

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

**Analýzy vlivu cholesterolu na vlastnosti  
biomembrán pomocí molekulového  
modelování**

Michaela Kajšová



---

Zlín 2014



GYMNÁZIUM ZLÍN-LESNÍ ČTVRŤ

---

# **STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST**

**Obor SOČ: 03 chemie**

## **Analýzy vlivu cholesterolu na vlastnosti biomembrán pomocí molekulového modelování**

**Autor: Michaela Kajšová**

**Škola: Gymnázium Zlín, Lesní čtvrť 1364**

**Vedoucí práce Mgr. Markéta Paloncýová**

**Zlín 2014**

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem svou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Markéty Paloncýové, použila jsem pouze podklady uvedené v příloženém seznamu a postup při zpracování a dalším nakládání s prací je v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) v platném znění.

V..... dne ..... podpis: .....

## **Poděkování.**

Chtěla bych poděkovat vedoucí mé práce Mgr. Markétě Paloncýové, bez které by tato práce nemohla vzniknout. Zaslíbila mě do problému, trpělivě vysvětlovala vše, co bylo nutné, odpovídala na mé otázky, poskytovala zpětnou vazbu a trávila se mnou hodiny času, za což jí patří velký dík.

Dále bych chtěla poděkovat PřF Univerzity Palackého v Olomouci, konkrétně katedře fyzikální chemie, kde práce vznikala.

V neposlední řadě patří dík Gymnáziu Zlín - Lesní čtvrť a učitelům, kteří mě již několik let podporují.

# ANOTACE

Buněčné membrány jsou velice pestrá a zároveň důležitou strukturou na povrchu buněk. Skládají se převážně z lipidů, proteinů a sacharidů. Jednou z důležitých molekul, kterou obsahují membrány živočichů, je cholesterol, jehož vliv zkoumá i tato práce. Díky molekulárně dynamickým simulacím, za použití softwarového balíčku GROMACS a silového pole Berger, byly studovány vlastnosti buněčných membrán složených ze tří typů lipidů - DPPC, DOPC, Ceramidů 2 a cholesterolu. Vytvořené membrány obsahují určité množství cholesterolu (od 0 až po 50 mol %) a jejich simulace trvají 200 ns. Rozdíly mezi jednotlivými membránami jsou popsány právě v závislosti na množství cholesterolu, které se v nich vyskytuje. Pro popis odlišností mezi membránami byly použity analýzy plochy a objemu potřebného pro jeden lipid, tloušťky membrány, hustoty systému a radiální distribuční funkce. Výsledky ukazují, že membrány vystavěné bez cholesterolu se svými vlastnostmi liší a reprezentují tudíž vlastnosti konkrétního lipidu. Při přidávání cholesterolu se tyto rozdíly postupně stírají a membrány se sobě podobají. Obzvláště patrný je tento vliv u DOPC a DPPC, které se v buněčných membránách vyskytují nejvíce. Změny vlastností membrány mají významný vliv na funkci buněk a tato práce ukazuje na atomární úrovni, že extrémní nadbytek či nedostatek cholesterolu v těle může ovlivňovat každou jednotlivou buňku.

Klíčová slova: DPPC, DOPC, Ceramid 2, cholesterol, lipidová dvojvrstva, molekulová dynamika

## OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD.....</b>	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>CÍL PRÁCE.....</b>	<b>8</b>
<b>3</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST.....</b>	<b>9</b>
3.1	BUNĚČNÉ MEMBRÁNY .....	9
3.1.1	Struktura membrán .....	9
3.1.2	Složení membrán .....	10
3.1.2.1	Lipidy .....	10
3.1.2.2	Proteiny .....	12
3.1.2.3	Sacharidy .....	13
3.1.3	Vlastnosti membrán .....	13
3.1.3.1	Dvojvrstva a její vznik .....	13
3.1.3.2	Pohyby lipidů v rámci membrány .....	14
3.1.3.3	Fluidita neboli tekutost membrány.....	15
3.2	POČÍTAČOVÉ SIMULACE (MOLEKULOVÉ MODELOVÁNÍ) .....	16
3.2.1	Molekulová mechanika.....	16
3.2.1.1	Silové pole.....	17
3.2.2	Molekulová dynamika .....	17
<b>4</b>	<b>METODIKA.....</b>	<b>19</b>
4.1	PROGRAMY A SOUBORY .....	19
4.2	SIMULAČNÍ BOXY.....	19
4.2.1	Molekuly v simulačním boxu .....	20
4.2.1.1	DOPC (C <sub>44</sub> H <sub>84</sub> NO <sub>8</sub> P – 1,2-Dioleoylglycerol-3-phosphodyleholine) ..	21
4.2.1.2	DPPC (C <sub>40</sub> H <sub>80</sub> NO <sub>8</sub> P, 1,2-Dipalmitoyl-3-sn-phosphatidyleholine) .....	21
4.2.1.3	Ceramid 2 (C <sub>42</sub> H <sub>83</sub> NO <sub>3</sub> , N-lignoceroyl-D-erythro-sphingosine) .....	22
4.2.1.4	Cholesterol .....	22
4.2.2	Vytvoření simulace .....	22
4.2.3	Podmínky, silové pole .....	23
4.2.4	Vizualizace .....	23
4.2.5	Analýzy.....	23
4.2.5.1	Plocha potřebná pro jeden lipid (Area per lipid).....	23
4.2.5.2	Objem potřebný pro jeden lipid (Volume per lipid) .....	24
4.2.5.3	Hustota jednotlivých skupin v boxu (Density).....	24
4.2.5.4	Vzdálenost atomů (tloušťka membrány).....	25
4.2.5.5	RDF (Radiální distribuční funkce).....	26
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>29</b>
5.1	VIZUALIZACE.....	29
5.1.1	Membrány DOPC .....	29
5.1.2	Membrány DPPC.....	30
5.1.3	Membrány Ceramidu 2 .....	31
5.2	PLOCHA POTŘEBNÁ PRO JEDEN LIPID .....	31
5.3	HUSTOTA ATOMŮ.....	32
5.3.1	Cholesterol.....	32
5.3.2	Všechny lipidy .....	33
5.3.3	Největší hustoty celého systému.....	34
5.3.4	Největší hustoty všech lipidů v membráně.....	34

5.4	OBJEM POTŘEBNÝ PRO JEDEN LIPID (VOLUME PER LIPID) .....	35
5.5	VZDÁLENOST ATOMŮ (TLOUŠŤKA MEMBRÁNY) .....	36
5.6	RDF (RADIÁLNÍ DISTRIBUČNÍ FUNKCE) .....	36
5.6.1	Vztah atomů v hydrofilních hlavách fosfolipidů (atomy fosforu nebo atomy dusíku) .....	36
5.6.2	Vztah atomů fosforu/dusíku k molekulám vody .....	37
<b>6</b>	<b>ZÁVĚR A DISKUZE</b> .....	<b>38</b>
<b>7</b>	<b>REFERENCE</b> .....	<b>39</b>
<b>8</b>	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ A GRAFŮ</b> .....	<b>42</b>
<b>9</b>	<b>SEZNAM PŘÍLOH</b> .....	<b>44</b>

