znova vyhodnotili pomocou Jarzynského identity a jej kumulantov, FR metódy a metódy prieniku histogramov. Okrem otestovania vlastností uvádzaných metód sme znova testovali vplyv rozdelenia simulácií na podintervaly. Zaoberali sme sa ale aj vplyvom rôznych kompozícií membrány, prítomnosti iónov solí KCl a vplyvom úprav koncových aminokyselín monomérnych jednotiek Gramicidínu A na profil voľnej energie tranzitu testovacieho iónu K^+ . Zmena kompozície membrány sa žiadnym výraznejším spôsobom neprejavovala. Prítomnosť iónov solí KCl vnášala do systému artefakty, ktoré skresľovali získaný vývoj. Úprava koncových aminokyselín monomérnych jednotiek mala značný vplyv na získané bariéry v dôsledku elektrostatickej repulzie s K^+ a pravdepodobne vysvetľuje rozdiely vo výsledkoch prezentovaných v literatúre [6, 23, 91, 92].

- Nakoniec sme pomocou metodiky otestovanej na modelovom systéme Gramicidínu A určili profil voľnej energie tranzitu testovacieho iónu Ca^{2+} cez otvorený a uzavretý kanál TRPM2. Napriek vysokému simulačnému času ($t = 225$ ns) neboli výsledky z dopredných a spätných simulácií použiteľné samostatne. Najlepšie výsledky sme získali aplikáciou FR metódy, respektíve metódy prieniku histogramov. Charakterizovali sme pôvod pozorovaných energetických bariér (prechod filtrom selektivity a dolnou bránou). Daný postup využijeme pre interpretáciu vplyvu bodových mutácií aminokyselín (realizovaných *in vitro* vo FgU AVČR alebo identifikovaných, ako dôsledok polymorfizmov v genóme pacientov vo FNHK) na aktivitu rôznych TRP kanálov.

Zoznam použitej literatúry

- [1] B. Kobilka. The Structural Basis of G-Protein-Coupled Receptor Signaling (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie International Edition*, 52(25):6380–6388, 2013.
- [2] R. Lefkowitz. A Brief History of G-Protein Coupled Receptors (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 52, 06 2013.
- [3] M. de Lera Ruiz, Y. H. Lim, and J. Zheng. Adenosine A2A Receptor as a Drug Discovery Target. *Journal of Medicinal Chemistry*, 57(9):3623–3650, 2014. PMID: 24164628.
- [4] D. L. Nelson and M. M. Cox. *Lehninger Principles of Biochemistry*. Seventh edition edition, 2017.
- [5] S. Decherchi and A. Cavalli. Thermodynamics and Kinetics of Drug-Target Binding by Molecular Simulation. *Chemical Reviews*, 120(23):12788–12833, 2020. PMID: 33006893.
- [6] M. Forney, L. Janosi, and I. Kosztin. Calculating free-energy profiles in biomolecular systems from fast nonequilibrium processes. *Physical review. E, Statistical, nonlinear, and soft matter physics*, 78:051913, 12 2008.
- [7] G. Ozer, S. Quirk, and R. Hernandez. Thermodynamics of Decaalanine Stretching in Water Obtained by Adaptive Steered Molecular Dynamics Simulations. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 8(11):4837–4844, 2012. PMID: 26605636.
- [8] S. Park, F. Khalili-Araghi, E. Tajkhorshid, and K. Schulten. Free energy calculation from steered molecular dynamics simulations using Jarzynski's equality. *The Journal of Chemical Physics*, 119:3559–3566, 08 2003.
- [9] S. Park and K. Schulten. Calculating potentials of mean force from steered molecular dynamics simulations. *The Journal of Chemical Physics*, 120(13):5946–5961, 2004.
- [10] A. Hazel, Ch. Chipot, and J. C. Gumbart. Thermodynamics of Deca-alanine Folding in Water. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 10(7):2836–2844, 2014. PMID: 25061447.
- [11] F. Célerse, L. Lagardère, E. Derat, and J. P. Piquemal. Massively Parallel Implementation of Steered Molecular Dynamics in Tinker-HP: Comparisons of

- Polarizable and Non-Polarizable Simulations of Realistic Systems. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 15(6):3694–3709, 2019. PMID: 31059250.
- [12] P. Procacci and S. Marsili. Energy dissipation asymmetry in the non equilibrium folding/unfolding of the single molecule alanine decapeptide. *Chemical Physics*, 375:8–15, 09 2010.
- [13] A. S. Doré, N. Robertson, J. C. Errey, I. Ng, K. Hollenstein, B. Tehan, E. Hurrell, K. Bennett, M. Congreve, F. Magnani, Ch. G. Tate, M. Weir, and F. H. Marshall. Structure of the Adenosine A2A Receptor in Complex with ZM241385 and the Xanthines XAC and Caffeine. *Structure*, 19(9):1283–1293, 2011.
- [14] J. Garcia-Nafria, Y. Lee, X. Bai, B. Carpenter, and Ch. Tate. Cryo-EM structure of the adenosine A2A receptor coupled to an engineered heterotrimeric G protein. *eLife*, 7, 05 2018.
- [15] R. O. Dror, A. C. Pan, D. H. Arlow, D. W. Borhani, P. Maragakis, Y. Shan, H. Xu, and D. E. Shaw. Pathway and mechanism of drug binding to G-protein-coupled receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(32):13118–13123, 2011.
- [16] R. O. Dror, D. H. Arlow, P. Maragakis, T. J. Mildorf, A. C. Pan, H. Xu, D. W. Borhani, and D. E. Shaw. Activation mechanism of the β 2-adrenergic receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(46):18684–18689, 2011.
- [17] G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. https://de.wikipedia.org/wiki/G-Protein-gekoppelte_Rezeptoren, 4 2006.
- [18] B. A. Wallace. Structure of gramicidin A. *Biophysical journal*, 49:295 – 306, 01 1986.
- [19] D. J. Parry-Smith, A. W. Payne, A. D. Michie, and T. K. Attwood. CINEMA—a novel colour INteractive editor for multiple alignments. *Gene*, 221, 10 1998.
- [20] J. David and A. Rajasekaran. Gramicidin A: A New Mission for an Old Antibiotic. *Journal of Kidney Cancer and VHL*, 2:15, 01 2015.
- [21] J. A. Lundbæk, S. A. Collingwood, H. I. Ingólfsson, R. S. Y. Kapoor, and O. S. Andersen. Lipid bilayer regulation of membrane protein function: gramicidin channels as molecular force probes. *Journal of The Royal Society Interface*, 7:373 – 395, 2009.

- [22] A. Finkelstein and O. S. Andersen. The gramicidin A channel: a review of its permeability characteristics with special reference to the single-file aspect of transport. *The Journal of membrane biology*, 59:155–171, 04 1981.
- [23] T. Allen, O. Andersen, and B. Roux. Energetics of ion conduction through the gramicidin channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101:117–22, 02 2004.
- [24] Z. Zhong, Y. Zhai, S. Liang, Y. Mori, R. Han, F. Sutterwala, and L. Qiao. TRPM2 links oxidative stress to the NLRP3 inflammasome activation. *Nature communications*, 4:1611, 03 2013.
- [25] K. Togashi, Y. Hara, T. Tominaga, T. Higashi, Y. Konishi, Y. Mori, and M. Tominaga. TRPM2 activation by cyclic ADP-ribose at body temperature is involved in insulin secretion. *The EMBO Journal*, 25(9):1804–1815, 2006.
- [26] M. R. Bari, S. Akbar, M. Eweida, F. J. P. Kühn, A. J. Gustafsson, A. Lückhoff, and Md. S. Islam. H₂O₂-induced Ca²⁺ influx and its inhibition by N-(p-aminocinnamoyl) anthranilic acid in the β -cells: involvement of TRPM2 channels. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 13(9b):3260–3267, 2009.
- [27] P. Yu, X. Cai, Y. Liang, M. Wang, and W. Yang. Roles of NAD⁺ and Its Metabolites Regulated Calcium Channels in Cancer. *Molecules*, 25(20), 2020.
- [28] Ch. H. Tan and P. McNaughton. The TRPM2 ion channel is required for sensitivity to warmth. *Nature*, 536, 08 2016.
- [29] B. Miller. The Role of TRP Channels in Oxidative Stress-induced Cell Death. *J Membrane Biol*, 209:31–41, 2006.
- [30] M. Madej and Ch. Ziegler. Dawning of a new era in TRP channel structural biology by cryo-electron microscopy. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 470, 02 2018.
- [31] Y. Huang, P.A. Winkler, and W. et al. Sun. Architecture of the TRPM2 channel and its activation mechanism by ADP-ribose and calcium. *Nature*, 562:145–149, 2018.
- [32] A. L. Perraud, A. Fleig, Ch. Dunn, L. Bagley, P. Launay, C. Schmitz, A. Stokes, Z. QQ, M. Bessman, R. Penner, J. P. Kinet, and A. Scharenberg. ADP-ribose gating of the calcium-permeable LTRPC2 channel revealed by Nudix motif homology. *Nature*, 411:595–9, 06 2001.

- [33] A. L. Perraud, C. L. Takanishi, B. Shen, S. Kang, M. K. Smith, C. Schmitz, H. M. Knowles, D. Ferraris, W. Li, J. Zhang, B. L. Stoddard, and A. M. Scharenberg. Accumulation of Free ADP-ribose from Mitochondria Mediates Oxidative Stress-induced Gating of TRPM2 Cation Channels. *Journal of Biological Chemistry*, 280(7):6138–6148, 2005.
- [34] E. Wehage, J. Einfeld, I. Heiner, E. Jüngling, Ch. Zitt, and A. Lückhoff. Activation of the Cation Channel Long Transient Receptor Potential Channel 2 (LTRPC2) by Hydrogen Peroxide. *Journal of Biological Chemistry*, 277(26):23150–23156, 2002.
- [35] S. J. Marrink, V. Corradi, P. C. T. Souza, H. I. Ingólfsson, D. P. Tieleman, and M. S. P. Sansom. Computational Modeling of Realistic Cell Membranes. *Chemical Reviews*, 119(9):6184–6226, 2019. PMID: 30623647.
- [36] R. Phillips, T. Ursell, P. Wiggins, and P. Sens. Emerging roles for lipids in shaping membrane-protein function. *Nature*, 459:379–385, 05 2009.
- [37] J. V. Ribeiro, R. C. Bernardi, T. Rudack, J. E. Stone, J. C. Phillips, P. L. Freddolino, and K. J. Schulten. QwikMD - Integrative Molecular Dynamics Toolkit for Novices and Experts. *Scientific Reports*, 6, May 2016.
- [38] Membrane Lipids. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Membrane_Lipids.svg, 11 2017.
- [39] M. Mishkind. Phosphatidylethanolamine – in a pinch. *Trends in Cell Biology*, 10(9):368, 2000.
- [40] J. C. Phillips, R. Braun, W. Wang, J. Gumbart, E. Tajkhorshid, E. Villa, Ch. Chipot, R. D. Skeel, L. Kalé, and K. Schulten. Scalable molecular dynamics with NAMD. *Journal of Computational Chemistry*, 26(16):1781–1802, 2005.
- [41] I. Nezbeda, J. Kolafa, and M. Kotrla. *Úvod do počítačových simulací: metody Monte Carlo a molekulární dynamiky*. Karolinum, Praha, second edition edition, 2002.
- [42] K. Vanommeslaeghe and A.D. MacKerell. CHARMM additive and polarizable force fields for biophysics and computer-aided drug design. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1850(5):861–871, 2015. Recent developments of molecular dynamics.
- [43] H. A. Lorentz. Ueber die Anwendung des Satzes vom Virial in der kinetischen Theorie der Gase. *Annalen der Physik*, 248(1):127–136, 1881.

- [44] K. Vanommeslaeghe and A. MacKerell. Automation of the CHARMM general force field (CGenFF) I: Bond perception and atom typing. *Journal of chemical information and modeling*, 52, 11 2012.
- [45] K. Vanommeslaeghe, P. Raman, and A. MacKerell. Automation of the CHARMM General Force Field (CGenFF) II: Assignment of bonded parameters and partial atomic charges. *Journal of chemical information and modeling*, 52, 11 2012.
- [46] K. Vanommeslaeghe, E. Frush, Ch. Acharya, S. Kundu, S. Zhong, J. Shim, E. Darian, O. Guvench, P. Lopes, I. Vorobyov, and A. MacKerell. CHARMM General Force Field: A force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force field. *Journal of computational chemistry*, 31:671–90, 11 2009.
- [47] W. Yu, X. He, K. Vanommeslaeghe, and A. MacKerell. Extension of the CHARMM General Force Field to Sulfonyl-Containing Compounds and Its Utility in Biomolecular Simulations. *Journal of computational chemistry*, 33:2451–68, 12 2012.
- [48] L. Skála. *Kvantová teorie molekul*. Karolinum, Praha, 1. vydanie edition, 1995.
- [49] CGenFF. <https://cgenff.umaryland.edu>, 8 2018.
- [50] Ch. Mayne, J. Saam, K. Schulten, E. Tajkhorshid, and J. Gumbart. Rapid Parameterization of Small Molecules Using the Force Field Toolkit. *Journal of computational chemistry*, 34:14, 12 2013.
- [51] J. C. Phillips, D. J. Hardy, J. D. C. Maia, J. E. Stone, J. V. Ribeiro, R. C. Bernardi, R. Buch, G. Fiorin, J. Henin, W. Jiang, R. McGreevy, M. C. R. Melo, B. K. Radak, R. D. Skeel, A. Singharoy, Y. Wang, B. Roux, A. Aksimentiev, Z. Luthey-Schulten, L. V. Kale, K. Schulten, Ch. Chipot, and E. Tajkhorshid. Scalable molecular dynamics on CPU and GPU architectures with NAMD. *Journal of Chemical Physics*, 153:044130, 2020.
- [52] D. Quigley and M. Probert. Langevin Dynamics in Constant Pressure Extended Systems. *The Journal of chemical physics*, 120:11432–41, 07 2004.
- [53] D. S. Lemons and A. Gythiel. Paul Langevin’s 1908 paper “On the Theory of Brownian Motion” [“Sur la théorie du mouvement brownien,” C. R. Acad. Sci. (Paris) 146, 530–533 (1908)]. *American Journal of Physics*, 65(11):1079–1081, 1997.

- [54] R. Zwanzig. *Nonequilibrium Statistical Mechanics*. Oxford University Press, Inc., 198 Madison Avenue, New York, 2001.
- [55] A. Brünger, Ch. L. Brooks, and M. Karplus. Stochastic boundary conditions for molecular dynamics simulations of ST2 water. *Chemical Physics Letters*, 105(5):495–500, 1984.
- [56] G. J. Martyna, D. J. Tobias, and M. L. Klein. Constant pressure molecular dynamics algorithms. *The Journal of Chemical Physics*, 101(5):4177–4189, 1994.
- [57] S. E. Feller, Y. Zhang, R. W. Pastor, and B. R. Brooks. Constant pressure molecular dynamics simulation: The Langevin piston method. *The Journal of Chemical Physics*, 103(11):4613–4621, 1995.
- [58] D. Quigley and M. I. J. Probert. Langevin dynamics in constant pressure extended systems. *The Journal of Chemical Physics*, 120(24):11432–11441, 2004.
- [59] D. Frenkel and B. Smit. *Understanding Molecular Simulation*. Academic Press, Inc., USA, 2nd edition, 2001.
- [60] M. Balsera, S. Stepaniants, S. Izrailev, Y. Oono, and K. Schulten. Reconstructing potential energy functions from simulated force-induced unbinding processes. *Biophysical journal*, 73:1281–7, 10 1997.
- [61] P. Procacci, S. Marsili, A. Barducci, G. F. Signorini, and R. Chelli. Crooks equation for steered molecular dynamics using a Nosé-Hoover thermostat. *The Journal of Chemical Physics*, 125(16):164101, 2006.
- [62] C. Jarzynski. Nonequilibrium Equality for Free Energy Differences. *Phys. Rev. Lett.*, 78:2690–2693, Apr 1997.
- [63] C. Jarzynski. Equilibrium free-energy differences from nonequilibrium measurements: A master-equation approach. *Phys. Rev. E*, 56:5018–5035, Nov 1997.
- [64] D. Hendrix and C. Jarzynski. A "fast growth" method of computing free energy differences. *J Chem Phys*, 114, 01 2001.
- [65] R. W. Zwanzig. High-Temperature Equation of State by a Perturbation Method. I. Nonpolar Gases. *The Journal of Chemical Physics*, 22(8):1420–1426, 1954.

- [66] I. Kosztin, B. Barz, and L. Janosi. Calculating potentials of mean force and diffusion coefficients from nonequilibrium processes without Jarzynski’s equality. *The Journal of Chemical Physics*, 124(6):064106, 2006.
- [67] G. Hummer. Fast-growth thermodynamic integration: Error and efficiency analysis. *The Journal of Chemical Physics*, 114(17):7330–7337, 2001.
- [68] J. Hermans. Simple analysis of noise and hysteresis in (slow-growth) free energy simulations. *The Journal of Physical Chemistry*, 95(23):9029–9032, 1991.
- [69] J. Marcinkiewicz. On a Property of the Gauss law. *Math. Z.*, 44:612–618, 1939.
- [70] M. Ø. Jensen, S. Park, E. Tajkhorshid, and K. Schulten. Energetics of glycerol conduction through aquaglyceroporin GlpF. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(10):6731–6736, 2002.
- [71] Ch. Chipot and A. Pohorille. *Free Energy Calculations: Theory and Applications in Chemistry and Biology*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 2007.
- [72] G. E. Crooks. Path-ensemble averages in systems driven far from equilibrium. *Phys. Rev. E*, 61:2361–2366, Mar 2000.
- [73] D. Collin, F. Ritort, C. Jarzynski, S. Smith, I. Tinôco, and C. Bustamante. Verification of the Crooks fluctuation theorem and recovery of RNA folding free energies. *Nature*, 437:231–4, 10 2005.
- [74] W. Humphrey, A. Dalke, and K. Schulten. VMD – Visual Molecular Dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, 14:33–38, 1996.
- [75] J. Eargle, D. Wright, and Z. Luthey-Schulten. Multiple Alignment of protein structures and sequences for VMD. *Bioinformatics*, 22(4):504–506, Feb 2006.
- [76] MATLAB. *9.9.0.1592791 (R2020b)*. The MathWorks Inc., Natick, Massachusetts, Feb 2021.
- [77] G. van Rossum. Python tutorial. Technical Report CS-R9526, Centrum voor Wiskunde en Informatica (CWI), Amsterdam, May 1995.
- [78] P. Procacci. Unbiased free energy estimates in fast nonequilibrium transformations using Gaussian mixtures. *The Journal of Chemical Physics*, 142(15):154117, 2015.

- [79] H. R. Bureau, D. R. Merz, Jr., E. Hershkovits, S. Quirk, and R. Hernandez. Constrained Unfolding of a Helical Peptide: Implicit versus Explicit Solvents. *PLOS ONE*, 10(5):1–19, 05 2015.
- [80] W. L. Jorgensen. Pulled from a protein’s embrace. *Nature*, 466(26):42–43, 2010.
- [81] V. Limongelli, M. Bonomi, and M. Parrinello. Funnel metadynamics as accurate binding free-energy method. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110, 04 2013.
- [82] E. B. Lenselink, J. Louvel, A. F. Forti, J. P. D. van Veldhoven, H. de Vries, T. Mulder-Krieger, F. M. McRobb, A. Negri, J. Goose, R. Abel, H. W. T. van Vlijmen, L. Wang, E. Harder, W. Sherman, A. P. IJzerman, and T. Beuming. Predicting Binding Affinities for GPCR Ligands Using Free-Energy Perturbation. *ACS Omega*, 1(2):293–304, 2016. PMID: 30023478.
- [83] R. K. Y. Cheng, E. Segala, N. Robertson, F. Defflorian, A. S. Doré, J. C. Errey, C. Fiez-Vandal, F. H. Marshall, and R. M. Cooke. Structures of Human A1 and A2A Adenosine Receptors with Xanthines Reveal Determinants of Selectivity. *Structure*, 25(8):1275–1285.e4, 2017.
- [84] A. C. Pan, H. Xu, T. Palpant, and D. E. Shaw. Quantitative Characterization of the Binding and Unbinding of Millimolar Drug Fragments with Molecular Dynamics Simulations. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 13(7):3372–3377, 2017. PMID: 28582625.
- [85] P. Cieplak and P. Kollman. On the use of electrostatic potential derived charges in molecular mechanics force fields. the relative solvation free energy of em Cis/- and em Trans/-em N/-methyl-acetamide. *Comp. Chem.*, 12:1232–1236, 04 2022.
- [86] J. A. Lemkul, J. Huang, B. Roux, and A. D. MacKerell. An Empirical Polarizable Force Field Based on the Classical Drude Oscillator Model: Development History and Recent Applications. *Chemical Reviews*, 116(9):4983–5013, 2016. PMID: 26815602.
- [87] J. Ponder, Ch. Wu, P. Ren, V. Pande, J. Chodera, M. Schnieders, I. Haque, D. Mobley, D. Lambrecht, R. Distasio, M. Head-Gordon, G. Clark, M. Johnson, and T. Head-Gordon. Current status of the AMOEBA polarizable force field. *The journal of physical chemistry. B*, 114:2549–64, 02 2010.