## SEZNAM ZKRATEK

DOPC	1,2-Dioleoylglycerol-3-phosphodolcholine
DPPC	1,2-Dipalmitoyl-3-sn-phosphatidylcholine
Ceramid 2	N-lignoceroyl-D-erythro-sphingosine
mol %	molární zlomek (procentuální zastoupení molekul v systému, procenta jsou molární, ne hmotnostní)
MM	molekulová mechanika
MD	molekulová dynamika





## 1 ÚVOD

Tato práce se zabývá vlastnostmi buněčných membrán v závislosti na množství cholesterolu, který se v nich vyskytuje. Buněčné membrány se nacházejí na povrchu buněk i na povrchu některých buněčných organel. Umožňují přechod látek z vnitřního do vnějšího prostředí buňky a naopak, komunikaci buněk s okolím a udržují obsah buňky pohromadě.

Buněčné membrány jsou zkoumány již několik desítek let. Jsou pestrá strukturou, ve které se nachází spousta druhů molekul s různými funkcemi, převážně lipidy a proteiny. Stavba, vlastnosti i funkce jednotlivých molekul ovlivňují vlastnosti celé membrány. Jednou z těchto významných molekul je i cholesterol, který je i přes svou špatnou pověst v membránách nezbytný. Napomáhá udržovat její strukturu i vlastnosti.

Zkoumání biomembrán probíhá experimentálně (např. fluorescenčními metodami, NMR spektroskopii nebo i elektronovou mikroskopií), ale i teoreticky. V dnešní době se stále výkonnějšími počítači můžeme studovat biomembrány pomocí simulací, které napodobují chování jednotlivých molekul a systémů, a získat tak výsledky, které by v praxi byly téměř nezměřitelné. Výsledky z těchto simulací nám ukazují chování systémů na atomární úrovni a zároveň poskytují údaje o pohybu molekul s femtosekundovým rozlišením. Výzkum v této oblasti se neustále posouvá dopředu a směřuje k lepšímu pochopení biochemických procesů.

Vlastnosti membrán se studují převážně na jednosložkových umělých dvojvrstvách, stále více zájmu ovšem vzbuzují membrány smíšené. Bylo zjištěno, že přítomnost cholesterolu významně ovlivňuje vlastnosti membrán [1]. Nicméně výsledky se různí, na schopnost cholesterolu ovlivňovat membránu má vliv třeba také umístění dvojnás vazby v lipidickém řetězci [2].



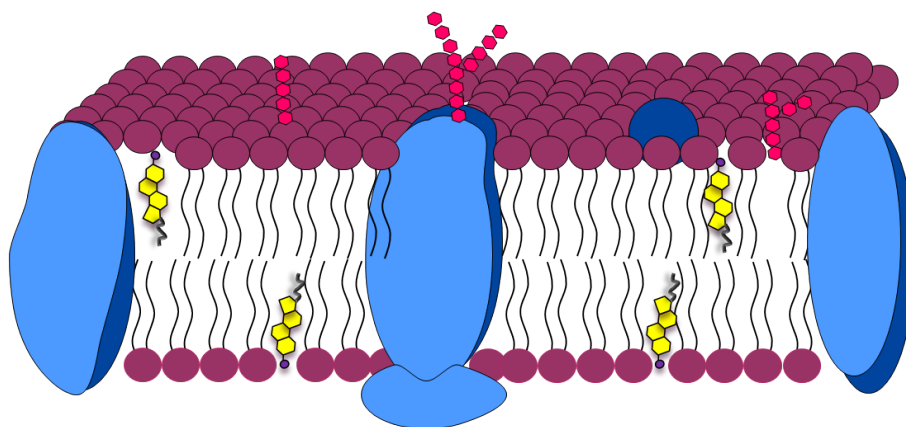
## 2 CÍL PRÁCE

Cílem této práce je určit, jak cholesterol ovlivňuje lipidovou dvojvrstvu, která je základním stavebním kamenem membrán. Dále porovnááme chování jednotlivých membrán s cholesterolem podle toho, kolik molárních procent cholesterolu se v nich vyskytuje. Pro simulace byly vytvořeny membrány z tří různých lipidů, z dvou fosfatidylcholinů s nasycenými a nenasycenými řetězci a Ceramidu 2. Analyzujeme tudíž, jak cholesterol ovlivňuje membrány v závislosti na lipidu, ze kterého jsou vytvořeny.

### 3 TEORETICKÁ ČÁST

#### 3.1 Buněčné membrány

Všechny živé organismy mají na povrchu svých buněk tenkou vrstvu tzv. plazmatickou membránu, která odděluje vnitřní a vnější prostředí buňky. Díky ní nedochází ke smíchání obsahu buňky (cytoplazmy a organel) s okolím. Při růstu buňky se zvětšuje i membrána, aniž by ztratila celistvost. Do membrány jsou v průběhu života přidávány nové membránové složky (lipidy, proteiny atd.), které jsou zde dopravovány ve váčcích z endoplazmatického retikula. Díky své struktuře se membrána při růstu netrhá, jakékoliv poškození se rychle zacelí. Eukaryotní organismy nemají na rozdíl od nejjednodušších bakterií pouze cytoplazmatickou membránu na povrchu buňky, ale i některé jejich orgány jsou tvořeny membránami (endoplazmatické retikulum, Golgiho aparát, vakuoly, lysozomy). Všechny buněčné membrány mají stejnou obecnou strukturu a vykazují selektivní permeabilitu (polopropustnost). Membrána totiž umožňuje živinám vstupovat do buňky a škodlivinám buňku opouštět. Přes plazmatickou membránu také probíhá komunikace mezi buňkami a získávání informací z okolí.



Obrázek 1: Buněčná membrána, na extracelulární straně buňky červeně znázorněné sacharidy, modře dvojvrstva lipidů, proteiny modře a žlutě cholesterol

##### 3.1.1 Struktura membrán

Hlavními součástmi membrán jsou lipidy a proteiny, významnou roli hrají i sacharidy. Lipidy tvoří dvojnou vrstvu, na kterou jsou připojeny, nebo v ní různě zakotveny molekuly proteinů. Bylo prokázáno, že se dvojná vrstva chová jako dvojdimenzionální tekutina. V roce 1972 S. J. Singer a G. Nicolson navrhli představu, že membránové proteiny jsou jednotlivě rozptýleny v membráně a přirovnali je k ledovcům plovoucím v dvojrozměrném lipidovém moři [3]. Tuto představu označujeme jako MODEL FLUIDNÍ MOZAIKY. Zatímco lipidy a proteiny jsou

rozmístěné asymetricky v membráně, sacharidy se nacházejí pouze na vnějším povrchu membrány a slouží jako signální molekuly [4].