- [88] P. Dauber-Osguthorpe and A. Hagler. Biomolecular force fields: where have we been, where are we now, where do we need to go and how do we get there? *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 33:133–203, 02 2019.
- [89] A. T. Hagler. Force field development phase II: Relaxation of physics-based criteria... or inclusion of more rigorous physics into the representation of molecular energetics. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 33:205–264, 2019.
- [90] D. H. Mackay, P. H. Berens, K. R. Wilson, and A. T. Hagler. Structure and dynamics of ion transport through gramicidin A. *Biophysical journal*, 46:229–248, 08 1984.
- [91] G. De Fabritiis, P. V. Coveney, and J. Villà-Freixa. Energetics of K⁺ permeability through Gramicidin A by forward-reverse steered molecular dynamics. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 73(1):185–194, 2008.
- [92] T. Giorgino and G. De Fabritiis. A High-Throughput Steered Molecular Dynamics Study on the Free Energy Profile of Ion Permeation through Gramicidin A. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 7(6):1943–1950, 2011. PMID: 26596455.
- [93] A. Yu. Ivanov, Yu. V. Rubin, S. A. Egupov, L. F. Belous, and V. A. Karachevtsev. The conformational structure of adenosine molecules, isolated in low-temperature Ar matrices. *Low Temperature Physics*, 41(11):936–941, 2015.
- [94] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, Ö. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, and D. J. Fox. Gaussian-09 Revision E.01. Gaussian Inc. Wallingford CT 2009.

Zoznam obrázkov

| | | |
|------|---|----|
| 1.1 | Štruktúra Deca-Alanínu | 6 |
| 1.2 | Štruktúra A_{2A} adenosínového receptora (6GDG) | 7 |
| 1.3 | Aktívny vs. neaktívny stav A_{2A} adenosínového receptora | 8 |
| 1.4 | Mechanizmus signalizácie GPC receptorom [17] | 9 |
| 1.5 | Konformačne významné oblasti A_{2A} adenosínového receptora | 10 |
| 1.6 | Zmena konformácie väzbového miesta ligandu (<i>Cys185</i>) | 11 |
| 1.7 | Zmena konformácie spojovacej oblasti (<i>Phe242</i> a <i>Ile92</i>) | 11 |
| 1.8 | Zmena konformácie väzbového miesta G-proteínu (<i>Tyr197</i> a <i>Tyr288</i>) | 12 |
| 1.9 | Štruktúra Gramicidínu A | 12 |
| 1.10 | Reprezentácia TRPM2 iónového kanálu (6DRJ) | 13 |
| 1.11 | Ilustračný obrázok komplexného modelu bunkovej membrány [35] | 15 |
| 1.12 | Fosfatidyletanolamín (POPE) [38] | 15 |
| 1.13 | Fosfatidylcholín (POPC) [38] | 15 |
| 2.1 | Intramolekulárne príspevky potenciálu U_{total} | 20 |
| 2.2 | Riadená molekulárna dynamika pre $\mathbf{v}(t) = \mathbf{v}$ | 27 |
| 2.3 | Charakter $\mathcal{P}(\mathcal{W})$ voči rôznym hodnotám τ | 30 |
| 2.4 | Porovnanie Jarzynského identity a jej kumulantov | 32 |
| 2.5 | Znázornenie distribúcií $\mathcal{P}_{F/R}(\pm\mathcal{W})$ | 34 |
| 2.6 | Aplikácia metódy prieniku histogramov | 39 |
| 2.7 | Porovnanie FR metódy a metódy prieniku histogramov | 41 |
| 2.8 | Delenie simulácií na intervaly [7] | 42 |
| 5.1 | Helikálna (vľavo) a rozvinutá (vpravo) konfigurácia $(Ala)_{10}$ | 45 |
| 5.2 | Vývoj počas dopredných 20 ps simulácií | 47 |
| 5.3 | Vývoj počas dopredných 200 ps simulácií | 47 |
| 5.4 | Vývoj počas dopredných 2 ns simulácií | 47 |
| 5.5 | Vývoj počas dopredných 20 ns simulácií | 47 |
| 5.6 | Vývoj počas dopredných 200 ns simulácií | 47 |
| 5.7 | Aproximácie vývoja ΔF dopredných simulácií $(Ala)_{10}$ vo vákuu | 49 |
| 5.8 | Odchýlky dopredných sim. od ΔF vo vákuu pre rôzne t | 50 |
| 5.9 | Aproximácie vývoja ΔF spätných simulácií $(Ala)_{10}$ vo vákuu | 51 |
| 5.10 | Odchýlky spätných sim. od ΔF vo vákuu pre rôzne t | 53 |
| 5.11 | Aproximácie vývoja ΔF pre $(Ala)_{10}$ vo vákuu pomocou FR metódy | 54 |
| 5.12 | Odchýlky FR metódy od ΔF vo vákuu pre rôzne t | 55 |
| 5.13 | Histogramy použité v metóde prieniku histogramov pre $(Ala)_{10}$ vo vákuu | 56 |

| | | |
|------|---|----|
| 5.14 | Aproximácie vývoja ΔF pre $(Ala)_{10}$ vo vákuu pomocou prieniku histogramov | 58 |
| 5.15 | Východzie konfigurácie $(Ala)_{10}$ v priebehu intervalových simulácií (vákuum) | 59 |
| 5.16 | Aproximácie ΔF pre $t = 200$ ps, $n = 10$ a 10 intervalov vo vákuu . . | 60 |
| 5.17 | Posledný snímok SMD simulácie $(Ala)_{10}$ v malej simulačnej bunke . | 62 |
| 5.18 | Vývoj počas dopredných 20 ps simulácií | 64 |
| 5.19 | Vývoj počas dopredných 200 ps simulácií | 64 |
| 5.20 | Vývoj počas dopredných 2 ns simulácií | 64 |
| 5.21 | Vývoj počas dopredných 20 ns simulácií | 64 |
| 5.22 | Vývoj počas dopredných 200 ns simulácií | 64 |
| 5.23 | Vývoj počas dopredných 2 μ s simulácií | 64 |
| 5.24 | Aproximácie vývoja ΔF dopredných simulácií $(Ala)_{10}$ vo vodnej obálke | 65 |
| 5.25 | Aproximácie ΔF pre dopredné sim. a $t = 200$ ps, $n = 1000$ | 66 |
| 5.26 | Aproximácie ΔF pre dopredné sim. a $t = 2$ ns, $n = 100$ | 66 |
| 5.27 | Aproximácie ΔF pre dopredné sim. a $t = 20$ ns, $n = 10$ | 66 |
| 5.28 | Aproximácie ΔF pre dopredné sim. a $t = 200$ ns, $n = 10$ | 66 |
| 5.29 | Odchýlky dopredných sim. od ΔF vo vodnej obálke pre rôzne t . . . | 67 |
| 5.30 | Vývoj aproximácií ΔF spätných simulácií pre $t = 200$ ps a $n = 1000$ | 69 |
| 5.31 | Vývoj aproximácií ΔF spätných simulácií pre $t = 2$ ns a $n = 100$. . | 69 |
| 5.32 | Vývoj aproximácií ΔF spätných simulácií pre $t = 20$ ns a $n = 10$. . | 69 |
| 5.33 | Vývoj aproximácií ΔF spätných simulácií pre $t = 200$ ns a $n = 10$. | 69 |
| 5.34 | FR metóda pre $t = 200$ ps a $n = 1000$ | 70 |
| 5.35 | FR metóda pre $t = 2$ ns a $n = 100$ | 70 |
| 5.36 | FR metóda pre $t = 20$ ns a $n = 10$ | 70 |
| 5.37 | FR metóda pre $t = 200$ ns a $n = 10$ | 70 |
| 5.38 | Metóda prieniku histogramov pre $t = 200$ ps a $n = 1000$ | 72 |
| 5.39 | Metóda prieniku histogramov pre $t = 2$ ns a $n = 100$ | 72 |
| 5.40 | Metóda prieniku histogramov pre $t = 20$ ns a $n = 10$ | 72 |
| 5.41 | Metóda prieniku histogramov pre $t = 200$ ns a $n = 10$ | 72 |
| 5.42 | Východzie konfigurácie $(Ala)_{10}$ v priebehu intervalových simulácií (voda) | 73 |
| 5.43 | Aproximácie ΔF pre $t = 2$ ns, $n = 100$ a 10 intervalov vo vodnej obálke | 74 |
| 5.44 | Aproximácie ΔF pre $t = 2$ ns, $n = 10$ a 10 intervalov vo vodnej obálke | 75 |
| 5.45 | Systém A_{2A} receptoru v komplexe s kofeínom | 78 |
| 5.46 | Východzie polohy kofeínu v komplexe s A_{2A} receptorom | 78 |
| 5.47 | Dopredné (prvý riadok) a spätné (druhý riadok) simulácie A_{2A} receptoru v komplexe s kofeínom | 80 |

| | | |
|------|--|-----|
| 5.48 | FR metóda a prienik histogramov pre $t = 150$ ns a $n = 100$ | 81 |
| 5.49 | Simulácie A_{2A} receptoru na 10 intervaloch pre $n = 100$ | 83 |
| 5.50 | Simulácie A_{2A} receptoru na 10 intervaloch pre $n = 10$ | 84 |
| 5.51 | A_{2A} receptor a vyhodnocovanie metódou prieniku histogramov ($n = 100$) | 85 |
| 5.52 | Aproximácia ΔF pre $t = 2$ ns, $n = 100$ a $d_{max} = 21$ Å | 86 |
| 5.53 | Rotácia A_{2A} receptoru počas ekvilibračíí | 87 |
| 5.54 | Aproximácia ΔF pre $t = 2$ ns, $n = 100$ a $k_{xy} = 0.0$ kcal/mol/Å ² | 88 |
| 5.55 | Interakcia reziduí <i>His264</i> a <i>Glu169</i> | 89 |
| 5.56 | Vizualizácia jedného zo simulačných prostredí Gramicidínu A | 93 |
| 5.57 | Aproximácia ΔF pre $t = 2$ ns, $n = 10$ a $S_{mem} = 50 \times 50$ Å ² | 96 |
| 5.58 | Aproximácia ΔF pre $t = 2$ ns, $n = 10$ a $S_{mem} = 72 \times 72$ Å ² (plná fixácia K^+) | 98 |
| 5.59 | Aproximácia ΔF pre $t = 2$ ns, $n = 10$ a $S_{mem} = 72 \times 72$ Å ² (fixácia v smere osi z) | 99 |
| 5.60 | Priebehy F_1 a F_{exp} pre $t = 2$ ns a $n = 10$ | 100 |
| 5.61 | Metóda prieniku histogramov pre $t = 2$ ns a $n = 10$ | 100 |
| 5.62 | Priebehy F_1 , F_2 a F_{exp} pre $t = 150$ ns a $n = 10$ | 101 |
| 5.63 | Metóda prieniku histogramov pre $t = 150$ ns a $n = 10$ | 101 |
| 5.64 | Vývoj \mathcal{W} prechodu K^+ gramicidínom pre $t = 500$ ns | 102 |
| 5.65 | Východzie konfigurácie Ca^{2+} intervalových simulácií kanálu TRPM2 | 105 |
| 5.66 | Dopredné simulácie tranzitu Ca^{2+} uzavretým kanálom TRPM2 | 107 |
| 5.67 | Spätne simulácie tranzitu Ca^{2+} uzavretým kanálom TRPM2 | 107 |
| 5.68 | Dopredné simulácie tranzitu Ca^{2+} otvoreným kanálom TRPM2 | 107 |
| 5.69 | Spätne simulácie tranzitu Ca^{2+} otvoreným kanálom TRPM2 | 107 |
| 5.70 | FR metóda pre tranzit Ca^{2+} otvoreným kanálom TRPM2 | 108 |
| 5.71 | FR metóda pre tranzit Ca^{2+} uzavretým kanálom TRPM2 | 108 |
| 5.72 | Metóda prieniku histogramov pre tranzit Ca^{2+} otvoreným kanálom TRPM2 | 108 |
| 5.73 | Metóda prieniku histogramov pre tranzit Ca^{2+} uzavretým kanálom TRPM2 | 108 |
| 5.74 | Vizualizácia spodnej brány uzavretého TRPM2 kanálu | 109 |
| 5.75 | Vizualizácia filtra selektivity otvoreného TRPM2 kanálu | 109 |
| 5.76 | Vizualizácia extracelulárnej strany otvoreného TRPM2 spolu s aminokyselinami <i>Glu</i> a <i>Asp</i> | 110 |
| A.1 | Anti-konformácia adenozínu | 135 |
| A.2 | Sym-konformácia adenozínu | 135 |
| A.3 | Vodíková väzba od $OH2'$ ku $OH3'$ | 136 |
| A.4 | Konformácia bez vodíkovej väzby | 136 |

| | | |
|------|---|-----|
| A.5 | Vodíková väzba od $OH3'$ ku $OH2'$ | 136 |
| A.6 | Optimalizovaná štruktúra ADN | 137 |
| A.7 | Porovnanie počiatocnej (tyrkysová farba) a optimalizovanej štruktúry (podľa prvkov) | 138 |
| A.8 | Zobrazenie finálnych polôh molekúl vody | 138 |
| A.9 | Počiatočná konfigurácia H_2O voči kyslíku $O31$ | 139 |
| A.10 | Finálna konfigurácia H_2O voči kyslíku $O31$ | 139 |
| A.11 | Poloha H_2O voči kyslíku $O31$ po korekcií | 139 |
| A.12 | Parciálne náboje ADN na základe CGenFF | 141 |
| A.13 | Parciálne náboje ADN určené pomocou CHELPG | 141 |
| A.14 | Elektrostatický potenciál molekuly ADN | 141 |
| A.15 | Rez elektrostatickým potenciálom ADN | 141 |
| A.16 | Sken dihedrálneho uhla aromatického jadra v rozsahu 180° | 145 |
| A.17 | Štruktúra na konci skenu dihedrálu v aromatickom jadre | 145 |
| A.18 | Sken dihedrálu $C16 - C2 - N8 - C7$ | 146 |
| A.19 | Vodíková väzba počas skenu $C16 - C2 - N8 - C7$ | 146 |
| A.20 | Sken dihedrálneho uhla $C19 - C22 - O31 - H32$ | 147 |
| A.21 | Sken dihedrálneho uhla $C2 - C16 - O20 - H24$ | 147 |
| A.22 | Sken dihedrálneho uhla $C17 - C19 - C22 - O31$ | 147 |
| A.23 | Sken dihedrálneho uhla $C7 - N9 - C11 - N1$ | 147 |
| B.1 | Korekčné členy ΔF_{corr} stiff-spring aproximácie | 151 |
| B.2 | Vývoj $\langle \mathcal{W} \rangle_F$ spolu s korekciami stiff-spring aprox. | 151 |
| E.1 | Porovnanie vývoja ΔF pre rôzne simulačné bunky | 155 |
| E.2 | Vývoj aproximácií ΔF pre $t = 20$ ps a $n = 10$ | 156 |
| E.3 | Vývoj aproximácií ΔF pre $t = 20$ ps a $n = 100$ | 156 |
| E.4 | Vývoj aproximácií ΔF pre $t = 20$ ps a $n = 1000$ | 156 |
| E.5 | Vývoj aproximácií ΔF pre $t = 20$ ps a $n = 10000$ | 156 |
| E.6 | Vývoj aproximácií ΔF pre $t = 200$ ps a $n = 10$ | 157 |
| E.7 | Vývoj aproximácií ΔF pre $t = 200$ ps a $n = 100$ | 157 |
| E.8 | Vývoj aproximácií ΔF pre $t = 200$ ps a $n = 1000$ | 157 |
| E.9 | Vývoj aproximácií ΔF pre $t = 2$ ns a $n = 10$ | 157 |
| E.10 | Vývoj aproximácií ΔF pre $t = 2$ ns a $n = 100$ | 157 |
| E.11 | Vývoj aproximácií ΔF pre $t = 20$ ns a $n = 10$ | 157 |
| E.12 | Vývoj počas 20 ps simulácií | 158 |
| E.13 | Vývoj aproximácií ΔF pre $t = 20$ ps a $n = 10$ | 158 |
| E.14 | Vývoj aproximácií ΔF pre $t = 20$ ps a $n = 100$ | 158 |
| E.15 | Vývoj aproximácií ΔF pre $t = 20$ ps a $n = 1000$ | 158 |
| E.16 | Vývoj aproximácií ΔF pre $t = 20$ ps a $n = 10000$ | 159 |
| E.17 | Vývoj počas 200 ps simulácií | 159 |

| | | |
|------|--|-----|
| E.18 | Vývoj aproximácií ΔF pre $t = 200$ ps a $n = 10$ | 159 |
| E.19 | Vývoj aproximácií ΔF pre $t = 200$ ps a $n = 100$ | 159 |
| E.20 | Vývoj aproximácií ΔF pre $t = 200$ ps a $n = 1000$ | 159 |
| E.21 | Vývoj počas 2 ns simulácií | 159 |
| E.22 | Vývoj aproximácií ΔF pre $t = 2$ ns a $n = 10$ | 160 |
| E.23 | Vývoj aproximácií ΔF pre $t = 2$ ns a $n = 100$ | 160 |
| E.24 | Vývoj počas 20 ns simulácií | 160 |
| E.25 | Vývoj aproximácií ΔF pre $t = 20$ ns a $n = 10$ | 160 |
| E.26 | Vývoj počas 20 ps simulácií | 161 |
| E.27 | Vývoj aproximácií ΔF pre $t = 20$ ps a $n = 10$ | 161 |
| E.28 | Vývoj aproximácií ΔF pre $t = 20$ ps a $n = 100$ | 161 |
| E.29 | Vývoj aproximácií ΔF pre $t = 20$ ps a $n = 1000$ | 161 |
| E.30 | Vývoj aproximácií ΔF pre $t = 20$ ps a $n = 10000$ | 162 |
| E.31 | Vývoj počas 200 ps simulácií | 162 |
| E.32 | Vývoj aproximácií ΔF pre $t = 200$ ps a $n = 10$ | 162 |
| E.33 | Vývoj aproximácií ΔF pre $t = 200$ ps a $n = 100$ | 162 |
| E.34 | Vývoj aproximácií ΔF pre $t = 200$ ps a $n = 1000$ | 162 |
| E.35 | Vývoj počas 2 ns simulácií | 162 |
| E.36 | Vývoj aproximácií ΔF pre $t = 2$ ns a $n = 10$ | 163 |
| E.37 | Vývoj aproximácií ΔF pre $t = 2$ ns a $n = 100$ | 163 |
| E.38 | Vývoj počas 20 ns simulácií | 163 |
| E.39 | Vývoj aproximácií ΔF pre $t = 20$ ns a $n = 10$ | 163 |
| E.40 | Porovnanie simulácií pre rôzne časy s F_{exact} | 163 |
| E.41 | Vývoj aproximácií ΔF pre $t = 20$ ps a $n = 10$ | 164 |
| E.42 | Vývoj aproximácií ΔF pre $t = 20$ ps a $n = 100$ | 164 |
| E.43 | Vývoj aproximácií ΔF pre $t = 20$ ps a $n = 1000$ | 164 |
| E.44 | Vývoj aproximácií ΔF pre $t = 20$ ps a $n = 10000$ | 164 |
| E.45 | Vývoj aproximácií ΔF pre $t = 200$ ps a $n = 10$ | 165 |
| E.46 | Vývoj aproximácií ΔF pre $t = 200$ ps a $n = 100$ | 165 |
| E.47 | Vývoj aproximácií ΔF pre $t = 200$ ps a $n = 1000$ | 165 |
| E.48 | Vývoj aproximácií ΔF pre $t = 2$ ns a $n = 10$ | 165 |
| E.49 | Vývoj aproximácií ΔF pre $t = 2$ ns a $n = 100$ | 165 |
| E.50 | Vývoj aproximácií ΔF pre $t = 20$ ns a $n = 10$ | 165 |
| E.51 | Vývoj aproximácií ΔF pre $t = 20$ ps a $n = 10$ | 166 |
| E.52 | Vývoj aproximácií ΔF pre $t = 20$ ps a $n = 100$ | 166 |
| E.53 | Vývoj aproximácií ΔF pre $t = 20$ ps a $n = 1000$ | 166 |
| E.54 | Vývoj aproximácií ΔF pre $t = 20$ ps a $n = 10000$ | 166 |
| E.55 | Vývoj aproximácií ΔF pre $t = 200$ ps a $n = 10$ | 167 |
| E.56 | Vývoj aproximácií ΔF pre $t = 200$ ps a $n = 100$ | 167 |
| E.57 | Vývoj aproximácií ΔF pre $t = 200$ ps a $n = 1000$ | 167 |

| | | |
|------|--|-----|
| E.58 | Vývoj aproximací ΔF pre $t = 200$ ps a $n = 10000$ | 167 |
| E.59 | Vývoj aproximací ΔF pre $t = 2$ ns a $n = 10$ | 167 |
| E.60 | Vývoj aproximací ΔF pre $t = 2$ ns a $n = 100$ | 167 |
| E.61 | Vývoj aproximací ΔF pre $t = 2$ ns a $n = 1000$ | 168 |
| E.62 | Vývoj aproximací ΔF pre $t = 20$ ns a $n = 10$ | 168 |
| E.63 | Vývoj aproximací ΔF pre $t = 20$ ns a $n = 100$ | 168 |
| E.64 | Vývoj aproximací ΔF pre $t = 200$ ns a $n = 10$ | 168 |