### 3.1.2 Složení membrán

#### 3.1.2.1 Lipidy

Lipidy jsou organické sloučeniny biologického původu, konkrétně se jedná o estery alkoholů a vyšších mastných kyselin. Řetězec může být lineární, rozvětvený, cyklický, nasycený i nenasycený, vždy je ale tvořený sudým počtem uhlíkových atomů. Obecně můžeme rozdělit lipidy na jednoduché (tuky, vosky) a složené (např. fosfolipidy), které obsahují kromě alkoholu a řetězce kyseliny i další látky, jako je kyselina fosforečná nebo molekula cukru. Někdy se do skupiny lipidů přiřazují i izoprenoidní látky, které mají podobné vlastnosti. V těle slouží lipidy jako zásobárna energie a významně přispívají k tvorbě biomembrán.

Na rozdíl od tuků mají lipidy vyskytující se v membránách pouze dva ocase mastných kyselin. Třetí hydroxylová skupina může být navázána třeba na fosfátovou skupinu, která má negativní elektrický náboj a na kterou se mohou navazovat další molekuly obvykle polárního charakteru, díky čemuž vznikají rozmanité lipidy. Obecně se jedná o amfifilní molekuly vykazující vůči vodě dvojaké chování. Jsou složeny z hydrofobního ocasu a hydrofilní hlavy. Ocase jsou tvořeny zbytky mastných kyselin, které jsou ve vodě nerozpustné, jelikož jejich atomy jsou prakticky nepolární a nenabitě a nevytváří proto můstky s vodou. Nicméně fosfátová skupina a na ni připojená hydrofilní hlava jsou k vodě přitahovány. Vytváří proto ve vodném prostředí uspořádané struktury (micely, lyposomy nebo dvojné vrstvy).

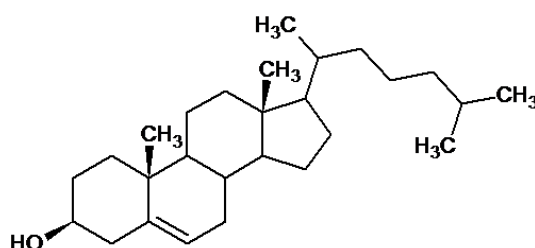
**Glycerofosfolipidy** jsou nejčastější lipidy, které můžeme v membránách nalézt. Glycerofosfolipidy jsou podobné olejům a tukům, jelikož základ jejich molekuly je tvořen glycerolem. K němu jsou esterově připojeny dvě molekuly mastných kyselin v polohách  $C_1$  a  $C_2$  a fosfátová skupina v poloze  $C_3$ . Glycerofosfolipidy se hojně vyskytují jak v rostlinných, tak živočišných buněčných membránách, kde tvoří až 40% lipidní složky [5]. Nejjednodušší glycerofosfolipidy jsou takové, u kterých je hlavičkou fosfátová skupina. Takto jednoduché molekuly se ale v membránách vyskytují pouze v nepatrném množství. Mnohem častěji se v biomembránách vyskytují glycerofosfolipidy, které mají polární hlavičku odvozenou od alkoholů. Nasycené  $C_{14:0}$  -  $C_{18:0}$  mastné kyseliny se normálně vyskytují v poloze  $C_1$ , zatímco poloha  $C_2$  bývá obsazována nenasycenými mastnými kyselinami  $C_{16:1}$  –  $C_{20:1}$ . Přehled acylových zbytků mastných kyselin a polárních hlav je uveden v příloze I.

## Sfingolipidy

Jsou deriváty sfingosinu, dihydrogensfingosinu a jejich homologů. Pokud se amidovou vazbou na sfingosin naváže acylový zbytek, mluvíme o ceramidech. Přidáním polární molekuly na polární část sfingosinu vznikají další druhy lipidů<sup>1</sup>. Připojenými skupinami mohou být i jednoduché cukry nebo oligosacharidy, poté mluvíme o cerebrosidech a gangliosidech. Gangliosidy se vyskytují na povrchu membrán a plní funkci receptorů pro určité hormony.

## Steroidy a steroly

Steroidy jsou lipidy, jejichž základem je uhlíkatý skelet skládající se ze čtyř spojených cyklů. Jsou většinou eukaryotního původu. Steroidy zastávají v organismech řadu funkcí. Mezi skupinu steroidů patří i steroly neboli steroidní alkoholy. Cholesterol je běžnou součástí membrán živočišných buněk, v menší míře se vyskytuje v membránách buněčných organel a jsou z něj syntetizovány ostatní steroidní látky (např. regulující pohlavní vývoj, metabolismus cukrů apod.). Díky polární OH-skupině má slabý amfifilní charakter, zatímco spojené cykly propůjčují molekule cholesterolu značnou pevnost. Přítomnost cholesterolu v membráně značně ovlivňuje její vlastnosti. Snižuje její tekutost, jelikož jeho krátké a pevné molekuly vyplňují prostory mezi sousedními lipidy, které mohou být způsobeny zohnutými řetězci v důsledku nenasycenosti řetězců. Membrána je tak pevnější a méně propustná. Maximální množství cholesterolu v glycerofospholipidové dvojvrstvě je mezi 50-66 mol% [6].



Obrázek 2: Struktura molekuly cholesterolu

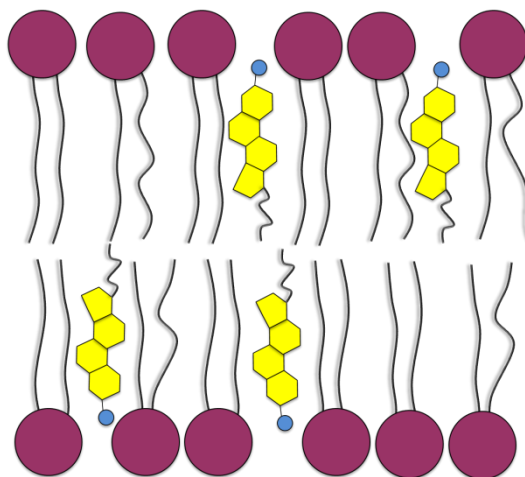
Cholesterol se vyskytuje v malém množství i v mitochondriích a endoplazmatickém retikulu, v Golgiho aparátu už je množství cholesterolu vyšší [6].

Cholesterol je rovněž hojně zastoupen v lipoproteinech krevní plazmy (příloha III) a vyskytuje se prakticky ve všech tkáních těla. Rostliny obsahují cholesterolu málo, v pletivech se ale vyskytují

<sup>1</sup> Naříklad napojením fosfocholinového nebo fosforethanolaminového základu na molekulu ceramidu vznikají sfingomyeliny, které se podílejí na stavbě myelinového pouzdra, které kryje axony nervových buněk [3].

podobné látky stigmasterol a betasitosterol, které se od cholesterolu liší pouze v postranních řetězcích.