Zoznam tabuliek

| | | |
|-----|--|-----|
| 2.1 | Príklady použitých hodnôt parametra k | 29 |
| 5.1 | Počet n a dĺžka t serií dopredných simulácií $(Ala)_{10}$ vo vákuu | 48 |
| 5.2 | Počet n a dĺžka t dopredných simulácií systému $(Ala)_{10}$ vo vodnej obálke | 63 |
| 5.3 | Hodnoty t a n spätných simulácií $(Ala)_{10}$ vo vodnej obálke | 68 |
| 5.4 | Simulačné podmienky Gramicidínu A | 94 |
| A.1 | Charakterizácia atómov adenosínu pomocou konvencie CGenFF | 137 |
| A.2 | Optimalizované parciálne náboje ADN na základe CGenFF | 140 |
| A.3 | Rovnovážne vzdialenosti atómov a tuhosti daných väzieb | 143 |
| A.4 | Rovnovážne hodnoty uhlov a ich konštanty tuhosti | 144 |
| A.5 | Parametre dihedrálnych uhlov molekuly adenosínu a ich výpočtov | 148 |
| C.1 | Jensen-Shannonova divergencia hodnôt práce \mathcal{W}_{final} | 152 |
| D.1 | Zoznam PDB štruktúr A_{2A} adenosínového receptora | 153 |

Zoznam použitých symbolov a skratiek

| | |
|---------------------|---|
| TRPA1 | Transient receptor potencial ankyrin 1 ion channel |
| GPCR | G-protein coupled receptors |
| TRPC | Transient receptor potencial channel |
| (Ala) ₁₀ | Deca-Alanín |
| NECA | 5'-N-Etylkarboxamido-adenozíne |
| GDP | Guanozín-difosfát |
| GTP | Guanozín-trifosfát |
| FVA | N-formyl-L-valín |
| G | Glycín |
| A | Alanín |
| DLE | D-leucín |
| DVA | D-valín |
| V | Valín |
| W | Tryptofán |
| ETA | Etanolamín |
| K^+ | Draslíkový katión |
| Na^+ | Sodíkový katión |
| ATP | Adenozín-trifosfát |
| TRPM2 | Transient receptor potencial melastatin 2 ion channel |
| ADP-ribóza | Adenozín-difosfát-ribóza |
| Ca^{2+} | Vápnikový katión |
| POPC | Fosfatidylcholín |
| POPE | Fosfatidyletanolamín |
| m_α | Hmotnosť simulovaného atómu α |
| r_α | Poloha simulovaného atómu α |

| | |
|---------------------|---|
| \mathbf{p}_α | Hybnosť simulovaného atómu α |
| \mathbf{F}_α | Sila pôsobiaca na atóm α |
| E | Pôsobiaci potenciál, resp. energia systému |
| Δt | Veľkosť časového kroku simulácie |
| k | Parameter tuhosti harmonického, resp. dihedrálneho potenciálu |
| r | Aktuálna dĺžka väzby, resp. vzdialenosť atómov |
| θ | Uhol medzi trojicou atómov |
| Φ | Dihedrálly uhol trojice atómov |
| Ψ | Nepравý dihedrálly uhol |
| $\gamma_{l,m}$ | Fázový posun dihedrálneho uhla |
| ϵ_{ij} | Hĺbka potenciálového minima van der Waalsovho potenciálu |
| σ_{ij} | Efektívny rozmer interakcie van der Waalsovho potenciálu |
| q | Náboj atómu |
| L | Veľkosť hrany simulačnej bunky |
| ϵ_0 | Permitivita vákua |
| r_{cut} | Parameter dosahu van der Waalsovho potenciálu |
| T | Teplota systému |
| p | Tlak systému |
| $\mathbf{R}(t)$ | Časovo závislé stochastické sily |
| N | Počet častíc v systéme |
| NVE | Simulácie za konštantného počtu častíc, objemu a energie |
| NVT | Simulácie za konštantného počtu častíc, objemu a teploty |
| NPT | Simulácie za konštantného počtu častíc, tlaku a teploty |
| γ | Koeficient trenia medzi časticami systému a tepelného rezervoáru |
| t | Čas simulácie |
| k_b | Boltzmannova konštanta |
| \mathbf{Z}_α | Vektor gaussovských náhodných premenných s $\mu = 0$ a $\sigma = 1$ |
| \mathcal{V} | Dynamická premenná objemu |

| | |
|-----------------------|--|
| N_f | Počet stupňov volnosti systému |
| d | Dimenzia systému, resp. prejdená vzdialenosť virtuálneho atómu |
| $\dot{\epsilon}$ | Relatívna zmena objemu simulačnej bunky |
| P_{ext} | Vonkajší kontrolný tlak systému |
| γ_p | Koeficient trenia piestu barostatu |
| W | Hmotnosť piestu barostatu |
| $R_p(t)$ | Časovo závislá stochastická sila pôsobiaca na barostat |
| τ | Periódá oscilácií barostatu |
| $Erfc$ | Error funkcia |
| ϵ_r | Relatívna permitivita dielektrika |
| PME | Particle mesh Ewald method |
| SMD | Steered molecular dynamics |
| ξ | Vektor reakčnej koordináty |
| PMF | Potential of mean force, resp. $\Phi(\xi)$ |
| \mathcal{H} | Hamiltonián systému |
| β | Inverzná teplota |
| \mathcal{Z}_k | Kanonická partičná suma |
| ρ | Kanonické rozdelenie |
| \mathbf{f} | Vektor sily aplikovaný virtuálnym atómom |
| \mathbf{v} | Vektor rýchlosti pohybu virtuálneho atómu |
| AFM | Atomic force microscope |
| λ | Parameter charakterizujúci externý potenciál |
| F | Voľná energia systému s virtuálnym atómom |
| FEP | Free energy perturbation method |
| $\mathbf{M}(t)$ | Prechodová matica v čase t |
| $\boldsymbol{\pi}(t)$ | Vektor pravdepodobností stavov kanonického rozdelenia |
| δQ | Odovzdané teplo medzi systémom a tepelným rezervoárom |
| \mathcal{W} | Práca, ktorú počas simulácie na systém vykonáme |

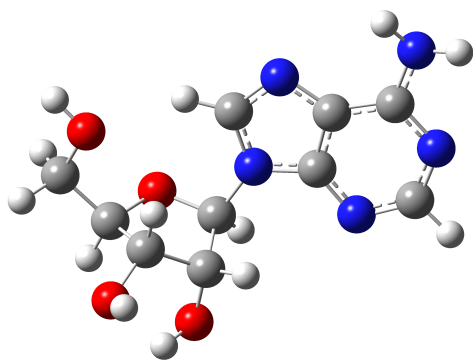
| | |
|---|---|
| \mathcal{P} | Pravdepodobnosť realizácie náhodného procesu |
| $\mathcal{P}_F(\mathcal{W})$ | Pravdepodobnostná distribúcia prác dopredných simulácií |
| $\mathcal{P}_R(-\mathcal{W})$ | Pravdepodobnostná distribúcia prác spätných simulácií |
| RNA | Ribonucleic acid |
| JSD | Jensen-Shannonova divergencia |
| σ | Rozptyl gaussovskej distribúcie |
| μ | Stredná hodnota gaussovskej distribúcie |
| \overline{W}_d | Stredná hodnota disipovanej práce |
| $h(\mathbf{r}^N, \boldsymbol{\lambda})$ | Harmonický potenciál |
| \mathbf{K} | Matica parametrov tuhosti |
| \mathbf{H} | Hessova matica |
| $Tr(\cdot)$ | Operátor stopy |
| MD | Molekulárna dynamika |
| TCL | Tool command language |
| CHARMM22 | Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics 22 |
| NaCl | Chlorid sodný |
| Cl ⁻ | Chloridové anióny |
| CHARMM36 | Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics 36 |
| CGenFF | CHARMM General Force Field for organic molecules |
| C_α | Uhlík hlavného reťazca pred karbonylovým uhlíkom proteínu |
| KCl | Chlorid draselný |
| c_{KCl} | Koncentrácia solí KCl |
| S_{mem} | Plocha fragmentu bunkovej membrány |
| n_{lip} | Počet lipidových atómov |
| n_{sys} | Celkový počet atómov |
| n_{gA} | Počet atómov Gramicidínu A (respektíve v jeho verzií) |
| n_{H_2O} | Počet molekúl vody |
| n_{KCl} | Počet molekúl chloridu draselného |

| | |
|-------------|--|
| PDB | Protein databank |
| n | Počet stredovaných trajektórií |
| t_{cum} | Celkový kumulatívny čas simulácie |
| F_1 | Aproximácia priebehu ΔF pomocou aritmetického priemeru |
| F_{exp} | Aproximácia priebehu ΔF pomocou Jarzynského identity |
| F_2 | Aproximácia priebehu ΔF rozvojom Jarzynského identity do druhého kumulantu |
| F_{exact} | Referenčný vývoj voľnej energie |
| RMSE | Root mean square error |
| $\delta\pm$ | Parciálny kladný/záporný náboj atómu |
| <i>Cys</i> | Cysteín |
| <i>Phe</i> | Fenylalanín |
| <i>Ile</i> | Izoleucín |
| <i>Tyr</i> | Tyrozín |
| <i>Asn</i> | Asparagín |
| <i>Gln</i> | Glutamín |
| <i>Thr</i> | Threonín |
| <i>Glu</i> | Kyselina glutámová |
| <i>Asp</i> | Kyselina asparágová |
| F_e^{cof} | Experimentálna hodnota väzbovej energie kofeínu |
| SSC | Standard state correction |

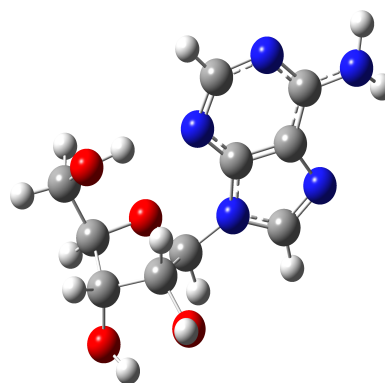
A. Parametrizácia adenozínu pomocou Force field Toolkitu

A.1 Voľba počiatocnej štruktúry

Prvým krokom predchádzajúcim parametrizácií adenozínu bola voľba jeho počiatocnej konfigurácie. Vzhľadom na jeho štruktúru pripadali do úvahy dve významné konformácie, konkrétne sym- alebo anti-konformácia, ktoré uvádzame na obrázkoch (A.1) a (A.2) [93]. Ďalej bolo potrebné určiť, orientáciu *OH* skupín na uhlíkoch *C2'* a *C3'*. Teda, či bude medzi nimi dochádzať k vytvoreniu vodíkovej väzby a aký bude jej smer. Do úvahy pripadali konfigurácie uvedené na obrázkoch (A.3), (A.4) a (A.5).

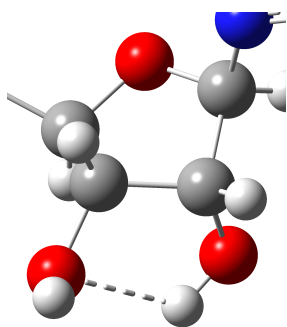


Obr. A.1: Anti-konformácia adenozínu

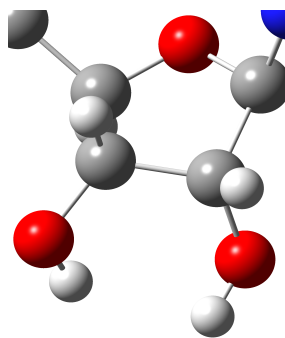


Obr. A.2: Sym-konformácia adenozínu

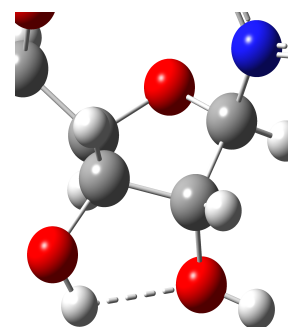
Voľba medzi sym- a anti-konformáciou bola urobená na základe konformácie vo väzbovom mieste A_{2A} adenozínového receptora (kde sa bude daná molekula simulovať). Ako referenciu sme použili MD simuláciu, kde sa používala menej presná parametrizácia na základe analógie s inými molekulami. Po analýze trajektórie s dĺžkou 1 ns (zápis bol každé 2 ps) sme určili, že vo väzbovom mieste sa vyskytovala len anti-konformácia a teda sme ju zvolili ako počiatočnú konfiguráciu.



Obr. A.3: Vodíková
vázba od $OH2'$ ku
 $OH3'$



Obr. A.4:
Konformácia bez
vodíkovej väzby



Obr. A.5: Vodíková
vázba od $OH3'$ ku
 $OH2'$

Orientáciu OH skupín sme určili pomocou analýzy výskytu vodíkových väzieb vo vyššie spomínanej simulácii (programom VMD [74]). Ako cutoff vzdialenosti O a H sme zvolili 3 \AA a uhol $O - H - O$ bol maximálne 66° . Tieto parametre dobre korešpondujú s tvorbou vodíkovej väzby medzi voľným elektrónovým párom atómu kyslíka a vodíkom na druhej OH skupine. Na základe týchto kritérií sme zistili, že vodíková väzba uvedená na obrázku (A.3) sa vyskytovala s 48.40% pravdepodobnosťou. Opačná konformácia bola zastúpená len v 1.00% prípadov a zvyšných 50.20% sa väzba nevyskytovala.

S využitím týchto informácií sme za počiatočnú orientáciu zvolili usporiadanie na obrázku (A.3). Samozrejme, bolo by taktiež oprávnené zvoliť orientáciu bez vodíkovej väzby, avšak tá by bola počas parametrizácie nestabilná a pre jej zachovanie by sme museli zafixovať niektoré dihedrálne uhly. Z toho dôvodu (vzhľadom na porovnateľné zastúpenie) sme zvolili konformáciu (A.3).

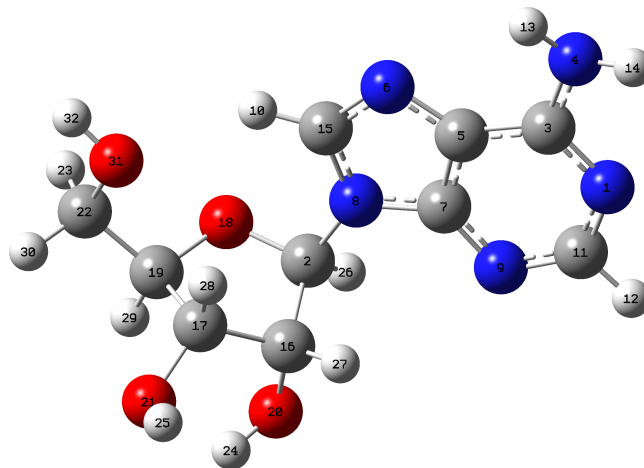
A.2 Optimalizácia geometrie

Ďalším krokom bola kvantovo-mechanická optimalizácia geometrie molekuly pomocou programu Gaussian [94], na úrovni **MP2/6 – 31G***. Route sekcia vstupného súboru bola v tvare

```
# MP2/6-31G* Opt=(Redundant) freq SCF=Tight
Geom=PrintInputOrient
```

Po ukončení výpočtu sme dosiahli stav bez imaginárnych frekvencií (s energiou -960.73 Ha), ktorý uvádzame na obrázku (A.6) (vizualizácia bola urobená v programe GaussView). Na tomto obrázku je uvedené aj očíslovanie daných atómov, ktoré budeme neskôr používať.

Obrázok (A.7) ešte zobrazuje prelínanie počiatkovej a optimalizovanej štruktúry. Vidíme, že vzájomná zmena je len minimálna a najviac sa prejavuje v prípade vodíkovej väzby medzi skupinami $OH2'$ a $OH3'$.



Obr. A.6: Optimalizovaná štruktúra ADN

Ešte pred optimalizáciou sme museli priradiť jednotlivým atómom ich typ na základe silového poľa CGenFF (na vygenerovanie .psf súboru s charakterizáciou topológie danej molekuly). Jednému chemickému prvku môže prislúchať niekoľko atomárnych typov, podľa toho s akými atómami tvorí väzby. V tabulke (A.1) uvádzame značku prvku s číslom konzistentným s obrázkom (A.6) a jemu prislúchajúci typ určený v súlade s CGenFF [49].

Tabuľka A.1: Charakterizácia atómov adenzínu pomocou konvencie CGenFF

| Atóm | At. typ | Atóm | At. typ | Atóm | At. typ | Atóm | At. typ |
|------|---------|------|---------|------|---------|------|---------|
| N1 | NG2R62 | N9 | NG2R62 | C17 | CG3C51 | H25 | HGP1 |
| C2 | CG3C51 | H10 | HGR52 | O18 | OG3C51 | H26 | HGA1 |
| C3 | CG2R64 | C11 | CG2R64 | C19 | CG3C51 | H27 | HGA1 |
| N4 | NG2S3 | H12 | HGR62 | O20 | OG311 | H28 | HGA1 |
| C5 | CG2RC0 | H13 | HGP4 | O21 | OG311 | H29 | HGA1 |
| N6 | NG2R50 | H14 | HGP4 | C22 | CG321 | H30 | HGA2 |
| C7 | CG2RC0 | C15 | CG2R53 | H23 | HGA2 | O31 | OG311 |
| N8 | NG2R51 | C16 | CG3C51 | H24 | HGP1 | H32 | HGP1 |

A.3 Optimalizácia nábojového rozdelenia

Ďalší postup pozostával z parametrizácie nábojového rozloženia, kedy počítame vzájomné interakcie adenzínu a molekúl vody (uvažované ako *TIP3P*) [50]. Takže, každému vode dostupnému atómu priradíme niekoľko molekúl, v závislosti od toho, či je to donor vodíkovej väzby, akceptor alebo oboje. Počiatočná pozícia molekuly bola zvolená tak, aby sa minimalizovali stérické repulzie s okolitou štruktúrou.

CGenFF predpokladá, že vodíkové väzby sú v prípade fixných nábojov lineárne. Z toho dôvodu musíme ešte optimalizovať vzdialenosť H_2O a študovanej molekuly a natočenie okolo ich spojnice [50].

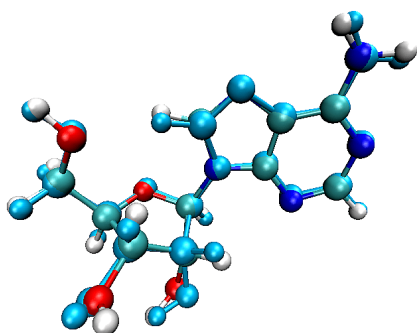
Na základe vyššie uvedených informácií bolo vygenerovaných 32 vstupných súborov programu Gaussian pre 32 molekúl H_2O na úrovni **HF/6-31G***). Route sekcia pozostávala z príkazov

```
# HF/6-31G* Opt=(Z-matrix , MaxCycles=100)
Geom=PrintInputOrient
```

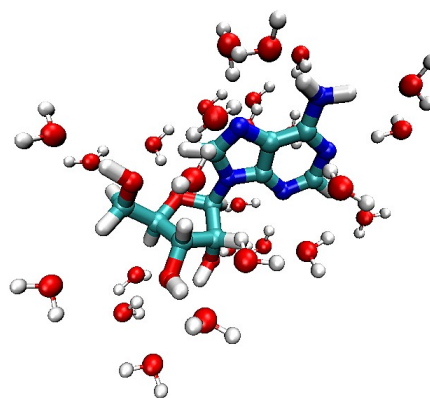
Okrem toho pre nasledujúci výpočet potrebujeme určiť energiu H_2O na úrovni **RHF/6-31G*** a energie ADN na úrovni **HF/6-31G*** a **MP2/6-31G***. Route sekcie pre spomínané výpočty nasledujúcu štruktúru

```
# RHF/6-31G* SCF=Tight
# HF/6-31G* SCF=Tight
# MP2/6-31G* SCF=Tight Density=Current
```

Na obrázku (A.8) uvádzame adenzín spolu s optimalizovanými polohami a natočeniami molekúl vody. Z dôvodu lepšej prehľadnosti tento obrázok nezobrazuje všetky molekuly.

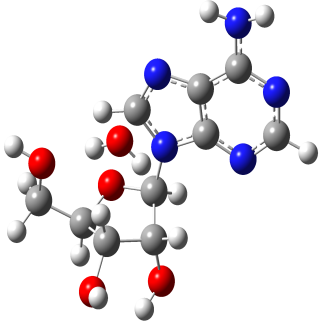


Obr. A.7: Porovnanie počiatočnej (tyrkysová farba) a optimalizovanej štruktúry (podľa prvkov)

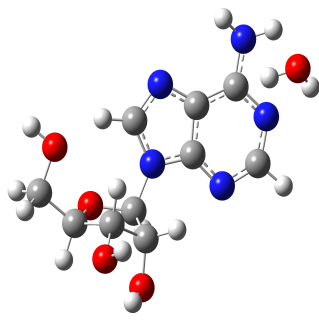


Obr. A.8: Zobrazenie finálnych polôh molekúl vody

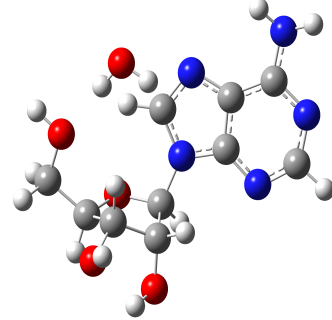
Počas výpočtov optimálnych pozícií sme museli niektoré pozície manuálne upraviť, z dôvodu výrazných repulzií, ktoré nebol použitý algoritmus schopný eliminovať. Jeden z týchto prípadov ukazujú obrázky (A.9) a (A.10), kde je automaticky určená počiatočná poloha molekuly vody a jej finálna poloha po QM výpočte. Keďže má ísť o interakciu s kyslíkom O31, tak je jasné, že táto poloha vôbec nie je rozumná.



Obr. A.9: Počiatočná konfigurácia H_2O voči kyslíku O31



Obr. A.10: Finálna konfigurácia H_2O voči kyslíku O31



Obr. A.11: Poloha H_2O voči kyslíku O31 po korekciách

Na odstránenie pozorovaných repulzií sme zmenili uhol medzi priľahlým vodíkom molekuly vody, kyslíkom O31 a uhlíkom C22 z hodnoty 126.03° na 157.00° . V tomto prípade už výpočet prebehol bez problémov a výslednú polohu uvádzame na obrázku (A.11).

Po dokončení vyššie uvedených QM výpočtov sme prešli k optimalizácii parciálnych nábojov jednotlivých atómov. V tejto časti sme sa snažili určiť také hodnoty q_i , aby pri použití modelu vody TIP3P bola čo najlepšie reprodukovaná interakčná energia a výsledná poloha H_2O a dipól študovanej molekuly. Na tento účel bol použitý takzvaný Komplexový algoritmus (modifikácia Simplexového algoritmu) s účelovou funkciou Ψ_{charge} v tvare [50]:

$$\Psi_{charge} = \sum_i w_i \left[\left(\frac{E_{QM} - E_{MM}}{E_{scale}} \right)^2 + w_{dist} \left(\frac{d_{QM} - d_{MM}}{d_{scale}} \right)^2 \right] + N_{chrg} w_{dip} \left(\left(\frac{\frac{p_{MM}}{p_{QM}} - 1.2}{0.1} \right)^2 ; \frac{p_{MM}}{p_{QM}} < 1.2 \right. + \left. \begin{cases} 0; \Delta\theta < 30^\circ \\ p_{QM} \left(\frac{\Delta\theta - 30}{5} \right)^2 ; \Delta\theta > 30^\circ \end{cases} \right) \quad (A.1)$$

Sumácia prebieha cez všetky molekuly vody použité v parametrizácií. Parametre w_i , w_{dist} a w_{dip} sú váhy týchto príspevkov určené konvenciou CGenFF. $E_{scale} = 0.2$ kcal/mol a $d_{scale} = 0.1$ Å sú škálovacie parametre, potrebné k porovnávaniu jednotlivých príspevkov do Ψ_{charge} . E_{QM} odpovedá energií získanej z kvantovo-mechanického prístupu a E_{MM} zase z molekulárnej dynamiky (pre vzdialenosť vody d a veľkosť dipólového momentu p to platí analogicky). N_{chrg} je počet parametrizovaných atómov a $\Delta\theta$ je uhol medzi vektorom dipólového momentu získaného z QM výpočtu a z molekulárnej dynamiky. V prípade, že $1.2 < p_{MM}/p_{QM} < 1.5$ je druhý člen Ψ_{charge} nulový.

Náboje alifatických vodíkov neboli parametrizované, ale na základe konvencie CGenFF im bola priradená hodnota $q_i = 0.090$ (násobku elementárneho náboja). To odpovedá vodíkom typu *HGA1* a *HGA2*.

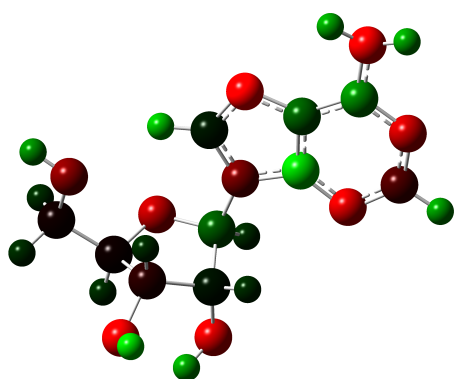
Konvergencia nábojového rozdelenia bola dosiahnutá v tretej iterácií. Následne sme ešte urobili dve kontrolné iterácie s rovnakým výsledkom. Finálne hodnoty parciálneho náboja uvádzame v tabuľke (A.2). Na obrázku (A.12) sme zobrazili toto rozdelenie vo farebnej škále.

Tabuľka A.2: Optimalizované parciálne náboje *ADN* na základe CGenFF

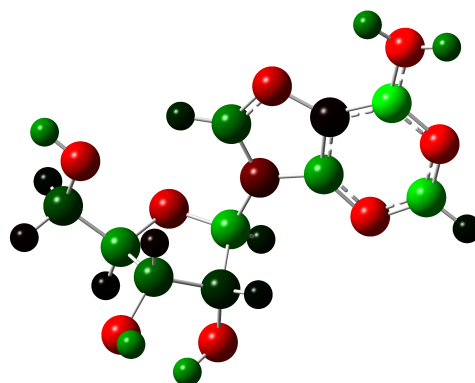
| Atóm | Náboj [e] | Atóm | Náboj [e] | Atóm | Náboj [e] | Atóm | Náboj [e] |
|------|-----------|------|-----------|------|-----------|------|-----------|
| N1 | -0.411 | N9 | -0.454 | C17 | -0.086 | H25 | 0.451 |
| C2 | 0.185 | H10 | 0.379 | O18 | -0.380 | H26 | 0.090 |
| C3 | 0.278 | C11 | -0.163 | C19 | -0.029 | H27 | 0.090 |
| N4 | -0.504 | H12 | 0.311 | O20 | -0.453 | H28 | 0.090 |
| C5 | 0.195 | H13 | 0.324 | O21 | -0.498 | H29 | 0.090 |
| N6 | -0.579 | H14 | 0.324 | C22 | -0.036 | H30 | 0.090 |
| C7 | 0.432 | C15 | 0.051 | H23 | 0.090 | O31 | -0.280 |
| N8 | -0.245 | C16 | 0.040 | H24 | 0.329 | H32 | 0.279 |

Pre porovnanie sme určili parciálne náboje adenosínu aj pomocou metódy CHELPG. Výsledné rozloženie uvádzame na obrázku (A.13).

Ako ukazujú obrázky (A.12) a (A.13) parciálne náboje dané metódou CHELPG a CGenFF sú pomerne podobné. Samozrejme, v niektorých prípadoch sú rozdiely dokonca aj v znamienku nábojov, čo ale nie je až také prekvapivé, keďže používame inú metodiku, založenú na úplne odlišnom princípe získania požadovaných výsledkov.

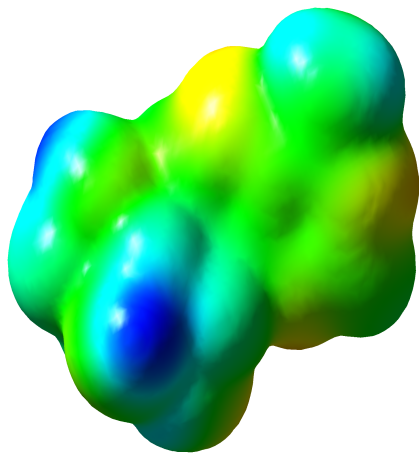


Obr. A.12: Parciálne náboje *ADN* na základe CGenFF

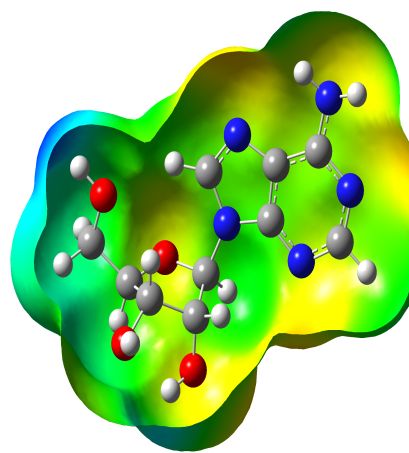


Obr. A.13: Parciálne náboje *ADN* určené pomocou CHELPG

Na koniec tejto podkapitoly uveďme ešte vizualizáciu elektrostatického potenciálu získaného pomocou CHELPG (obrázky (A.14) a (A.15)). Ako aj z parciálnych nábojov, tak aj z povrchu elektrostatického potenciálu vidíme, že k najväčšej koncentrácii náboja dochádza v okolí dusíkov a kyslíkov. Pozorujeme aj výrazne kladné oblasti potenciálu a to konkrétne na vodíkoch *OH* skupín ribózy.



Obr. A.14: Elektrostatický potenciál molekuly *ADN*



Obr. A.15: Rez elektrostatickým potenciálom *ADN*

A.4 Optimalizácia väzbových a uhlových parametrov

Ďalší krok pozostával z optimalizácie väzbových a uhlových parametrov, konkrétne hodnôt rovnovážnych vzdialeností a uhlov medzi atómami adenosínu a príslúchajúcich silových konštánt.

Táto optimalizácia je založená na využití hessiánu vzťahnutého voči vnútorným súradniciam molekuly, získaného z QM výpočtu v Gaussiane. Jeho úroveň bola **MP2/6 – 31G*** a route sekcia mala tvar

```
# MP2/6-31G* Geom=(AllCheck ,ModRedundant)  Freq
NoSymm  IOp(7/33=1)  SCF=Tight  Guess=Read
```

Pomocou hessiánu určujeme v harmonickom priblížení lokálny tvar povrchu potenciálnej energie každej z vnútorných koordinát. PES určujeme aj molekulárnou dynamikou a oba prístupy porovnávame. Na optimalizáciu znova využívame Komplexový algoritmus s účelovou funkciou Ψ_{bonded} [50]:

$$\Psi_{bonded} = \sum_{\substack{bonds \\ angles}} \left(\frac{q_{QM} - q_{MM}}{q_{scale}} \right)^2 + w_E \left(\frac{E_{QM}^{dis} - E_{MM}^{dis}}{E_{scale}} \right)^2 \quad (A.2)$$

Sumácia prebieha cez všetky vnútorné koordináty (väzby a uhly). $w_E = 1/2$ je relatívna váha energetického príspevku, voči príspevku odchýlky geometrie molekuly od QM hodnôt. q je buď väzbová, alebo uhlová súradnica pre QM alebo MM výpočet (q_{scale} je škálovací faktor s hodnotou 0.03 \AA pre väzby a 3° pre uhly). E^{dis} označuje zmenu energie pri vychýlení väzbovej alebo uhlovej koordináty z rovnovážnej polohy (teda predstavuje lokálny tvar povrchu potenciálnej energie). V prípade energie je hodnota škálovacieho faktoru rovná $E_{scale} = 1 \text{ kcal/mol}$.

Na to, aby sme dosiahli konvergenciu daných parametrov bolo nutné urobiť 90000 krokov. Tie boli priemerne každých 3000 krokov prerušené na určenie, v akom stave sa daný výpočet nachádza a či už nedošlo k stabilizácii hodnoty účelovej funkcie.

Hodnoty tuhostí k jednotlivých väzieb a uhlov a ich rovnovážne hodnoty r^0 a θ^0 uvádzame v tabuľkách (A.3) a (A.4). Taktiež, v nich pre porovnanie uvádzame aj relatívny rozdiel rovnovážnych hodnôt voči QM hodnotám δr_{rel}^0 a $\delta \theta_{rel}^0$. Ako môžeme vidieť, tieto odchýlky sú pomerne malé (takže sme dosiahli prijateľného minima). Hodnoty tuhostí vyzerajú tiež rozumne, pričom pozorujeme, že pre uhly aromatických jadier sú výrazne vyššie. Rozumné výsledky sme získali aj v prípade väzieb, napríklad to, že väzby vodíka s elektronegatívnymi atómami vykazujú najvyššiu tuhosť zo všetkých zistených hodnôt.

Tabuľka A.3: Rovnovážne vzdialenosti atómov a tuhosti daných väzieb

| Väzba | r^0 [Å] | δr_{rel}^0 [%] | k [$\frac{kcal}{mol \cdot \text{Å}^2}$] | Väzba | r^0 [Å] | δr_{rel}^0 [%] | k [$\frac{kcal}{mol \cdot \text{Å}^2}$] |
|---------|-----------|------------------------|---|---------|-----------|------------------------|---|
| N1–C3 | 1.308 | 2.57 | 367.158 | C7–N9 | 1.305 | 2.94 | 360.284 |
| N1–C11 | 1.308 | 3.31 | 367.158 | N8–C15 | 1.358 | 1.43 | 297.988 |
| N9–C11 | 1.308 | 2.37 | 367.158 | H10–C15 | 1.069 | 1.13 | 380.566 |
| C2–N8 | 1.449 | 0.79 | 277.893 | H12–C11 | 1.080 | 0.74 | 368.987 |
| C2–C16 | 1.501 | 1.58 | 183.309 | C16–O20 | 1.409 | 0.59 | 352.097 |
| C2–O18 | 1.409 | 0.78 | 229.201 | C17–O21 | 1.409 | 1.40 | 352.097 |
| C19–O18 | 1.409 | 2.15 | 229.201 | C19–C22 | 1.495 | 0.88 | 299.843 |
| C2–H26 | 1.094 | 0.07 | 342.341 | O20–H24 | 0.970 | 0.87 | 499.769 |
| C16–H27 | 1.094 | 0.40 | 342.341 | O21–H25 | 0.970 | 0.31 | 499.769 |
| C3–N4 | 1.371 | 0.38 | 462.081 | O31–H32 | 0.970 | 0.21 | 499.769 |
| C3–C5 | 1.357 | 3.62 | 287.909 | C22–H23 | 1.097 | 0.06 | 339.233 |
| N4–H13 | 1.015 | 0.26 | 477.934 | C22–H30 | 1.097 | 0.21 | 339.233 |
| N4–H14 | 1.015 | 0.25 | 477.934 | C22–O31 | 1.422 | 0.40 | 355.308 |
| C5–N6 | 1.354 | 1.77 | 228.383 | C16–C17 | 1.501 | 1.91 | 183.309 |
| C5–C7 | 1.378 | 1.54 | 237.863 | C17–C19 | 1.501 | 1.47 | 183.309 |
| N6–C15 | 1.319 | 0.83 | 376.050 | C17–H28 | 1.094 | 0.11 | 342.341 |
| C7–N8 | 1.368 | 0.73 | 211.790 | C19–H29 | 1.094 | 0.43 | 342.341 |

A.5 Optimalizácia dihedrálov

Posledným krokom tejto práce je určenie parametrov spojených s dihedrálnymi uhlami (fázový posun, konštanty tuhosti a multiplicitu jednotlivých členov). Multiplicita m v rovnici (2.9) ako parameter formálne nevystupuje, pretože sumácia prebieha cez všetky prípustné hodnoty. Avšak, v skutočnosti musíme jeho hodnotu manuálne nastaviť (respektíve určiť, ktoré členy sa vo výslednej parametrizácii reálne uplatnia). Dôvodom je, že potom nemusíme zbytočne zvyšovať dimenziu prehľadávaného priestoru a tým komplikovať výpočet a interpretáciu výsledkov.

Aj v tejto časti sme prehľadávali povrch potenciálnej energie, konkrétne sme pre každý (neredundantný) dihedrálny uhol urobili jednodimenzionálny sken PES na úrovni **MP2/6 – 31g(d)**. Počas výpočtu zároveň prebehla v každom bode skenovania optimalizácia geometrie študovanej molekuly. Route sekcia vstupného súboru bola v tvare

```
# opt=modredundant MP2/6–31g(d) Geom=PrintInputOrient
```

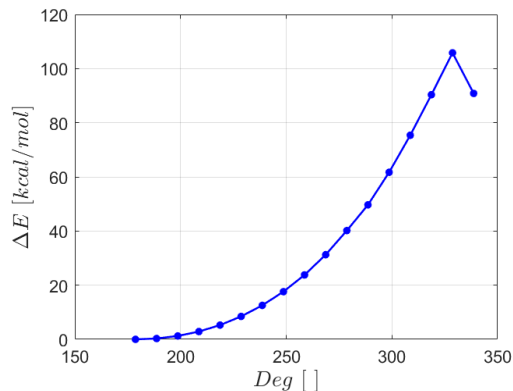
Rozsah skenu bol určený v závislosti od konkrétneho dihedrálu, pričom zahŕňal dve prehľadávania. Jeden sken bol robený z počiatočnej hodnoty (optimalizovanej geometrie) v zvolenom rozsahu v kladnom smere, druhý v smere zápornom.

Tabuľka A.4: Rovnovážne hodnoty uhlov a ich konštanty tuhosti

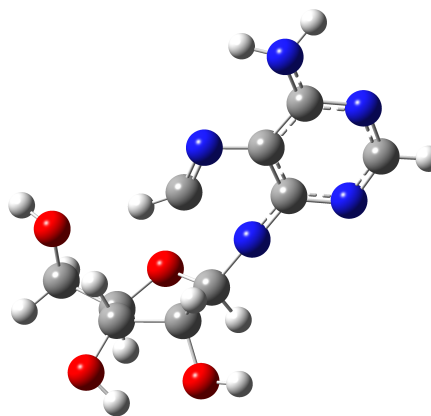
| Uhol | θ^0 [rad] | $\delta\theta_{rel}^0$ [%] | k [$\frac{kcal}{mol \cdot rad^2}$] | Uhol | θ^0 [rad] | $\delta\theta_{rel}^0$ [%] | k [$\frac{kcal}{mol \cdot rad^2}$] |
|-------------|------------------|----------------------------|--|-------------|------------------|----------------------------|--|
| N1–C11–H12 | 115.237 | 0.04 | 48.470 | C5–C7–N8 | 107.720 | 2.75 | 125.837 |
| N1–C11–N9 | 128.651 | 0.12 | 47.483 | C5–N6–C15 | 104.493 | 0.95 | 138.310 |
| N1–C3–C5 | 117.334 | 1.45 | 58.823 | N6–C15–H10 | 126.182 | 0.35 | 14.280 |
| N1–C3–N4 | 121.915 | 2.45 | 118.859 | N6–C15–N8 | 113.503 | 0.05 | 121.813 |
| C2–O18–C19 | 108.272 | 1.38 | 122.283 | N6–C5–C7 | 113.968 | 1.99 | 164.504 |
| C2–C16–H27 | 110.903 | 0.79 | 66.154 | C7–N9–C11 | 107.938 | 2.50 | 88.755 |
| C2–C16–O20 | 105.887 | 1.54 | 81.629 | C7–N8–C15 | 105.825 | 0.60 | 151.551 |
| C2–C16–C17 | 102.732 | 1.40 | 119.595 | N8–C15–H10 | 122.544 | 1.44 | 86.138 |
| C2–N8–C15 | 129.278 | 0.46 | 43.227 | N8–C7–N9 | 128.846 | 0.74 | 84.021 |
| C2–N8–C7 | 124.457 | 0.32 | 31.002 | N8–C2–H26 | 108.620 | 0.19 | 62.006 |
| C3–C5–C7 | 119.924 | 3.56 | 101.390 | N8–C2–O18 | 108.999 | 0.56 | 85.693 |
| C3–C5–N6 | 131.846 | 0.44 | 96.400 | N8–C2–C16 | 109.659 | 1.46 | 63.346 |
| C3–N4–H14 | 118.037 | 2.15 | 64.717 | N9–C11–H12 | 115.237 | 0.67 | 48.470 |
| C3–N4–H13 | 118.037 | 1.37 | 64.717 | H13–N4–H14 | 116.297 | 0.40 | 45.901 |
| C3–N1–C11 | 115.029 | 2.81 | 72.236 | C16–O20–H24 | 107.284 | 2.03 | 102.732 |
| N4–C3–C5 | 121.362 | 0.41 | 20.440 | C16–C17–H28 | 111.198 | 0.63 | 82.278 |
| C5–C7–N9 | 129.061 | 1.41 | 110.301 | C16–C17–O21 | 105.887 | 5.89 | 81.629 |
| C17–C16–H27 | 110.903 | 3.36 | 66.154 | C16–C17–C19 | 102.732 | 1.72 | 119.595 |
| C17–C16–O20 | 105.887 | 2.83 | 81.629 | C16–C2–H26 | 110.903 | 0.42 | 66.154 |
| O18–C19–C22 | 110.723 | 1.00 | 46.834 | C16–C2–O18 | 106.780 | 0.04 | 74.260 |
| O18–C19–H29 | 111.198 | 1.60 | 82.278 | C17–O21–H25 | 107.284 | 0.46 | 102.732 |
| O18–C2–H26 | 111.198 | 0.61 | 82.278 | C17–C19–C22 | 114.102 | 1.20 | 60.627 |
| C19–C22–O31 | 107.542 | 1.01 | 90.182 | C17–C19–H29 | 110.903 | 2.23 | 66.154 |
| C19–C22–H30 | 110.608 | 2.48 | 69.313 | C17–C19–O18 | 106.780 | 1.85 | 74.260 |
| C19–C22–H23 | 110.608 | 1.69 | 69.313 | C19–C17–H28 | 110.903 | 0.53 | 66.154 |
| O20–C16–H27 | 110.972 | 0.72 | 47.941 | C19–C17–O21 | 105.887 | 2.61 | 81.629 |
| O21–C17–H28 | 110.972 | 0.77 | 47.941 | C22–O31–H32 | 108.590 | 0.59 | 66.721 |
| H23–C22–O31 | 113.175 | 1.55 | 79.289 | C22–C19–H29 | 111.117 | 2.13 | 100.599 |
| H23–C22–H30 | 110.604 | 1.77 | 86.335 | H30–C22–O31 | 113.175 | 1.70 | 79.289 |

V prípade dihedrálnych uhlov aromatického jadra alebo čisto len ribózového cyklu bol rozsah vo veľkosti $\pm 45^\circ$ z dôvodu ich výraznej rigidity. Energetické rozdiely jednotlivých konfigurácií pri väčších odchýlkach ($\approx 40^\circ$) od rovnovážnej hodnoty dosahovali až ≈ 10 kcal/mol, čo môžeme vidieť napríklad na grafe (A.16). V poslednom kroku dokonca došlo k narušeniu integrity tohto cyklu a vytvoreniu vodíkovej väzby medzi vodíkom H10 a kyslíkom O31, čo sa prejavilo značným

poklesom energie. Túto finálnu konfiguráciu uvádzame na obrázku (A.17).