Stejně jako glycerofosfolipidy a sfingolipidy je i cholesterol syntetizován v endoplazmatickém retikulu, odkud je dodáván do plazmatické membrány. Cholesterol se může dostat do membrány i z vnějšku právě díky lipoproteinům. Lipoproteiny jsou také jediným způsobem, jak odstranit přebytečný cholesterol z buňky [6].



Obrázek 3: Molekuly cholesterolu v membráně

### 3.1.2.2 Proteiny

Proteiny jsou zabudovány do lipidového matrixu a právě ony propůjčují membráně její specifické funkce a vlastnosti. Membránové proteiny můžeme rozdělit do hlavních dvou skupin: na integrální a periferní. Integrální jsou takové proteiny, které prostupují až mezi hydrofobní ocase lipidů a tedy do jádra lipidové dvojné vrstvy. Tyto proteiny jsou v membráně vázány silnými hydrofobními vazbami, a proto je můžeme od membrány oddělit pouze silnými činidly, které ji rozruší. Mezi zvláštní případy těchto proteinů patří transmembránové proteiny, které prostupují celou membránou. Periferní proteiny do membrány nezasahují, jsou umístěny vně nebo nasedají na odhalené části integrálních proteinů elektrostatickými silami a vodíkovými můstky. Dají se od membrány jednoduše oddělit a to i bez porušení membrány. Zatím nebyl pozorován žádný protein, který by byl úplně ukryt v membráně, všechny jsou alespoň z části vystaveny vodnímu prostředí. Proteiny plní roli přenašečů látek z/do membrány, a to i proti

koncentračnímu spádu. Jako příklad takového proteinu můžeme uvést sodno-draslíkovou pumpu.

2

### 3.1.2.3 Sacharidy

Sacharidy se na membráně vyskytují pouze na extracelulární straně membrány. Většinou se jedná o oligosacharidy, které po spojení s lipidem vytvoří glykolipidy. Fungují jako značky, kterými se odlišují jednotlivé buňky (např. pomocí oligosacharidů na povrchu červených krvinek je možno rozpoznat krevní skupiny). Obecně fungují jako receptory přijímající informace z okolí.

### 3.1.3 Vlastnosti membrán

#### 3.1.3.1 Dvojvrstva a její vznik

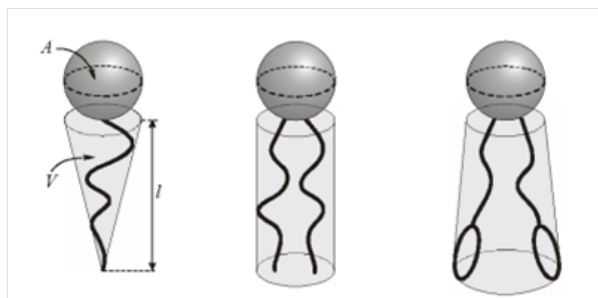
Pokud přidáme lipidy do vody, začnou se samy uspořádávat a shlukovat tak, aby ochránily své hydrofobní ocasy před vodou. Vzniká tak útvar zvaný micela, lyposom, nebo tzv. dvojvrstva, kterou mají tendenci tvořit glycerofosfolipidy a sfingolipidy. Jestli se vytvoří micela, nebo dvojná vrstva závisí na tvaru molekul a jejich koncentraci. Molekuly s jedním řetězcem mají tendenci tvořit micely, molekuly s dvěma rovnými nebo i zahnutými řetězci mohou tvořit dvojvrstvu. Popis tvaru molekuly je možný díky veličině zvané úložný faktor  $u_0$ , který je definován rovnicí (1):

$$u_0 = \frac{V}{lA} \quad (1),$$

kde  $V$  je objem a  $l$  je délka řetězce,  $A$  charakterizuje plochu potřebnou pro hydrofilní hlavu. Podle hodnoty úložného faktoru je možné určit, jaký útvar budou molekuly s největší pravděpodobností tvořit.

---

<sup>2</sup> I proteiny jsou ovlivněny přítomností cholesterolu v membráně. Některé proteiny se na cholesterol vážou a jsou jím potom regulované. Proteiny se vyskytují převážně v tzv. lipidových raftech (což je úsek membrány, kde se vyskytuje velké množství proteinů), které by bez přítomnosti cholesterolu nemohly vzniknout [6].

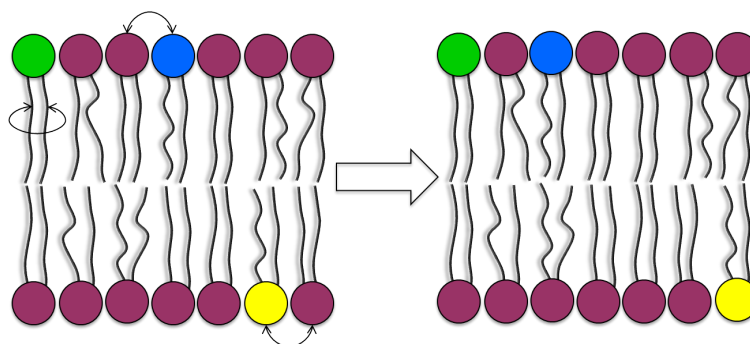


Obrázek 4: Tvary molekul lipidů, převzato z reference [7]

Dvojvrstva je pro většinu molekul s dvěma rovnými řetězci energeticky nejvýhodnějším řešením. Je tlustá asi 5-8 nm a její jedinečné vlastnosti jí propůjčuje právě stavba fosfolipidů. Hydrofilní hlavičky jsou v obou listech obráceny k vodě, zatímco ocasy jsou před vodou schovány uvnitř. Díky tomu má membrána i samozacelovací schopnost. Pokud se v membráně vytvoří trhlinka a s tím i prostor, kde se molekuly setkávají s vodou (což je energeticky nevýhodné), fosfolipidy se samovolně přeuspořádají tak, aby toto volné rozhraní odstranily. Snaha zamezit jakýmkoliv volným rozhraním s vodou má za důsledek, že se dvojvrstva uzavře sama do sebe a vytvoří uzavřený oddíl.