Obr. A.16: Sken dihedrálneho uhla aromatického jadra v rozsahu 180°



Obr. A.17: Štruktúra na konci skenu dihedrálu v aromatickom jadre

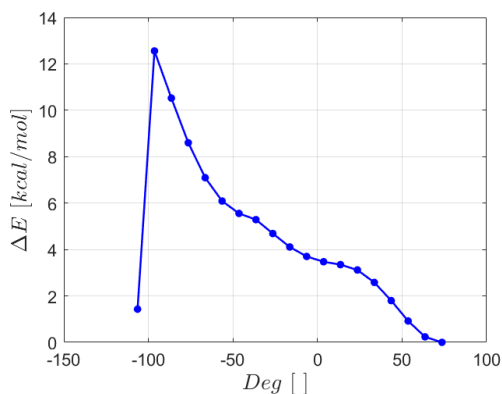
Zároveň sme usúdili, že daný rozsah nie je problémom, vzhľadom k energii potrebnej na dosiahnutie tohto vychýlenia (keďže v MD simuláciách sa k takýmto energiám zďaleka nepriblížime).

V prípade dihedrálů, čiastočne tvorených atómami aromatického cyklu a čiastočne atómami ribózového cyklu (prípadne dusíkom amino-skupiny) sme zvolili skenovanie v rozsahu $\pm 90^\circ$. Jediná výnimka bola pri určovaní dihedrálu $C16 - C2 - N8 - C7$, kedy dochádzalo k vzájomnej rotácii adenínu a ribózy. V tomto prípade sme zvolili rozsah $\pm 180^\circ$.

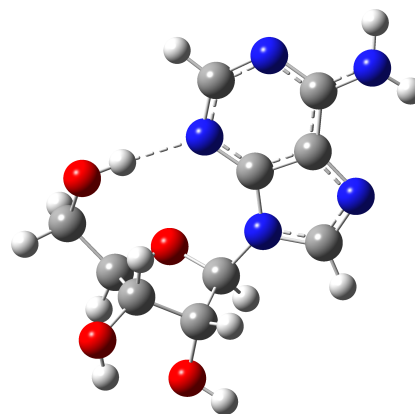
Pri ostatných dihedrálůch, ako napríklad pri OH alebo amino-skupinách sme urobili kompletný sken v rozsahu $\pm 180^\circ$.

V priebehu niektorých výpočtov sme museli vstupné súbory ešte dodatočne upravovať. Konkrétne sme museli zafixovať niektoré dihedrály, aby sa zamedzilo príliš veľkým štruktúrnym zmenám pri optimalizácii geometrie molekuly, ktoré spôsobovali prudké zmeny energie v získanom vývoji. Tolerovanie týchto efektův vo výslednej parametrizácii by malo nepriaznivý vplyv na správanie molekuly, keďže nemajú priame spojenie s uvažovaným dihedrálům (efektívne by boli započítané dvakrát). Príklad takého správania môžeme vidieť na obrázku (A.19), kde počas skenu $C16 - C2 - N8 - C7$ došlo k vytvoreniu vodíkovej väzby medzi $H32$ a $N9$ a taktiež k zmene orientácie zvyšných OH skupín. Prejav týchto zmien ukazuje graf (A.18), kde vidíme výrazný pokles energie v poslednom kroku skenovania.

Príklady výsledných závislostí sú uvedené v grafoch (A.20), (A.21), (A.22) a (A.23). Konkrétne sa jedná o skeny dihedrálnych uhlov $C19 - C22 - O31 - H32$, $C2 - C16 - O20 - H24$, $C17 - C19 - C22 - O31$ a $C7 - N9 - C11 - N1$.



Obr. A.18: Sken dihedrálu
C16 – C2 – N8 – C7



Obr. A.19: Vodíková väzba počas skenu C16 – C2 – N8 – C7

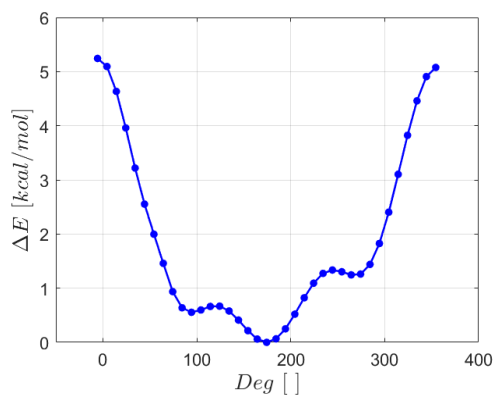
Po úspešnom ukončení vyššie spomínaných skenov sme pokračovali optimalizáciou dihedrálnych parametrov. Účelová funkcia bola v tomto prípade reprezentovaná závislosťou [50]:

$$\Psi_{dihed} = \sum_{conform} w_i (E_{QM} - E_{MM} + c)^2 \quad (A.3)$$

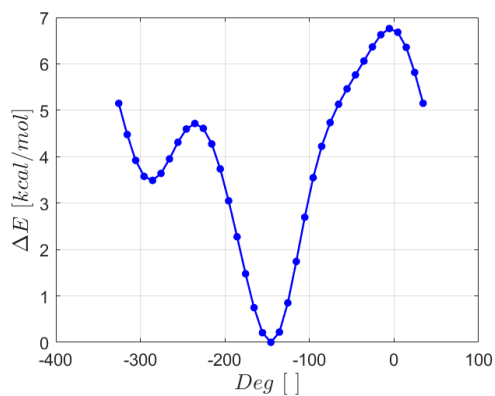
Sumácia prebieha cez jednotlivé konformácie QM skenov a energia E_{QM} je určená priamo z daného skenu. Energie E_{MM} sú dopočítané na základe aktuálnych hodnôt optimalizovaných parametrov. Konštanta c je normalizačný faktor zvolený tak, aby platilo $\partial\Psi_{dihed}/\partial c = 0$. To znamená, že musí platiť $c = \bar{E}_{MM} - \bar{E}_{QM}$, kde \bar{E}_{MM} a \bar{E}_{QM} sú aritmetické priemery E_{MM} a E_{QM} vážené koeficientmi w_i .

Na koniec ešte poznamenajme, že prípustné hodnoty fázového posunu γ sú len 0° alebo 180° . Táto reštrikcia je vložaná z dôvodu, že $\gamma \neq 0^\circ$ alebo $\gamma \neq 180^\circ$ vytvára asymetriu, ktorá vyúsťuje do rôznych energií pre molekuly so stereogénnymi centrami [50].

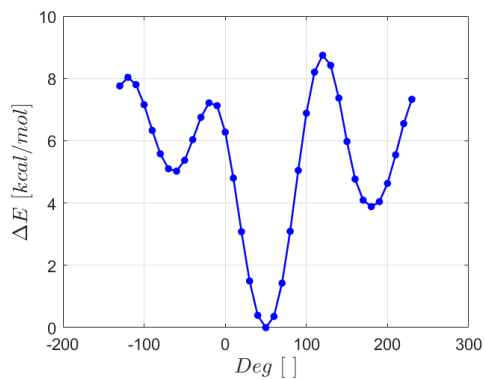
Výsledné hodnoty konštánt tuhosti k^{dihed} , fázových posunov γ a multiplicít m jednotlivých dihedrálov a taktiež aj rozsah skenovania $\pm\Delta\Phi$ a reštrikcie aplikované na jednotlivé QM výpočty (pre kladný a aj záporný smer skenovania) uvádzame v tabuľke (A.5).



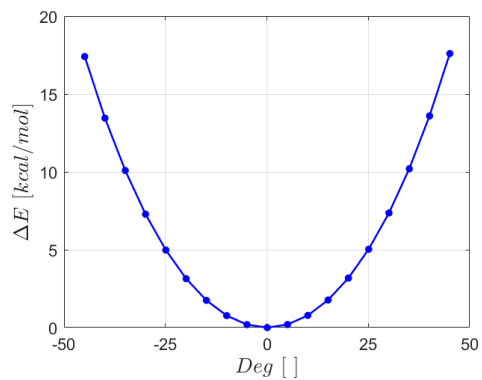
Obr. A.20: Sken dihedrálneho uhla
 $C19 - C22 - O31 - H32$



Obr. A.21: Sken dihedrálneho uhla
 $C2 - C16 - O20 - H24$



Obr. A.22: Sken dihedrálneho uhla
 $C17 - C19 - C22 - O31$



Obr. A.23: Sken dihedrálneho uhla
 $C7 - N9 - C11 - N1$

Tabuľka A.5: Parametre dihedrálnych uhlov molekuly adenozinu a ich výpočtov

| Dihedrál | $\pm\Delta\Phi$ [°] | k^{dih} [kcal/mol] | γ [°] | m [] | Reštrikcie (+) | Reštrikcie (-) |
|-----------------|------------------------|-------------------------|--------------|------------|------------------------------------|---|
| C7-N9-C11-N1 | 45 | 4.7450 | 180.00 | 2 | - | - |
| N1-C3-C5-N6 | 45 | 1.9560 | 180.00 | 2 | - | - |
| C2-O18-C19-C17 | 45 | 0.1370 | 0.00 | 3 | - | C19-C22-O31-H32 C16-C2-N8-C7 C2-C16-O20-H24 |
| C2-C16-C17-C19 | 45 | 2.2320 | 0.00 | 3 | - | - |
| C5-C7-N8-C2 | 90 | 0.5370 | 180.00 | 2 | - | - |
| C2-N8-C15-N6 | 90 | 3.0180 | 180.00 | 2 | - | - |
| C3-C5-N6-C15 | 45 | 1.5070 | 180.00 | 2 | - | - |
| C3-C5-C7-N8 | 45 | 0.0060 | 0.00 | 2 | - | - |
| C3-N1-C11-N9 | 45 | 5.5790 | 180.00 | 2 | - | - |
| C11-N1-C3-N4 | 90 | 3.1390 | 180.00 | 2 | - | - |
| C5-C7-N9-C11 | 45 | 2.9450 | 180.00 | 2 | - | - |
| C5-N6-C15-N8 | 45 | 8.4230 | 180.00 | 2 | - | - |
| C16-C2-N8-C7 | 180 | 2.1450 | 0.00 | 3 | O18-C19-C22-O31 C19-C22-O31-H32 | C19-C22-O31-H32 C17-C19-C22-O31 C19-C17-O21-H25 |
| N8-C2-C16-C17 | 90 | 0.9620 | 0.00 | 3 | C2-C16-O20-H24 C22-C19-C17-O21 | - |
| N8-C2-O18-C19 | 90 | 2.1700 | 0.00 | 3 | - | C2-C16-O20-H24 |
| C16-C17-C19-O18 | 40 | 0.3240 | 180.00 | 3 | C19-C22-O31-H32 C16-C2-N8-C7 | - |
| C17-C19-C22-O31 | 180 | 2.2750 | 180.00 | 1 | - | C19-C17-O21-H25 C16-C2-N8-C7 |
| | | 0.4710 | 180.00 | 2 | | |
| | | 1.3500 | 180.00 | 3 | | |
| | | 0.6290 | 0.00 | 4 | | |
| N1-C3-N4-H14 | 180 | 0.5260 | 180.00 | 2 | - | - |
| C2-C16-O20-H24 | 180 | 1.5350 | 0.00 | 1 | C19-C17-O21-H25 C16-C2-N8-C7 | C19-C17-O21-H25 |
| | | 0.1430 | 180.00 | 2 | | |
| | | 0.4410 | 0.00 | 3 | | |
| C19-C17-O21-H25 | 180 | 1.5350 | 0.00 | 1 | - | C2-C16-O20-H24 |
| | | 0.1430 | 180.00 | 2 | | |
| | | 0.4410 | 0.00 | 3 | | |
| C19-C22-O31-H32 | 180 | 1.3840 | 0.00 | 1 | C7-N8-C2-C16 | C7-N8-C2-C16 O18-C19-C22-O31 |
| | | 1.3960 | 0.00 | 2 | | |
| | | 1.0300 | 180.00 | 3 | | |

B. Stiff-spring aproximácia

B.1 Odvodenie stiff-spring aproximácie

V tejto prílohe podrobne odvodíme takzvanú Stiff-spring aproximáciu, charakterizovanú rovnicou $\Delta\Phi \approx \Delta F$. Využijeme vzťahy, ktoré sme si predtým zadefinovali v kapitole (2.2.1).

Vzťah pre hodnotu voľnej energie upraveného systému (2.37) môžeme upraviť do tvaru (B.1) vložením výrazu $\int \delta(\boldsymbol{\xi}(\mathbf{r}^N) - \boldsymbol{\xi}') d\boldsymbol{\xi}' = 1$ a využitím definície potenciálu strednej sily $\Phi(\boldsymbol{\xi})$ (2.36) [8].

$$e^{-\beta F(\boldsymbol{\lambda})} = \int \exp \left\{ -\beta\Phi(\boldsymbol{\xi}') - \frac{\beta}{2}(\boldsymbol{\xi}' - \boldsymbol{\lambda}) \cdot \mathbf{K} \cdot (\boldsymbol{\xi}' - \boldsymbol{\lambda}) \right\} d\boldsymbol{\xi}' \quad (\text{B.1})$$

Predpokladajme, že hodnoty elementov matice \mathbf{K} sú dostatočne vysoké, aby platilo $\boldsymbol{\xi}(\mathbf{r}^N) \approx \boldsymbol{\lambda}$, respektíve, aby sa hodnota $\boldsymbol{\xi}(\mathbf{r}^N)$ počas celej simulácie nachádzala v okolí hodnôt parametru $\boldsymbol{\lambda}$. Rovnosť by sme dostali v limite $\{k_i\}_{i=1}^n \rightarrow \infty$, kde n zodpovedá dimenzií reakčnej koordináty. Na základe toho môžeme v rovnici (B.1) urobiť Taylorov rozvoj $\Phi(\boldsymbol{\xi})$, okolo hodnoty $\boldsymbol{\lambda}$ [9].

$$e^{-\beta F(\boldsymbol{\lambda})} = \int \exp \left\{ -\beta\Phi(\boldsymbol{\lambda}) - \frac{\beta}{2}(\boldsymbol{\xi} - \boldsymbol{\lambda}) \cdot \mathbf{K} \cdot (\boldsymbol{\xi} - \boldsymbol{\lambda}) \right\} \times \left\{ 1 - \beta\nabla\Phi(\boldsymbol{\lambda}) \cdot (\boldsymbol{\xi} - \boldsymbol{\lambda}) - \frac{\beta}{2}(\boldsymbol{\xi} - \boldsymbol{\lambda}) \cdot \mathbf{H}(\Phi)(\boldsymbol{\lambda}) \cdot (\boldsymbol{\xi} - \boldsymbol{\lambda}) + \frac{\beta^2}{2}[\nabla\Phi(\boldsymbol{\lambda}) \cdot (\boldsymbol{\xi} - \boldsymbol{\lambda})]^2 + \dots \right\} d\boldsymbol{\xi} \quad (\text{B.2})$$

Po integrácii a úprave vzťahu na pravej strane, kde $\mathbf{H}(\Phi)(\boldsymbol{\lambda})$ predstavuje Hessianu maticu $\Phi(\boldsymbol{\lambda})$, dostávame nasledujúcu závislosť:

$$e^{-\beta F(\boldsymbol{\lambda})} \approx e^{-\beta\Phi(\boldsymbol{\lambda})} \prod_{i=1}^n \sqrt{\frac{2\pi}{\beta k_i}} \left\{ 1 - \frac{1}{2}Tr(\mathbf{K}^{-1} \cdot \mathbf{H}(\Phi)(\boldsymbol{\lambda})) + \frac{\beta}{2}\nabla\Phi(\boldsymbol{\lambda}) \cdot \mathbf{K}^{-1} \cdot \nabla\Phi(\boldsymbol{\lambda}) \right\} \quad (\text{B.3})$$

Kde $Tr(\cdot)$ predstavuje operátor stopy. Vyššie príspevky zodpovedajúce $O(1/k_i^2)$ (ďalším nenulovým členom bude $\sim (\boldsymbol{\xi} - \boldsymbol{\lambda})^4$) v tomto vzťahu neuvádzame z priestorových dôvodov. V ďalšom kroku zoberieme logaritmus vzťahu (B.3), pričom logaritmus člena v zložených zátvorkách aproximujeme do prvého rádu Taylorovho rozvoja. Po invertovaní tohto vzťahu dostávame rovnicu:

$$\Phi(\boldsymbol{\lambda}) \approx F(\boldsymbol{\lambda}) + \frac{1}{2}\nabla F(\boldsymbol{\lambda}) \cdot \mathbf{K}^{-1} \cdot \nabla F(\boldsymbol{\lambda}) - \frac{1}{2\beta} \left[Tr(\mathbf{K}^{-1} \cdot \mathbf{H}(F)(\boldsymbol{\lambda})) + \sum_{i=1}^n \ln \frac{2\pi}{\beta k_i} \right] \quad (\text{B.4})$$

Vyššie príspevky sú, znova rádu $O(1/k_i^2)$. Nakoniec zoberme rozdiel $\Phi(\boldsymbol{\lambda}_f)$ a $\Phi(\boldsymbol{\lambda}_i)$ finálnej a počiatočnej polohy parametra $\boldsymbol{\lambda}$ (označený ako $\Delta\Phi$). Vďaka čomu sa zbavíme, členov $\ln(2\pi/\beta k_i)$, ktoré majú len konštantný charakter.

$$\begin{aligned} \Delta\Phi = \Delta F + \frac{1}{2}\nabla F(\boldsymbol{\lambda}_f) \cdot \mathbf{K}^{-1} \cdot \nabla F(\boldsymbol{\lambda}_f) - \frac{1}{2}\nabla F(\boldsymbol{\lambda}_i) \cdot \mathbf{K}^{-1} \cdot \nabla F(\boldsymbol{\lambda}_i) - \\ - \frac{1}{2\beta}Tr(\mathbf{K}^{-1} \cdot \mathbf{H}(\Delta F)) + O(1/k_i^2) \quad (\text{B.5}) \end{aligned}$$

Zo vzťahu (B.5) vidíme, že pre dostatočne veľké hodnoty parametrov $\{k_i\}_{i=1}^n$, budú príspevky prvých a vyšších derivácií $F(\boldsymbol{\lambda})$ zanedbateľné, čím dostávame takzvanú Stiff-spring aproximáciu (uvedenú v kapitole (2.2.1)), kedy platí $\Delta\Phi \approx \Delta F$ [8, 9].