### 3.1.3.2 Pohyby lipidů v rámci membrány

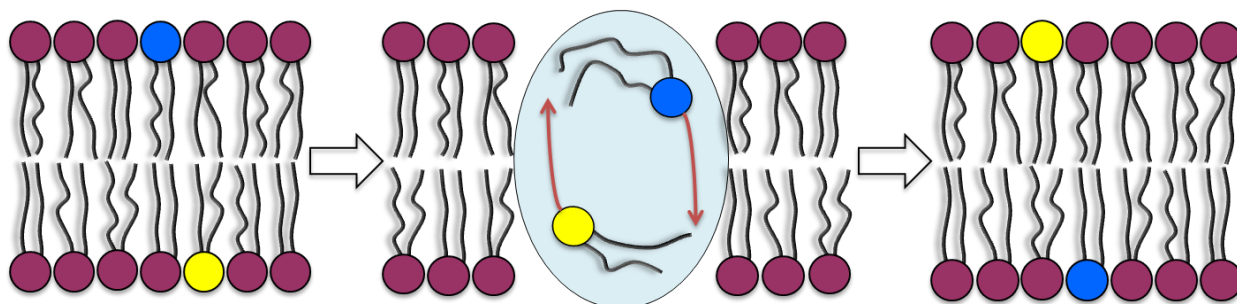
Lipidy sice prakticky nemají možnost opustit membránu, zato se v ní mohou samovolně pohybovat. Pomocí umělých dvojných vrstev bylo zjištěno, jaké pohyby molekuly lipidů mohou provádět a které z nich jsou méně časté než jiné. K nejběžnějším pohybům patří rotace kolem své podélné osy a vyměňování si míst se svými sousedy v jedné monovrstvě. Tento způsob pohybu, nazývaný také laterální difuze, probíhá velmi rychle a často. Měření ukazují, že lipidy se pohybují rychlostí asi 1  $\mu\text{m/s}$  [3].



Obrázek 5: Schéma častého pohybu fosfolipidů (rotace kolem vlastní osy zeleně, vyměňování si míst se sousedy modře a žlutě).



Přesun do druhé vrstvy neboli překlápění (angl. flip-flop) je záležitostí velmi vzácnou, protože polární hlava molekuly musí přejít přes hydrofobní část membrány. Rychlost překlápění fosfolipidů, stanovená několika metodami, je charakterizována poločasem několika dnů [3].



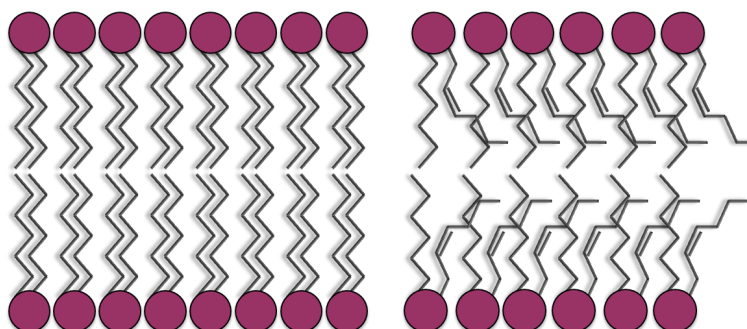
Obrázek 6: Schéma překlápění (flip-flop) [8]

Jednotlivé molekuly fosfolipidů se tedy volně pohybují ve své monovrstvě a nemají důvod se překlápět. Říkáme, že se membrána chová jako dvojrozměrná tekutina.

### 3.1.3.3 Fluidita neboli tekutost membrány

Fluiditou rozumíme snadnost, s jakou se mohou molekuly ve své monovrstvě pohybovat [4]. Tekutost membrány je ovlivněná především složením membrány a vlastnostmi jednotlivých molekul. Pokud je membrána složena převážně z fosfolipidů se stejně dlouhými a nasycenými ocasy, pak je membrána pevná a viskózní, jelikož lipidy na sebe těsně nasedají a vytvářejí tzv. pevnou fázi.

S kratšími řetězci se snižuje možnost interagovat s ostatními uhlovodíkovými konci, čímž se fluidita zvyšuje. Často se v membránách vyskytují fosfolipidy s nenasyčenými ocasy, které způsobují v membráně jisté nepravidelnosti, kvůli kterým na sebe nemohou lipidy těsně nasedat. Takové membrány jsou tekutější a označujeme je jako kapalnou fázi. Jelikož se řetězce různě kříží a ohýbají, můžeme se setkat i s označením neuspořádaná (angl. disordered) membrána.



Obrázek 7: Viskózní (uspořádaná) a fluidní (neuspořádaná) membrána

Dvojvrstva, která se za normálních podmínek chová jako dvojrozměrná tekutina (stav zvaný tekutý krystal), se při ochlazení pod teplotu přechodu změní v mnohem uspořádanější útvar, který má vlastnosti gelu podobné tuhé látce. Teplota přechodu dvojné vrstvy vzrůstá s délkou řetězce a stupněm nasycení zbytků mastných kyselin. Teploty přechodu většiny biomembrán se pohybují mezi 10 a 40°C. Cholesterol, snižuje tekutost membrán, protože jeho neohebný kondenzovaný systém zabraňuje pohybu řetězců mastných kyselin, mezi které se zařazuje. Ovlivňuje také teplotu přechodu, díky čemuž membrána krystalizuje postupně a pomaleji (funguje tedy jako tzv. změkčovadlo membrán). Fluidita je velmi významná vlastnost biomembrán, protože umožňuje interakce v nich ponořených proteinů. Udržení membrány v tekutém stavu je pro organismy velmi důležité, proto bakterie a studenokrevní živočichové mění skladbu svých mastných kyselin podle teploty [3].

## 3.2 Počítačové simulace (molekulové modelování)

Pojem molekulové modelování se používá již několik desetiletí. Díky počítačům můžeme vymodelovat modely molekul a poté zkoumat jejich vlastnosti i ve velkých systémech, pozorovat interakce mezi jednotlivými členy a tím vyřešit i velmi obtížné úkoly. Počítačové simulace se nevyužívají jen k modelování chemických a biologických dějů, ale i ke zkoumání vesmíru, materiálů a modelování nových léků. Dokážeme simulovat extrémní podmínky (teplotu, tlak) a zjistit informace, které by byly v laboratoři těžko měřitelné.

Nejpřesnější výsledky získáváme při použití kvantové mechaniky, je ale výpočetně velmi náročná a používá se pouze pro jednoduché systémy. Pro většinu simulací využíváme molekulovou mechaniku a dynamiku, která vychází z mechaniky klasické. Klíčovým krokem při molekulovém modelování je určení pozic jednotlivých atomů v systému. Při použití klasické mechaniky nejčastěji používáme Kartézské souřadnice ( $x$ ,  $y$ ,  $z$ ). Kvantová mechanika využívá tzv. interní souřadnice, které popisují pozici atomu vzhledem k ostatním atomům v systému. Oba způsoby lze libovolně zaměnit [9].

### 3.2.1 Molekulová mechanika

Molekulová mechanika (MM) charakterizuje molekuly pomocí potenciální energie. Využívá klasických Newtonových zákonů mechaniky. MM popisuje atom jako bod s určitým nábojem. Toto zjednodušení je provedeno díky Born-Oppenheimerově aproximaci, která odděluje pohyb elektronů a jader. Každá částice má svůj poloměr, polaritu a konstantní náboj. Vazba mezi atomy je chápána jako pružina.

### 3.2.1.1 Silové pole

Silové pole (ang. force field) je souhrn parametrů, které jsou nezbytné pro výpočet potenciální energie. Celková energie je funkcí vzájemné pozice jader, tj. součtem vazebných a nevazebných parametrů v molekule (2),

$$E = E_{vazebná} + E_{nevazebná} \quad (2),$$

kde E je celková potenciální energie molekuly.

Mezi vazebné příspěvky k celkové energii patří energie vazeb ( $E_{vazeb}$ ), energie úhlů ( $E_{úhlů}$ ) a energie dihedrálních úhlů ( $E_{dú}$ ). K nevazebným energetickým příspěvkům řadíme interakce parciálních nábojů ( $E_{pn}$ ) a Van der Waalsovy interakce ( $E_{Vdw}$ )

$$E = E_{vazeb} + E_{úhlů} + E_{dú} + E_{pn} + E_{Vdw} \quad (3),$$

Každý jednotlivý člen rovnice je vyjádřen matematicky na základě empirického zkoumání nebo kvantově chemickými výpočty.

Konstanty silového pole pro jednotlivé molekuly jsou zadávány v souboru nazývaném topologie, která slouží k definici jednotlivých vazeb, úhlů etc., které se v molekule uplatňují.

Protože i přes využití klasické mechaniky jsou výpočty stále složité, používáme různá zjednodušení. Například nevazebné interakce by byly potřeba spočítat mezi každými dvěma atomy v celém systému, což by zabíralo spoustu času, a proto jsou zavedeny tzv. atomové typy (atom types), které mají stejné vlastnosti (např. všechny skupiny  $\text{CH}_2$  v řetězci mastné kyseliny). Dále můžeme počítat třeba jen s určitými významnými atomy, ke kterým přidružíme ty méně podstatné (např. sjednocení uhlíků s jejich nepolárními vodíky). Mezi další zjednodušení patří např. coarsegrained (sdružování více atomů v jednu částici) nebo cutoff (ořezávání). Navíc je přesně definované, s kterými energetickými příspěvky se počítá a které jsou již tak slabé nebo nevýznamné, že je nemá smysl řadit do celkové energie.

### 3.2.2 Molekulová dynamika

Molekulová dynamika (MD) vypočítává chování systému v průběhu času. Simuluje klasický pohyb atomů v daném silovém poli. Pro výpočet pohybů a rychlostí jsou použity Newtonovy zákony. Z potenciální energie se vypočítá síla působící na každý atom a následně rychlost daného atomu.

---

V každém kroku se znovu provádějí výpočty MM i MD. Získáváme tzv. trajektorii, která je posloupností jednotlivých stavů molekuly v čase a prostoru. Podrobnější rovnice jsou obsaženy v příloze II.

## 4 METODIKA

### 4.1 Programy a soubory

Simulace byly prováděny v softwarovém balíčku GROMACS [23] (GRONinger MACHine for Chemical Simulations), pomocí kterého jsem prováděla analýzy simulačních boxů. Jelikož Windows nepodporuje tento softwarový balíček, pracovala jsem na virtuálním stroji, kde byl nainstalován operační systém Ubuntu pracujícím na linuxovém jádře.

VMD (Visual Molecular Dynamics) je program určený k vizualizaci jednotlivých simulací. Ve VMD probíhala kontrola simulace, pohybů jednotlivých molekul, vzhled simulačního boxu apod. [28]

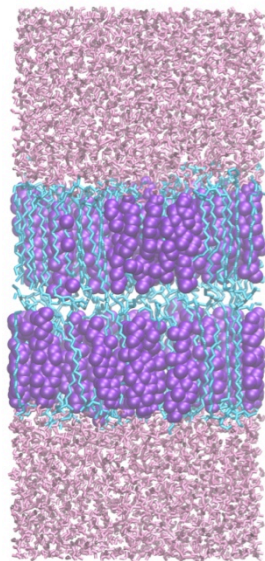
Software POV-Ray 3.6 (Persistence of Vision Ray-Tracer) slouží k vytváření snímků 3D grafiky. [29]

### 4.2 Simulační boxy

Membrány byly vytvořeny pomocí skriptu „membrane\_builder“, zpracovaným na katedře fyzikální chemie Univerzity Palackého v Olomouci. Do mřížky o velikosti 8x8 „míst“ jsou náhodně naskládány jednotlivé molekuly (lipidy a cholesterol) vždy v zadaném poměru. Celkem bylo vytvořeno 24 membrán (boxů), po osmi od každého druhu lipidů (DOPC, DPPC a Ceramid 2). Simulační box obsahoval celkem 128 lipidů, po 64 lipidech v jedné monovrstvě. V obou vrstvách jedné membrány byl stejný poměr mezi lipidy a cholesterolem.

Počty cholesterolů v simulačních boxech								
počet molekul lipidů	32	44	54	58	60	62	63	64
počet molekul cholesterolu	32	20	10	6	4	2	1	0
procentuální zastoupení cholesterolu v membráně (molární procenta – mol %)	50	31	16	9	6	3	2	0

Tabulka 1: Poměr lipidů a cholesterolu v simulačních boxech



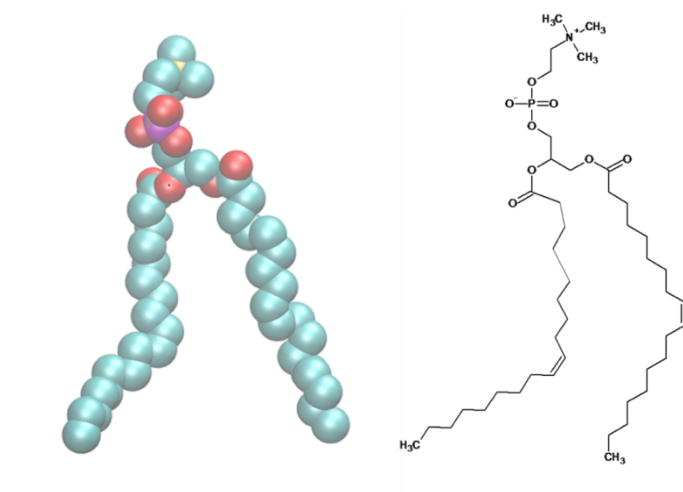
Obrázek 8: Simulační box membrány složené z Ceramidu 2 a cholesterolu. Uprostřed je dvojná vrstva z Ceramidů 2 (modré) a cholesterolů (fialové). Okolo membrány jsou molekuly vody (růžové)

#### 4.2.1 Molekuly v simulačním boxu

V boxu se nachází jeden druh lipidu, molekuly cholesterolu, voda a několik iontů  $\text{Na}^+$  a  $\text{Cl}^-$ . Ionty byly přidány k navození fyziologické koncentrace 0,15 mol/l. Molekuly byly staženy z referencí [20], [21], [25], [26], [27].