Na koniec poznamenajme, že v prípade, že by sme chceli pracovať s absolútnym vzťahom $\Phi(\boldsymbol{\lambda})$ a $F(\boldsymbol{\lambda})$, si nemôžeme dovoliť zanedbať členy $\ln(2\pi/\beta k_i)$, aj keď vplývajú len na kvantitatívny charakter $\Phi(\boldsymbol{\lambda})$.

B.2 Stiff-spring aproximácia pre $(Ala)_{10}$

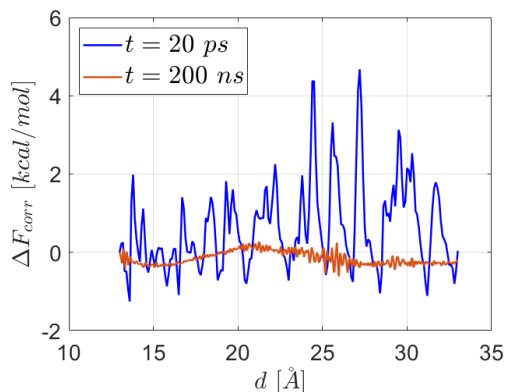
Ďalej sme overili platnosť stiff-spring aproximácie (uvedenej v kapitole (2.2.1)), v kontexte modelového systému $(Ala)_{10}$ vo vákuu pre $k = 7.2 \text{ kcal/mol/\AA}^2$ a pre najkratší simulačný čas $t = 20 \text{ ps}$, $n = 10000$, respektíve pre jeho najdlhšiu hodnotu $t = 200 \text{ ns}$ a $n = 1$ v prípade dopredných simulácií.

Ako testovacie dáta sme uvažovali $\langle \mathcal{W} \rangle_F$, ktoré mali najhoršie charakteristiky a teda aj najväčšiu pravdepodobnosť porušenia predpokladov na zanedbanie korekčných príspevkov.

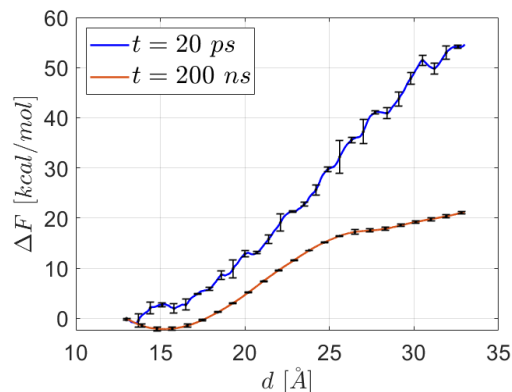
Graf (B.1) zobrazuje veľkosť korekčných členov ΔF_{corr} uvedených v rovnici (B.5).

Ako môžeme vidieť, v prípade $t = 20 \text{ ps}$ dosahuje tento príspevok maximálnu hodnotu o veľkosti $\approx 4.67 \text{ kcal/mol}$. Z hľadiska referenčného vývoja je táto korekcia vysoká (predstavuje až 21.96% maximálnej hodnoty), ale pokiaľ sa pozrieme na graf (B.2), kde dané korekcie uvádzame ako chybové úsečky na korešpondujúcom priebehu, tak vidíme, že z hľadiska presnosti spomínaného vývoja a jeho absolútnych hodnôt nie je až taká podstatná.

Na druhej strane, pokiaľ sa zameriame na priebeh, ktorý sme získali v prípade $t = 200 \text{ ns}$, teda na nami uvažovanú referenčnú závislosť, tak vidíme, že korekcie plynúce zo stiff-spring aproximácie môžeme bez problémov zanedbať a predpokladať platnosť $\Delta\Phi \approx \Delta F$.



Obr. B.1: Korekčné členy ΔF_{corr} stiff-spring aproximácie



Obr. B.2: Vývoj $\langle \mathcal{W} \rangle_F$ spolu s korekciami stiff-spring aprox.

Vzhľadom na to, že sme v tejto časti uvažovali dva hraničné prípady nami získaných výsledkov, môžeme usudzovať, že analogické závery platia aj pre všetky ostatné metódy a hodnoty parametrov n a t (a to, či už vo vákuu alebo vo vodnej obálke). Takže v priebehu našich simulácií môžeme predpokladať všeobecnú platnosť vzťahu $\Delta\Phi \approx \Delta F$.

Na koniec ešte uvedme, že v prípade simulácií o dĺžke $t = 200$ ns sme narazili na problém pri výpočte numerických derivácií. Konkrétne sme pozorovali, že ich hodnoty prudko oscilujú a o niekoľko rádov prevyšujú získané aproximácie ΔF . Avšak, takýto vývoj sme nepozorovali v prípade $t = 20$ ps, kde sa stredovalo cez $n = 10000$ trajektórií.

Analýzou dostupných výsledkov sme zistili, že toto správanie sa prejavuje len v prípade malého stredovania. Z toho sme usúdili, že jeho pôvod spočíva v nedostatočnom odstránení vplyvu zvyšných stupňov voľnosti systému, ktoré vnášajú do výsledného priebehu lokálne fluktuácie a zhoršujú výpočet numerickej derivácie. Pokiaľ je n dostatočne vysoké, dochádza k vystredovaniu týchto vplyvov, čo z teoretického hľadiska odpovedá vykonaniu integrácie vo vzťahu (2.36) pre výpočet potenciálu strednej sily Φ .

Z toho dôvodu sme na krivku o čase $t = 200$ ns aplikovali zhladenie pomocou Savitzkého–Golayovho filtra, ktorý bol schopný efektívne odstrániť prítomný šum. Celkový priebeh krivky nebol týmto zhladením ovplyvnený žiadnym pozorovateľným spôsobom, avšak výrazne sa zlepšila kvalita numerických derivácií.

C. Jensenova-Shannonova divergencia

Mieru, akou sa získané výsledky približujú k rovnovážnemu priebehu, môžeme analyticky charakterizovať takzvanou Jensen-Shannonovou divergenciou JSD popísanou rovnicou [12]:

$$JSD = \frac{1}{2} \int \mathcal{P}_F(\mathcal{W}) \ln \frac{2\mathcal{P}_F(\mathcal{W})}{\mathcal{P}_F(\mathcal{W}) + \mathcal{P}_R(-\mathcal{W})} + \mathcal{P}_R(-\mathcal{W}) \ln \frac{2\mathcal{P}_R(-\mathcal{W})}{\mathcal{P}_F(\mathcal{W}) + \mathcal{P}_R(-\mathcal{W})} d\mathcal{W} \quad (C.1)$$

Kde $\mathcal{P}_{F/R}(\pm\mathcal{W})$ označuje pravdepodobnostnú distribúciu hodnôt vykonanej práce v prípade dopredných, respektíve v prípade spätných simulácií. Táto veličina reprezentuje priemernú hodnotu informácie o tom, aká je orientácia časového vektora z jednej realizácie daného experimentu. V prípade plne nevratných simulácií, kedy je jednoduché rozlíšiť v akom smere plynie jej čas, je hodnota JSD maximálna a rovná $JSD_{max} = \ln 2$. Pokiaľ sú realizácie plne vratné, dochádza k strate tejto informácie a JSD nadobúda svoje minimum s hodnotou $JSD_{min} = 0$ [12].

V tabuľkách (C.1a) a (C.1b) uvádzame hodnoty Jensenovej-Shannonovej divergencie v prípade simulácií systému $(Ala)_{10}$ (vzhľadom k rôznym hodnotám simuláčného času t). Z týchto údajov je vidieť, že pre $t = 20$ ps a $t = 200$ ps pracujeme s plne nerovnovážnymi simuláciami, pričom tento charakter postupne klesá.

Simulácie vo vákuu pre $t = 20$ ns vykazujú už v podstate plne rovnovážny priebeh.

Na druhej strane je zaujímavé, že aj pre 200 ns simulácie vo vodnej obálke stále dostávame skoro 50% podiel nerovnovážneho charakteru. Napriek tomu, ale pozorujeme konvergenciu získaných aproximácií a veľmi dobrú zhodu s referenčnou krivkou (ktorá bola získaná zo simulácií o jeden rád pomalších).

Tabuľka C.1: Jensen-Shannonova divergencia hodnôt práce \mathcal{W}_{final}

| (a) Vákuum | | | (b) Vodná obálka | | |
|------------|-----------|-----------------|------------------|-----------|-----------------|
| t [ns] | JSD [] | $JSD/\ln 2$ [%] | t [ns] | JSD [] | $JSD/\ln 2$ [%] |
| 0.02 | 0,6931 | 100,00 | 0.20 | 0,6931 | 100,00 |
| 0.20 | 0,6774 | 97,73 | 2.0 | 0,6870 | 99,11 |
| 2.0 | 0,3741 | 53,97 | 20.0 | 0,5204 | 75,08 |
| 20.0 | 0,0395 | 5,70 | 200 | 0,3249 | 46,87 |

D. Tabuľky

D.1 Zoznam PDB štruktúr A_{2A} adenosínového receptoru

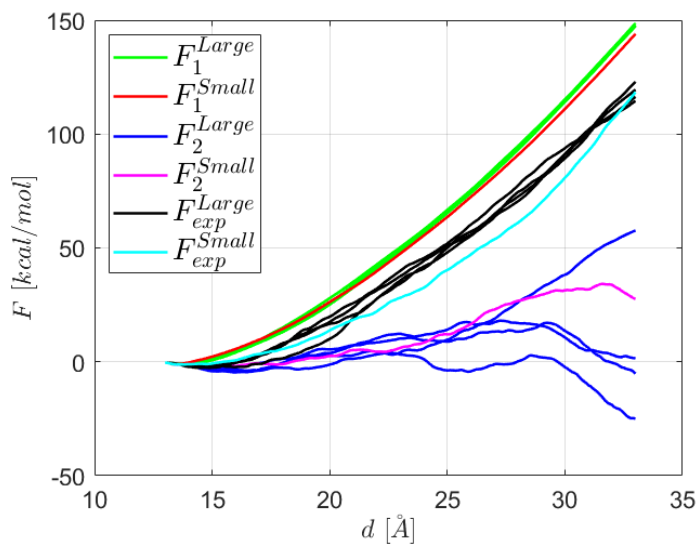
Tabuľka D.1: Zoznam PDB štruktúr A_{2A} adenosínového receptoru

| PDB kód | Ligand | Rok publikácie | Poznámka |
|---------|--------------|----------------|-------------------|
| 3EML | ZM241385 | 2008 | — |
| 2YDV | NECA | 2011 | Prechodný stav |
| 2YDO | Adenosine | 2011 | — |
| 3QAK | UK-432097 | 2011 | — |
| 3REY | XAC | 2011 | — |
| 3RFM | Caffeine | 2011 | — |
| 3PWH | ZMA | 2011 | — |
| 3VGA | ZMA | 2012 | Komplex s Fab2838 |
| 3VG9 | ZMA | 2012 | Komplex s Fab2838 |
| 3UZA | T4G | 2012 | — |
| 3UZC | T4E | 2012 | — |
| 4EIY | ZM241385 | 2012 | A2aAR-BRIL |
| 4UG2 | CGS21680 | 2015 | — |
| 4UHR | CGS21680 | 2015 | — |
| 5IU4 | ZM241385 | 2016 | A2AR-StaR2-bRIL |
| 5IU8 | 6DZ | 2016 | A2AR-StaR2-bRIL |
| 5IU7 | 6DY | 2016 | A2AR-StaR2-bRIL |
| 5IUB | 6DV | 2016 | A2AR-StaR2-bRIL |
| 5IUA | 6DX | 2016 | A2AR-StaR2-bRIL |
| 5G53 | NECA | 2016 | Plne aktívny stav |
| 5K2D | ZMA | 2016 | — |
| 5K2A | ZMA | 2016 | — |
| 5K2B | ZMA | 2016 | — |
| 5K2C | ZMA | 2016 | — |
| 5UIG | 8D1 | 2017 | — |
| 5UVI | ZMA | 2017 | — |
| 5JTB | ZMA | 2017 | A2aAR-StaR2-BRIL |
| 5MZJ | Theophylline | 2017 | A2aAR-StaR2-BRIL |
| 5MZP | Caffeine | 2017 | A2aAR-StaR2-BRIL |
| 5N2R | 8JN | 2017 | A2aAR-StaR2-BRIL |

| PDB kód | Ligand | Rok publikácie | Poznámka |
|---------|------------|----------------|-------------------|
| 5NLX | ZMA | 2017 | — |
| 5NM4 | ZMA | 2017 | — |
| 5VRA | ZMA | 2017 | — |
| 5NM2 | ZMA | 2017 | Cryo-EM štruktúra |
| 5WF5 | UKA | 2018 | D52N mutácia |
| 5WF6 | UKA | 2018 | S91A mutácia |
| 6AQF | ZM241385 | 2018 | A2aAR-bRIL |
| 5OLO | Tozadenant | 2018 | A2A-StaR2-bRIL562 |
| 5OM1 | T4E | 2018 | A2A-StaR2-bRIL562 |
| 5OLG | ZM241385 | 2018 | A2A-StaR2-bRIL562 |
| 5OLH | Vipadenant | 2018 | A2A-StaR2-bRIL562 |
| 5OLZ | T4E | 2018 | A2A-StaR2-bRIL562 |
| 5OM4 | T4E | 2018 | A2A-StaR2-bRIL562 |
| 5OLV | 9Y2 | 2018 | A2A-StaR2-bRIL562 |
| 6GDG | NECA | 2018 | Cryo-EM štruktúra |
| 6MH8 | ZMA | 2019 | — |
| 6JZH | ZM241385 | 2019 | — |
| 6PS7 | ZMA | 2019 | — |
| 6S0L | ZMA | 2020 | — |
| 6S0Q | ZMA | 2020 | — |
| 6ZDR | QGE | 2020 | A2AR-StaR2-bRIL |
| 6GT3 | AZD4635 | 2020 | A2A-StaR2-bRIL562 |
| 6ZDV | QGW | 2020 | A2AR-StaR2-bRIL |
| 6WQA | ZMA | 2020 | — |
| 6LPK | ZMA | 2020 | — |
| 6LPJ | ZMA | 2020 | — |
| 6LPL | ZMA | 2020 | — |
| 7ARO | RVZ | 2021 | — |
| 7RM5 | ZMA | 2021 | — |

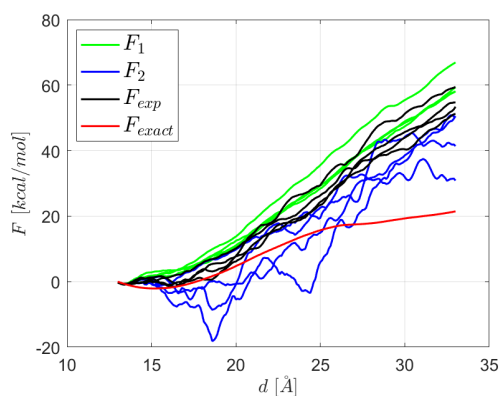
E. Grafy a obrázky

E.1 Testovacia simulácia $(Ala)_{10}$ pre malú simulačnú bunku

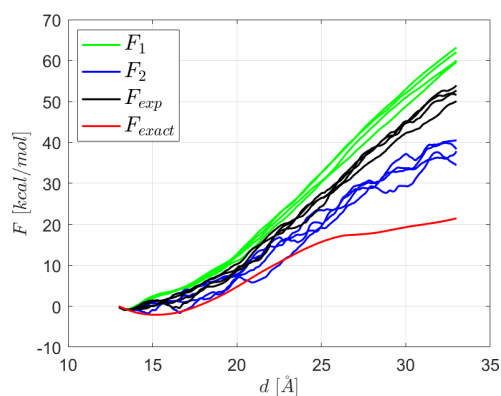


Obr. E.1: Porovnanie vývoja ΔF pre rôzne simulačné bunky

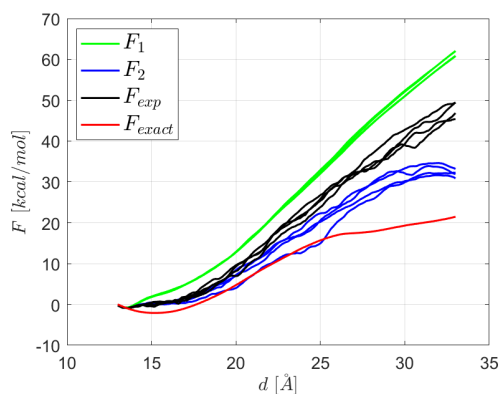
E.2 Vývoj ΔF dopředných simulací $(Ala)_{10}$ vo vákuu



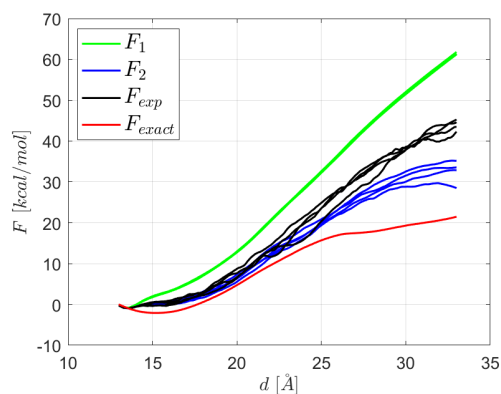
Obr. E.2: Vývoj aproximací ΔF pre $t = 20$ ps a $n = 10$



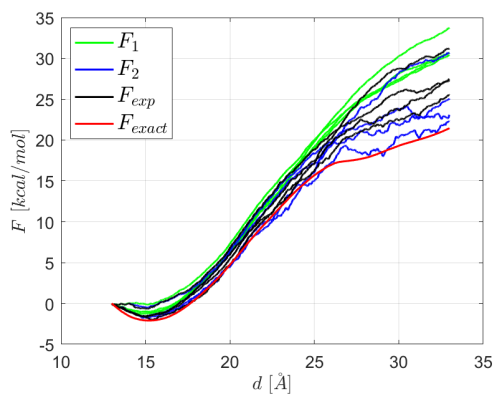
Obr. E.3: Vývoj aproximací ΔF pre $t = 20$ ps a $n = 100$



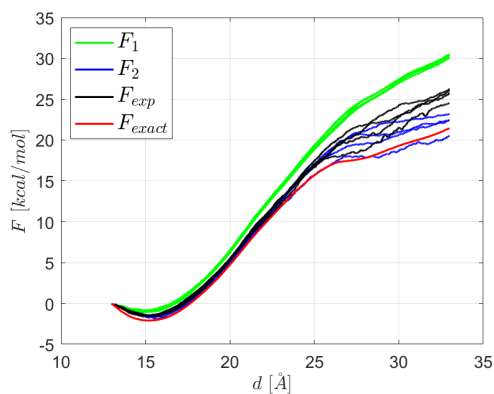
Obr. E.4: Vývoj aproximací ΔF pre $t = 20$ ps a $n = 1000$



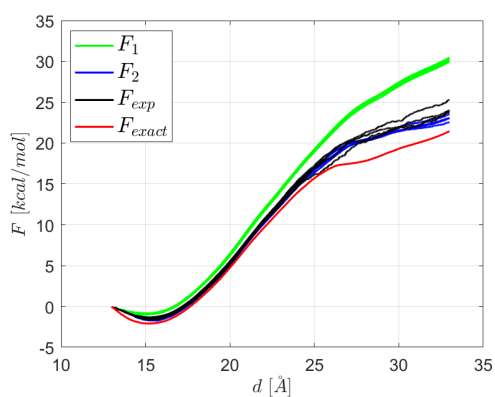
Obr. E.5: Vývoj aproximací ΔF pre $t = 20$ ps a $n = 10000$



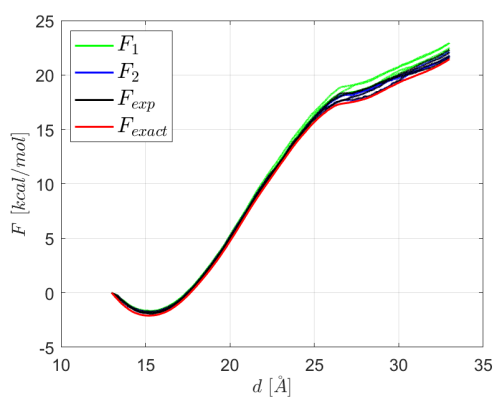
Obr. E.6: Vývoj aproximácií ΔF pre $t = 200$ ps a $n = 10$



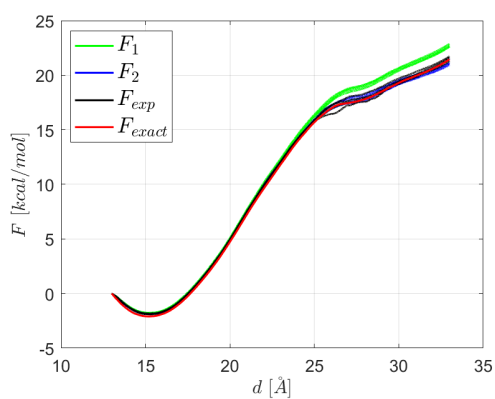
Obr. E.7: Vývoj aproximácií ΔF pre $t = 200$ ps a $n = 100$