**4.2.1.1 DOPC ( $C_{44}H_{84}NO_8P$  – 1,2-Dioleoylglycerol-3-phosphodylcholine)**

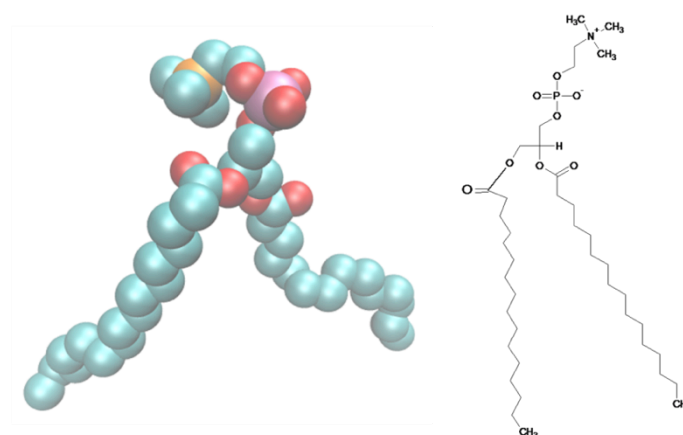
Molekula DOPC patří mezi glycerofosfolipidy. Má dva hydrofobní ocasy, které jsou připojené na glycerol. Hlava fosfolipidu je tvořena fosfátovou skupinou a molekulou cholinu. Oba acylové zbytky jsou tvořeny kyselinou olejovou, která má uprostřed svého řetězce dvojnou vazbu, což způsobuje zakřivení ocasů. [27]



Obrázek 9: Molekula DOPC

**4.2.1.2 DPPC ( $C_{40}H_{80}NO_8P$ , 1,2-Dipalmitoyl-3-sn-phosphatidylcholine)**

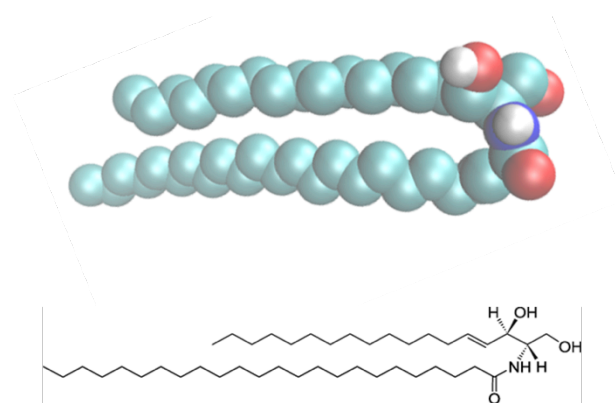
DPPC patří rovněž mezi glycerofosfolipidy a od DOPC se svou polární hlavou neliší. Rozdíl mezi těmito dvěma lipidy je v jejich acylových zbytcích. Na rozdíl od DOPC má DPPC řetězce tvořené kyselinou palmitovou, která neobsahuje žádnou dvojnou vazbu a jejíž řetězce jsou rovné. [25]



Obrázek 10: Molekula DPPC

#### 4.2.1.3 Ceramid 2 ( $C_{42}H_{83}NO_3$ , *N-lignoceroyl-D-erythro-sphingosine*)

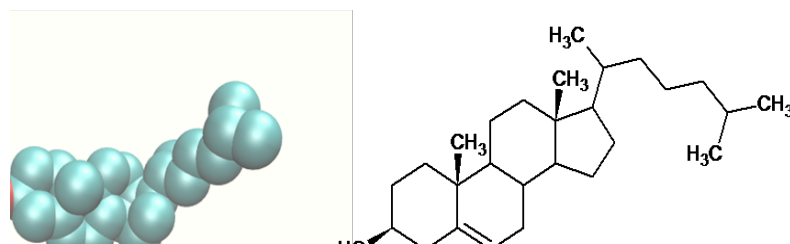
Patří mezi sfingolipidy. Má sice rovné ocase, každý je ale jinak dlouhý. Molekula sfingosinu je napojena přes amidovou vazbu na lignoceroyl (zbytek kyseliny lygnocerové). Parametry pro tento lipid byly použity pro studium vlivu kyseliny olejové na vlastnosti ceramidové membrány [11] a byly staženy z webové stránky [21].



Obrázek 11: Molekula Ceramidu 2

#### 4.2.1.4 Cholesterol

Cholesterol patří mezi steroly. Základem molekuly je tetracyklický uhlíkatý systém steran (cyklopentanoperhydrofenanthren), který molekule propůjčuje pevnost a tuhost. Přítomná –OH skupina zajišťuje slabý amfifilní charakter. Oproti molekulám lipidů je molekula cholesterolu menší. [26]



Obrázek 12: Molekula cholesterolu

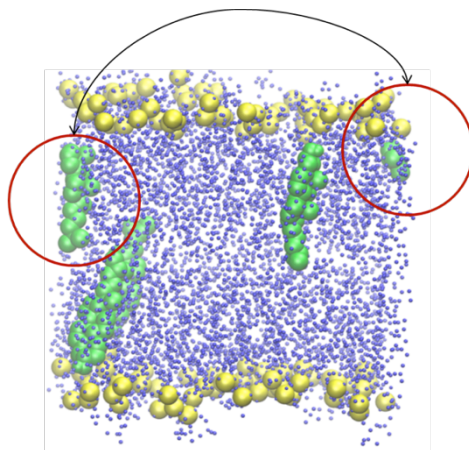
#### 4.2.2 Vytvoření simulace

Po vzniku simulačních boxů bylo nutné provést tzv. minimalizaci, která zaručí systémy s co nejmenší potenciální energií. Zbavuje membránu nechtěných překryvů a nepřesností. Celkem proběhly tři minimalizace. Nejprve byly minimalizovány pouze lipidy, poté box s přidanou vodou a naposledy celý box i s ionty, které byly přidány do boxu k vytvoření přirozeného prostředí. Po minimalizacích byla vytvořena samotná simulace, během níž byly získány soubory popisující trajektorii systému po dobu 200 ns. Výpočty byly prováděny na superpočítačích.



### 4.2.3 Podmínky, silové pole

Simulace probíhaly v silovém poli Berger, které je speciálně uzpůsobeno pro MD lipidů. Využívá již zmíněné zjednodušení united atoms, které slučuje nepolární vodíky s uhlíky, na které jsou napojeny. Simulace byly provedeny za teploty 310 K a tlaku 1 bar. Jeden krok simulace trvá 2 fs a pro celkovou délku simulace (200 ns) bylo potřeba vytvořit 100 000 000 kroků. Jelikož máme k dispozici pouze část membrány, která nemůže zaujmout svou přirozenou polohu a utvořit tak uzavřený útvar, používáme periodické okrajové podmínky (periodic boundary condition). Díky tomuto principu mohou molekuly zdánlivě se nacházející na „koncích“ boxu přejít „na druhou“ stranu membrány, jelikož systém sousedí ve všech směrech sám se sebou. Na obrázku (Obrázek 13) je znázorněna molekula cholesterolu, jejíž části se nachází na opačné straně boxu a vypadají, jako by byly rozděleny.