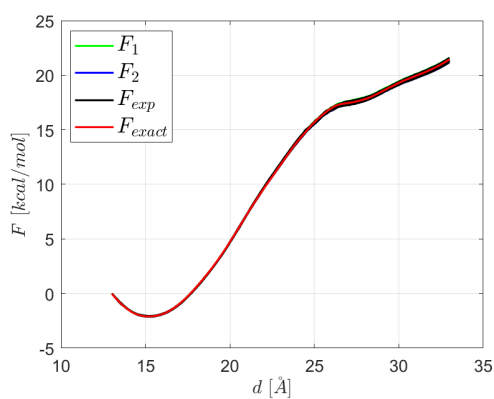
Obr. E.8: Vývoj aproximácií ΔF pre $t = 200$ ps a $n = 1000$



Obr. E.9: Vývoj aproximácií ΔF pre $t = 2$ ns a $n = 10$

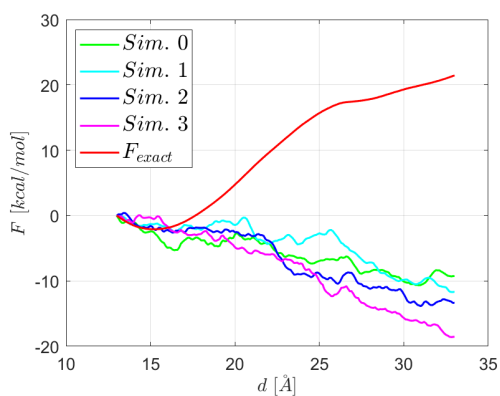


Obr. E.10: Vývoj aproximácií ΔF pre $t = 2$ ns a $n = 100$

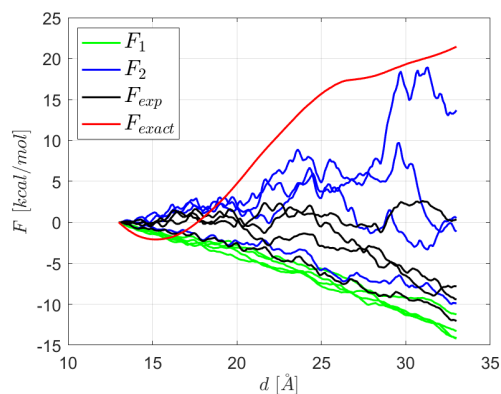


Obr. E.11: Vývoj aproximácií ΔF pre $t = 20$ ns a $n = 10$

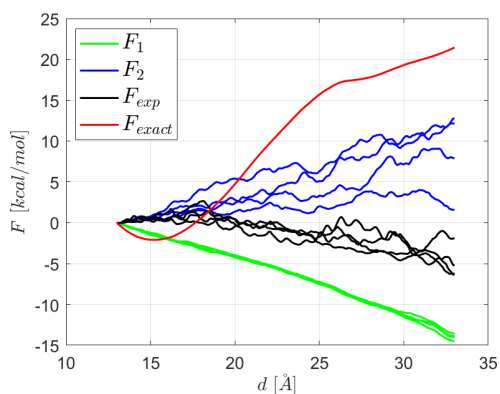
E.3 Vývoj ΔF spätných simulácií $(Ala)_{10}$ vo vákuu



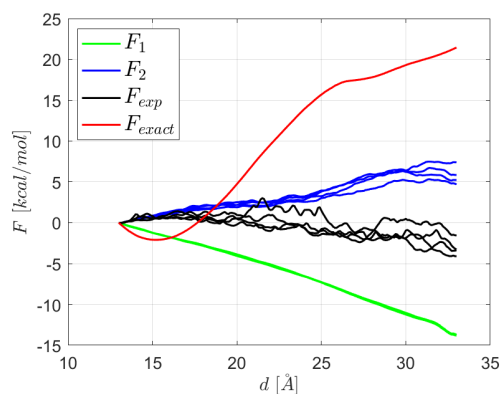
Obr. E.12: Vývoj počas 20 ps simulácií



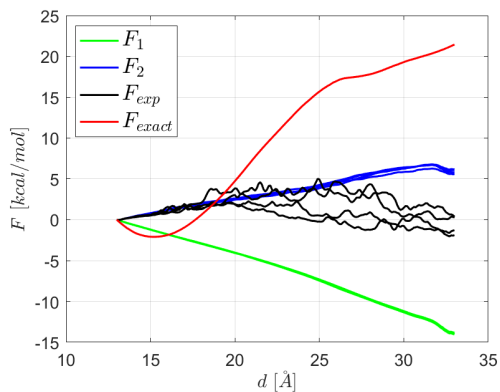
Obr. E.13: Vývoj aproximácií ΔF pre $t = 20$ ps a $n = 10$



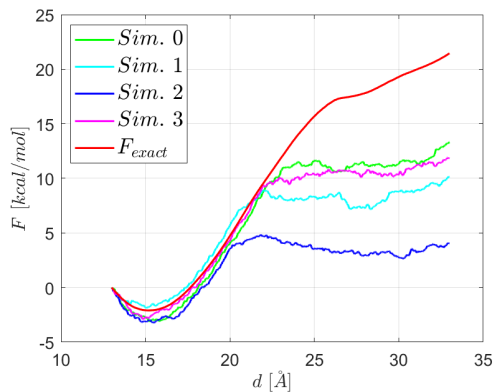
Obr. E.14: Vývoj aproximácií ΔF pre $t = 20$ ps a $n = 100$



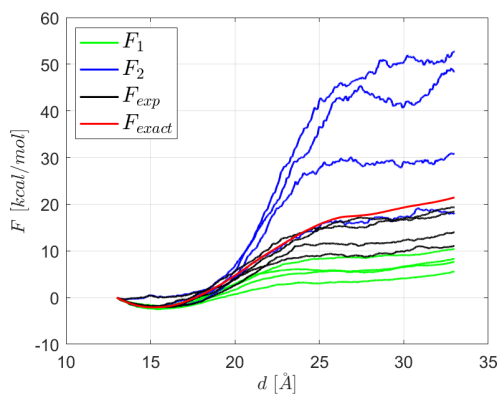
Obr. E.15: Vývoj aproximácií ΔF pre $t = 20$ ps a $n = 1000$



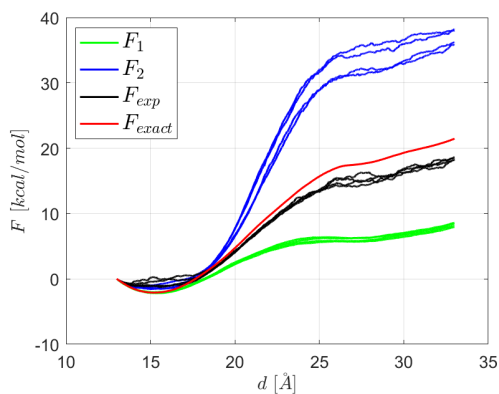
Obr. E.16: Vývoj aproximací ΔF pre $t = 20$ ps a $n = 10000$



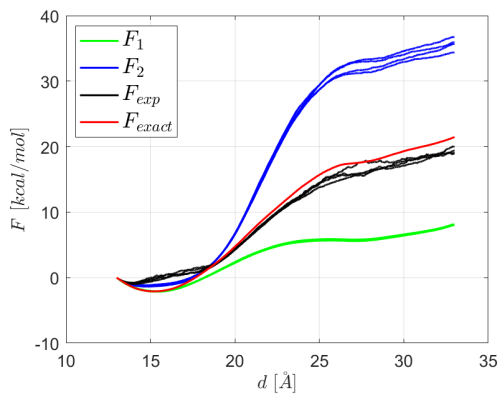
Obr. E.17: Vývoj počas 200 ps simulácií



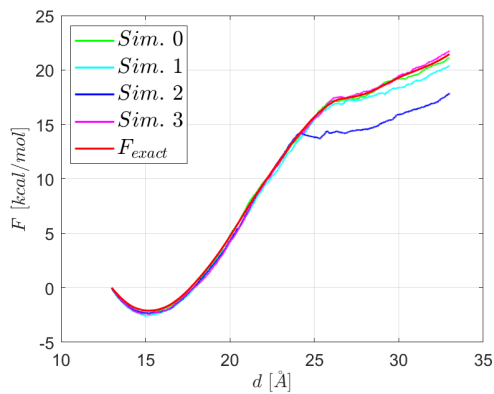
Obr. E.18: Vývoj aproximací ΔF pre $t = 200$ ps a $n = 10$



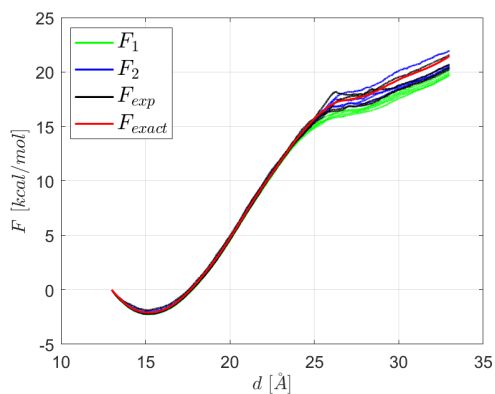
Obr. E.19: Vývoj aproximací ΔF pre $t = 200$ ps a $n = 100$



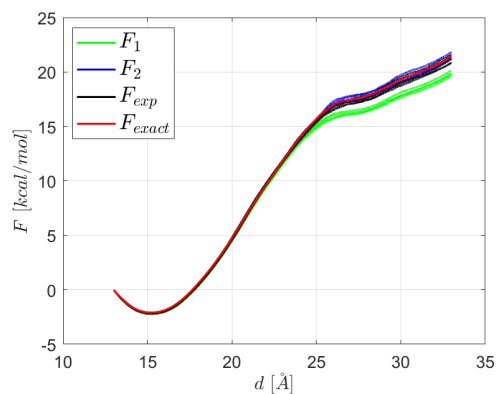
Obr. E.20: Vývoj aproximací ΔF pre $t = 200$ ps a $n = 1000$



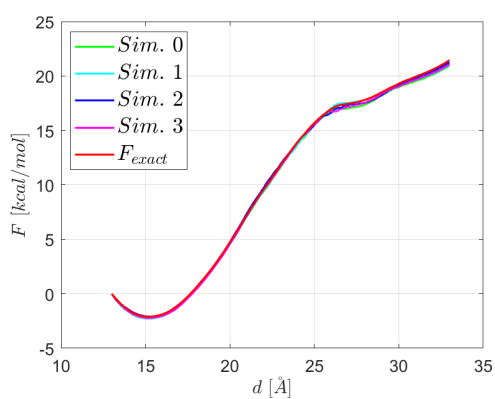
Obr. E.21: Vývoj počas 2 ns simulácií



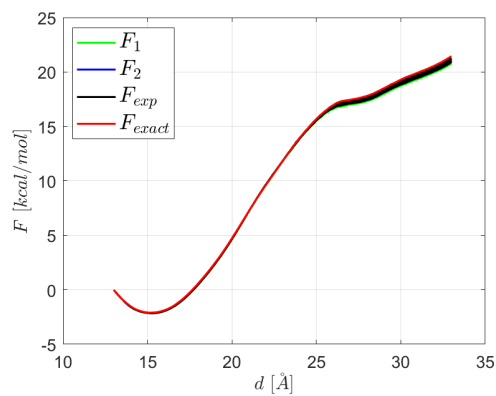
Obr. E.22: Vývoj aproximácií ΔF pre $t = 2$ ns a $n = 10$



Obr. E.23: Vývoj aproximácií ΔF pre $t = 2$ ns a $n = 100$

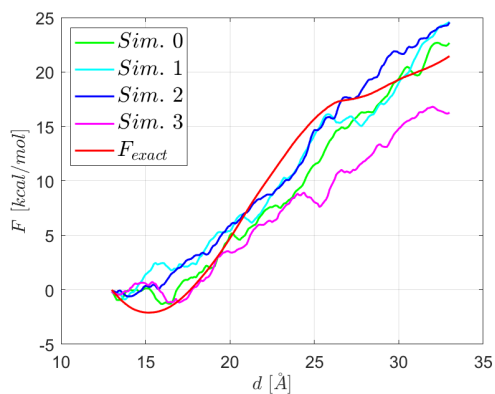


Obr. E.24: Vývoj počas 20 ns simulácií

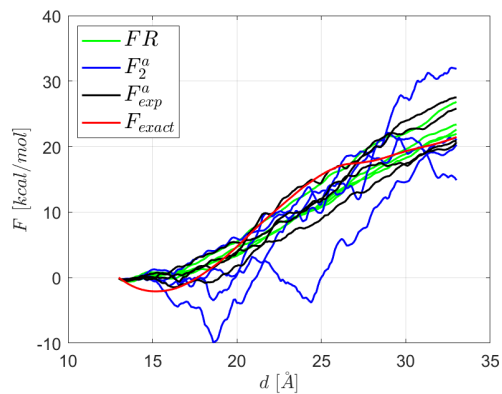


Obr. E.25: Vývoj aproximácií ΔF pre $t = 20$ ns a $n = 10$

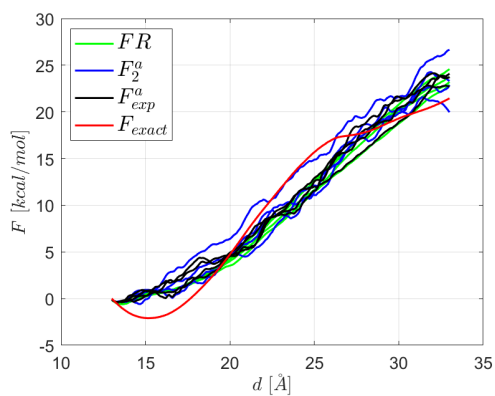
E.4 FR metóda pre $(Ala)_{10}$ vo vákuu



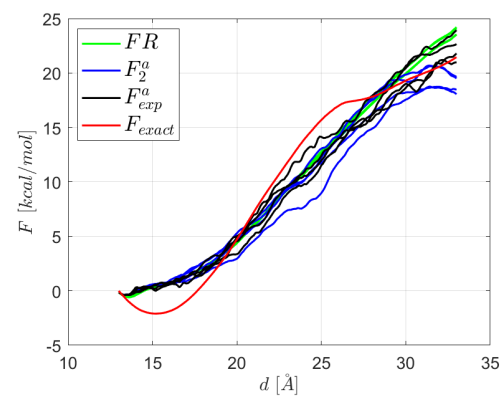
Obr. E.26: Vývoj počas 20 ps simulácií



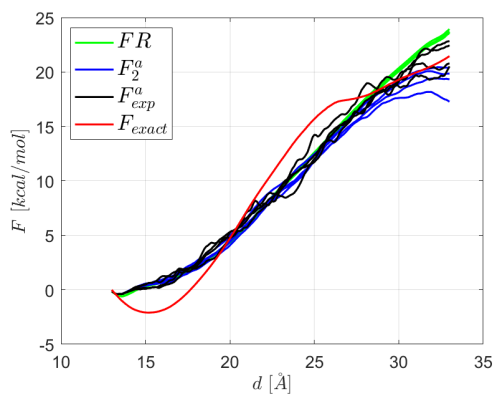
Obr. E.27: Vývoj aproximácií ΔF pre $t = 20$ ps a $n = 10$



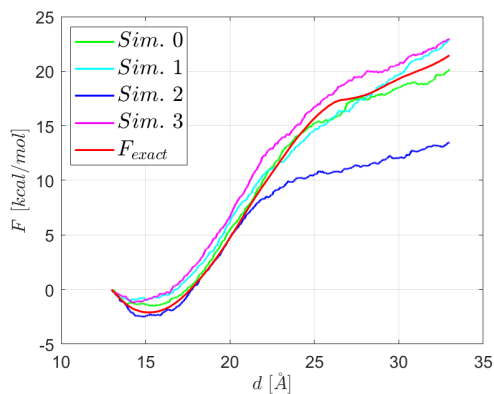
Obr. E.28: Vývoj aproximácií ΔF pre $t = 20$ ps a $n = 100$



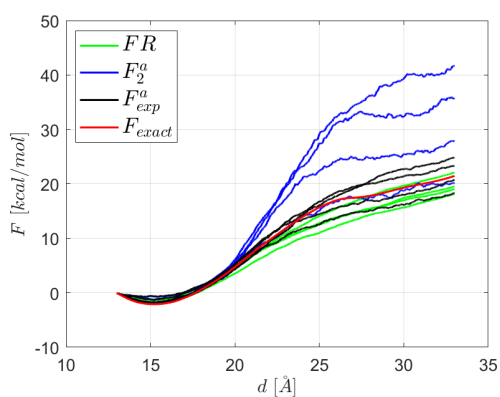
Obr. E.29: Vývoj aproximácií ΔF pre $t = 20$ ps a $n = 1000$



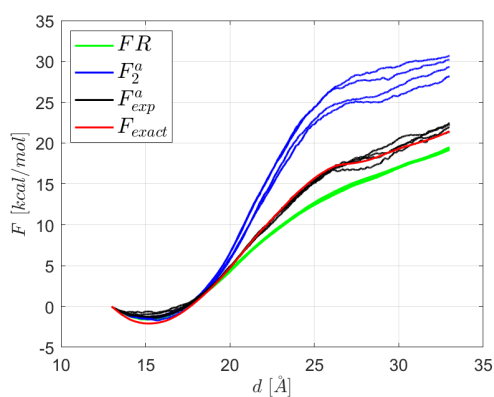
Obr. E.30: Vývoj aproximací ΔF pre $t = 20$ ps a $n = 10000$



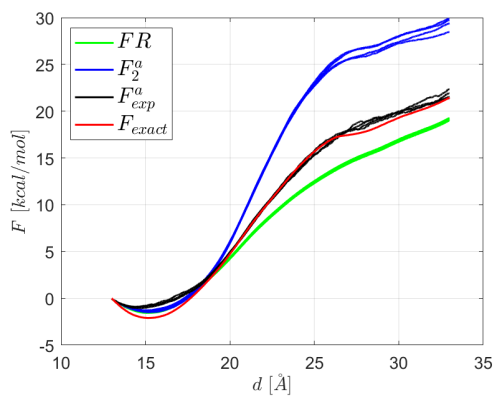
Obr. E.31: Vývoj počas 200 ps simulácií



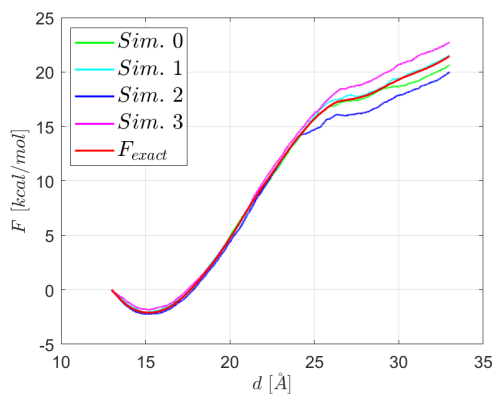
Obr. E.32: Vývoj aproximací ΔF pre $t = 200$ ps a $n = 10$



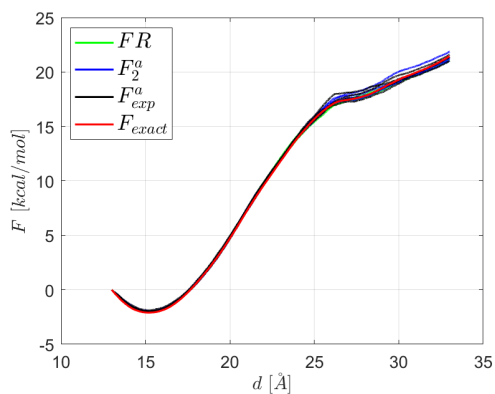
Obr. E.33: Vývoj aproximací ΔF pre $t = 200$ ps a $n = 100$



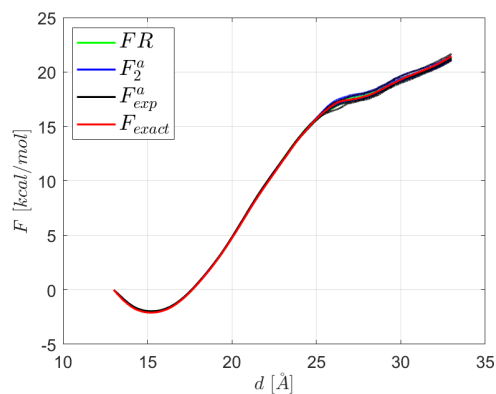
Obr. E.34: Vývoj aproximací ΔF pre $t = 200$ ps a $n = 1000$



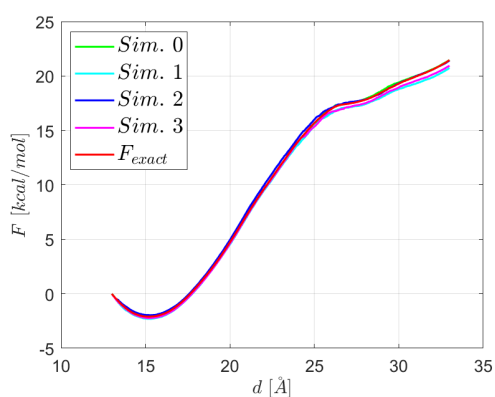
Obr. E.35: Vývoj počas 2 ns simulácií



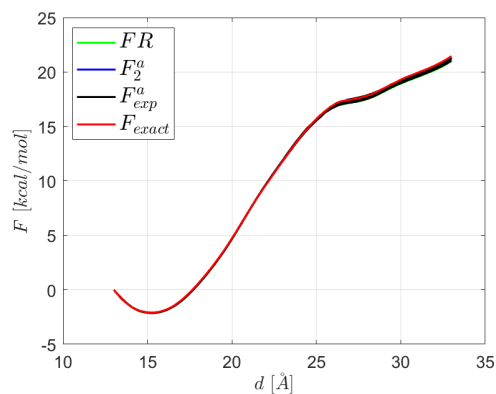
Obr. E.36: Vývoj aproximácií ΔF pre $t = 2$ ns a $n = 10$



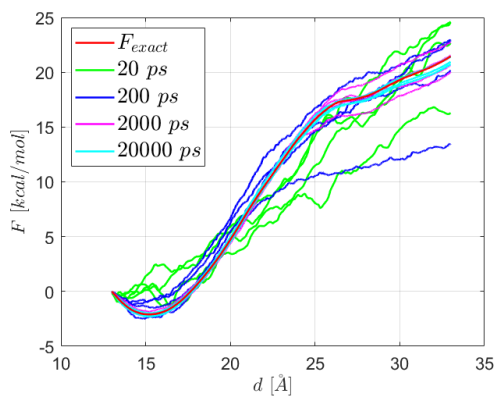
Obr. E.37: Vývoj aproximácií ΔF pre $t = 2$ ns a $n = 100$



Obr. E.38: Vývoj počas 20 ns simulácií

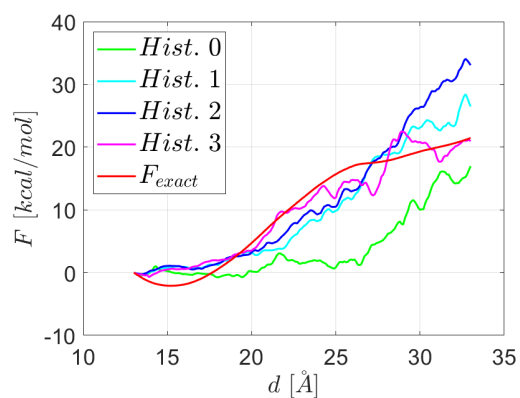


Obr. E.39: Vývoj aproximácií ΔF pre $t = 20$ ns a $n = 10$

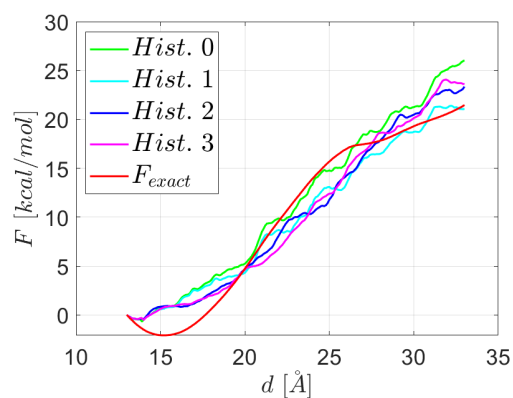


Obr. E.40: Porovnanie simulácií pre rôzne časy s F_{exact}

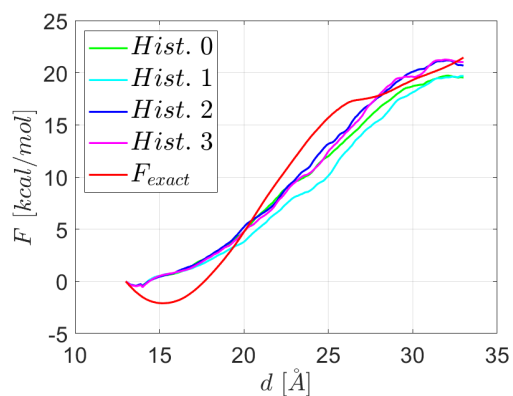
E.5 Metóda prieniku histogramov pre $(Ala)_{10}$ vo vákuu



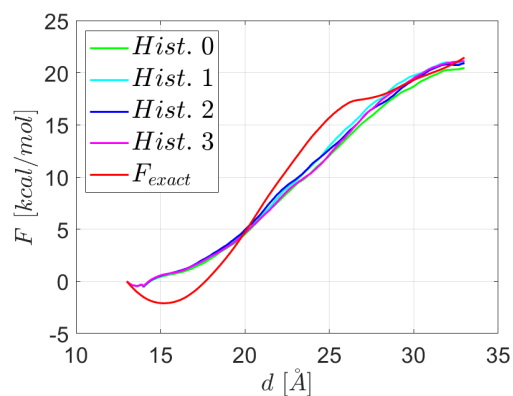
Obr. E.41: Vývoj aproximácií ΔF pre $t = 20$ ps a $n = 10$



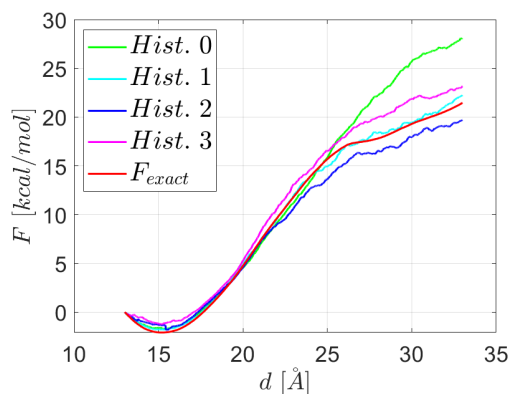
Obr. E.42: Vývoj aproximácií ΔF pre $t = 20$ ps a $n = 100$



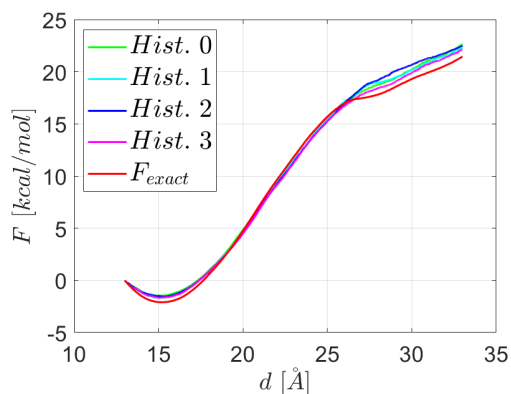
Obr. E.43: Vývoj aproximácií ΔF pre $t = 20$ ps a $n = 1000$



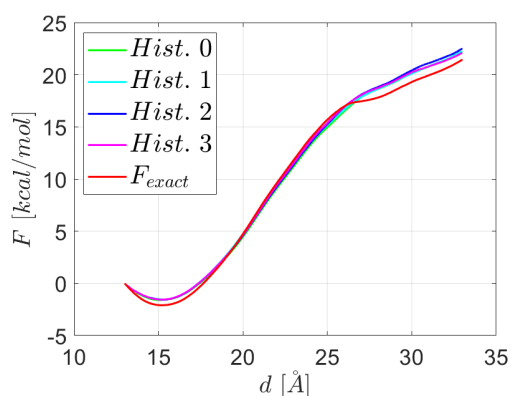
Obr. E.44: Vývoj aproximácií ΔF pre $t = 20$ ps a $n = 10000$



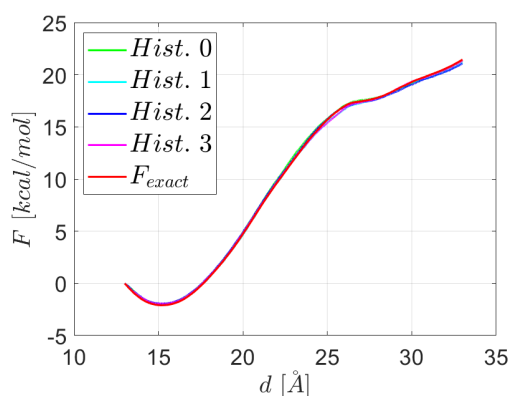
Obr. E.45: Vývoj aproximací ΔF pre $t = 200$ ps a $n = 10$



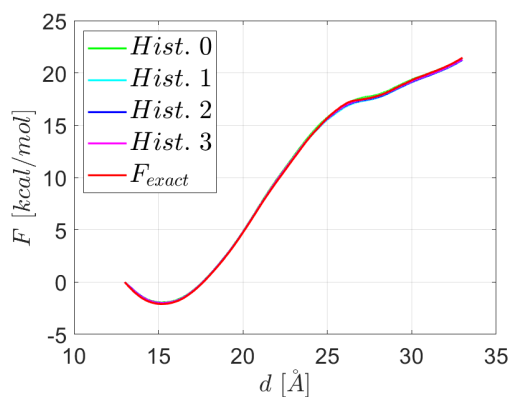
Obr. E.46: Vývoj aproximací ΔF pre $t = 200$ ps a $n = 100$



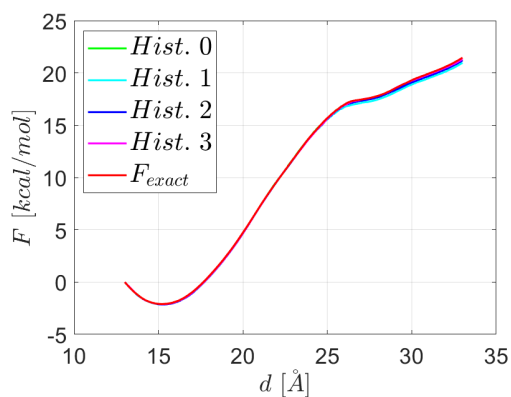
Obr. E.47: Vývoj aproximací ΔF pre $t = 200$ ps a $n = 1000$



Obr. E.48: Vývoj aproximací ΔF pre $t = 2$ ns a $n = 10$

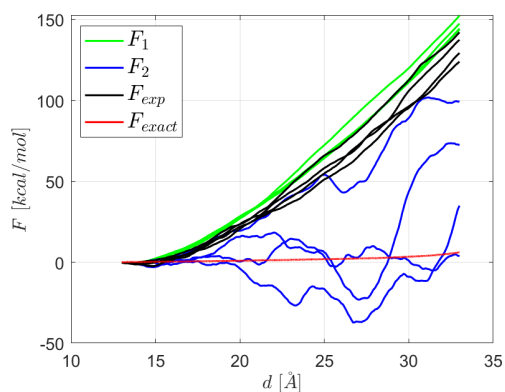


Obr. E.49: Vývoj aproximací ΔF pre $t = 2$ ns a $n = 100$

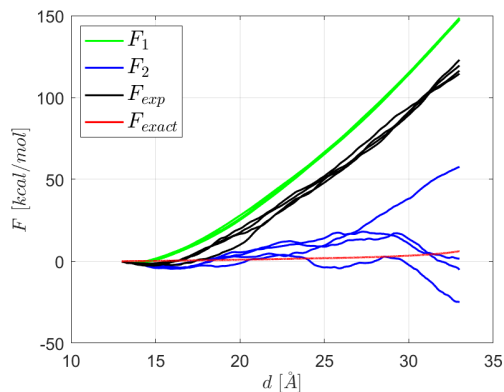


Obr. E.50: Vývoj aproximací ΔF pre $t = 20$ ns a $n = 10$

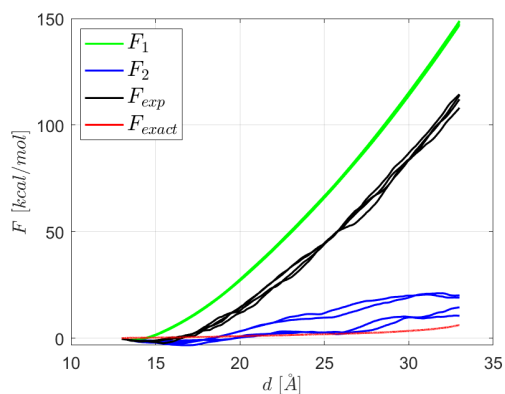
E.6 Vývoj ΔF dopředných simulací $(Ala)_{10}$ vo vodnej obálke



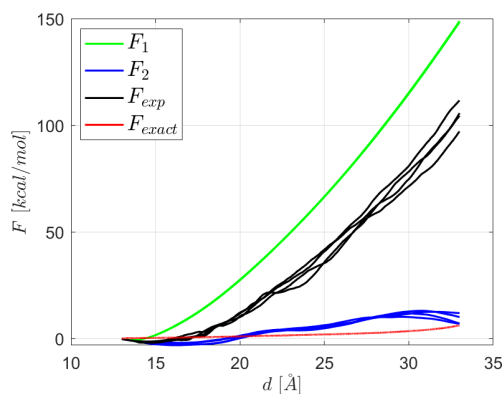
Obr. E.51: Vývoj aproximácií ΔF pre $t = 20$ ps a $n = 10$



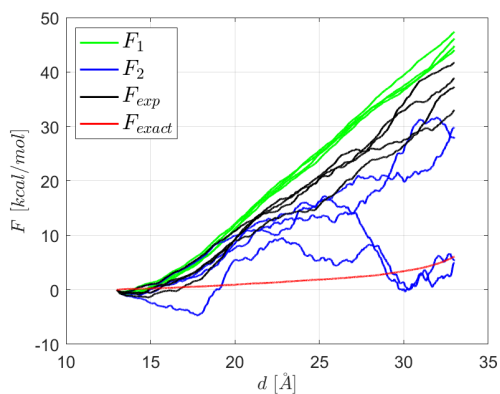
Obr. E.52: Vývoj aproximácií ΔF pre $t = 20$ ps a $n = 100$



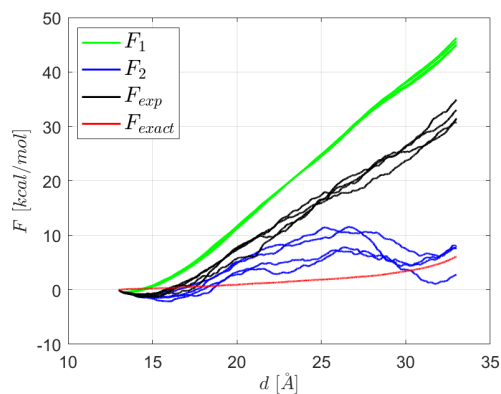
Obr. E.53: Vývoj aproximácií ΔF pre $t = 20$ ps a $n = 1000$



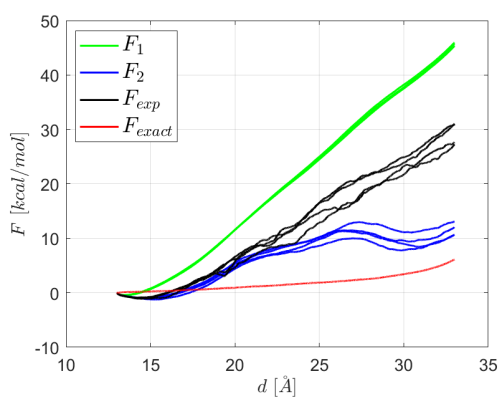
Obr. E.54: Vývoj aproximácií ΔF pre $t = 20$ ps a $n = 10000$



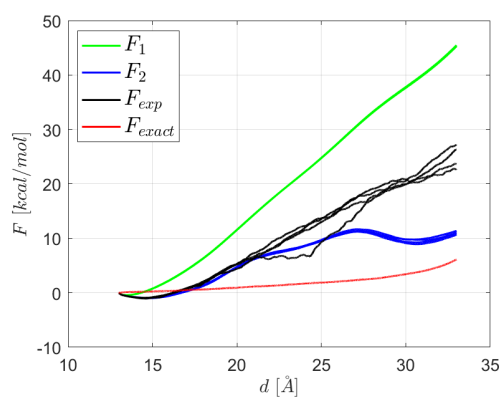
Obr. E.55: Vývoj aproximací ΔF pre $t = 200$ ps a $n = 10$



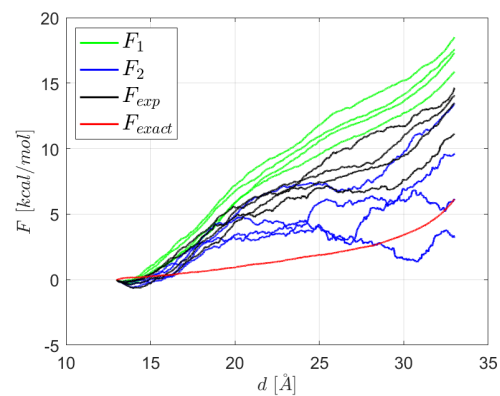
Obr. E.56: Vývoj aproximací ΔF pre $t = 200$ ps a $n = 100$



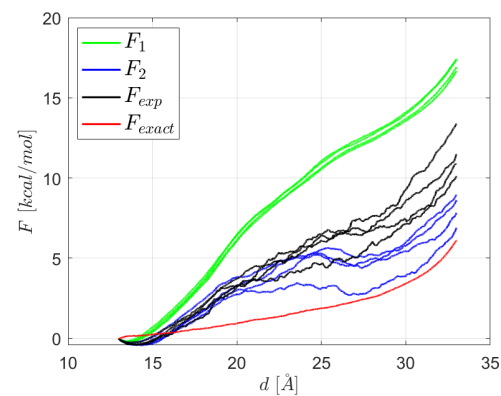
Obr. E.57: Vývoj aproximací ΔF pre $t = 200$ ps a $n = 1000$



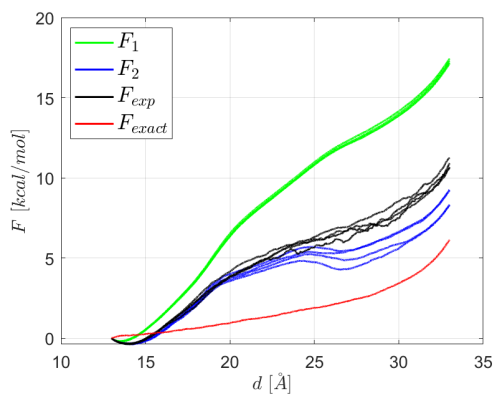
Obr. E.58: Vývoj aproximací ΔF pre $t = 200$ ps a $n = 10000$



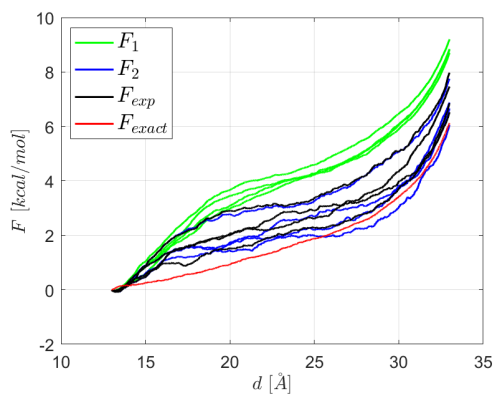
Obr. E.59: Vývoj aproximací ΔF pre $t = 2$ ns a $n = 10$



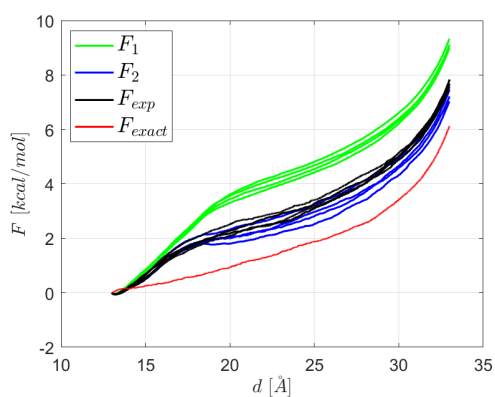
Obr. E.60: Vývoj aproximací ΔF pre $t = 2$ ns a $n = 100$



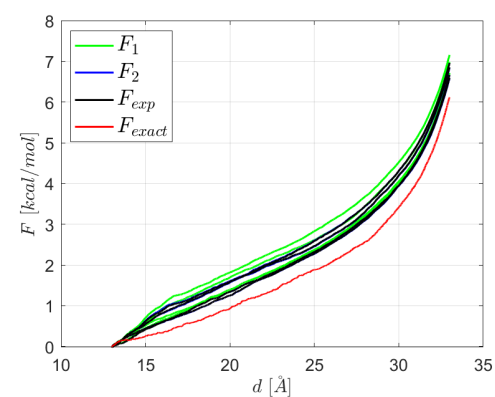
Obr. E.61: Vývoj aproximací ΔF pre $t = 2$ ns a $n = 1000$



Obr. E.62: Vývoj aproximací ΔF pre $t = 20$ ns a $n = 10$



Obr. E.63: Vývoj aproximací ΔF pre $t = 20$ ns a $n = 100$



Obr. E.64: Vývoj aproximací ΔF pre $t = 200$ ns a $n = 10$