Obrázek 13: Periodické okrajové podmínky

### 4.2.4 Vizualizace

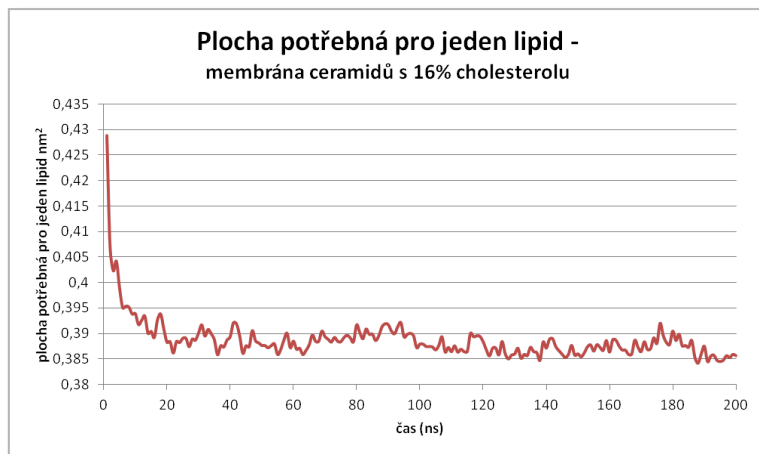
Pro pozorování a kontrolu simulací byl použit program VMD. Sledujeme průběh simulace, jednotlivé molekuly cholesterolu (případně flip-flopy), fluiditu, uspořádanost apod. Program nabízí zobrazování jak celého boxu, tak i zvláště jednotlivých molekul.

### 4.2.5 Analýzy

#### 4.2.5.1 Plocha potřebná pro jeden lipid (*Area per lipid*)

Plocha potřebná pro jeden lipid je jednou ze základních proměnných, která charakterizuje vlastnosti dvojvrstvy lipidů. Výpočet byl proveden pomocí programu `g_energy`, který nám ze složky zabývající se energiemi systému extrahoval velikosti boxu a jeho objem. Odtud jsem poté spočítala plochu celé jedné monovrstvy. Jednoduchým vydělením počtem lipidů jsem dostala

průměrnou plochu potřebnou pro jeden lipid. Nedělala jsme rozdíly mezi molekulami lipidů a cholesterolu, což mohlo drobně zkreslit výsledek. Ve vytvořených grafech je zjevný průběh průměrné plochy potřebné pro jeden lipid v čase.



Graf 1: Plocha potřebná pro jeden lipid

Začátek simulace se do celkového průměru nezapočítává, jelikož, jak je vidět z grafu (Graf 1), nejsou začáteční hodnoty ještě ovlivněny jednotlivými interakcemi. Proto pomocí grafu určujeme vždy konkrétní čas, od kterého průměrujeme hodnoty pro každou membránu zvlášť. Většinou se tato počáteční hranice pohybuje kolem 50-100 ns.

#### 4.2.5.2 Objem potřebný pro jeden lipid (*Volume per lipid*)

Objem lipidů je další proměnnou, která charakterizuje potřebný prostor pro jeden lipid. Výpočty probíhaly pro srovnání dvojím způsobem.

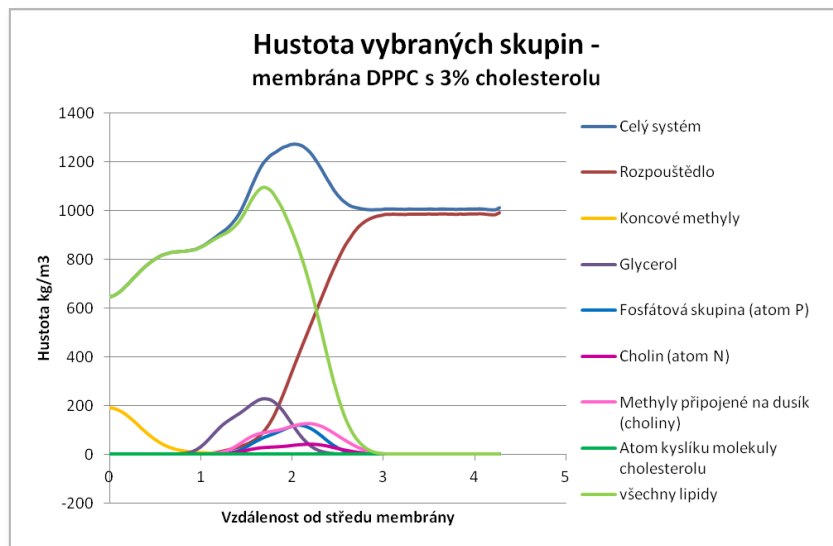
- plocha potřebná pro jeden lipid se vynásobila polovinou vzdálenosti atomů v hlavě lipidu (viz analýza tloušťky membrány)
- od celkového objemu boxu byl odečten objem vody, objem lipidů byl poté dělen počtem lipidů

Obě hodnoty se liší v setinách nebo desetinách  $\text{nm}^3$ .

#### 4.2.5.3 Hustota jednotlivých skupin v boxu (*Density*)

Pomocí této analýzy jsem byla schopná zjistit, jak velké jsou hustoty předem určených skupin (atomů, molekul) i jejich vzdálenost od středu membrány.

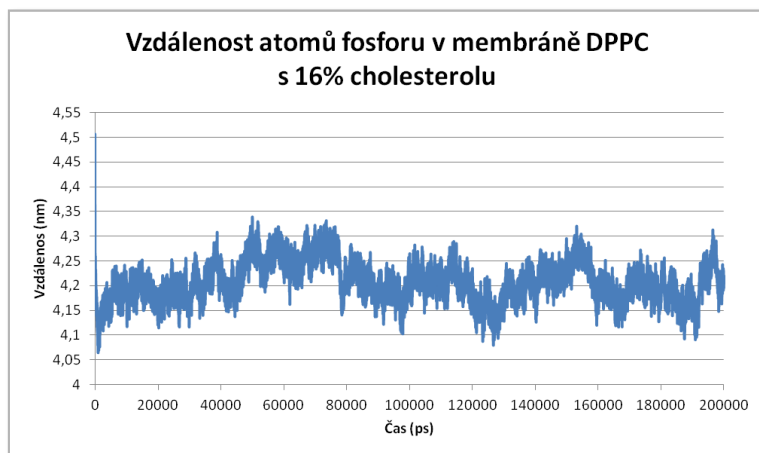
V grafu (Graf 2) jsou zaznamenány hustoty jednotlivých skupin podél osy kolmé na membránu (upraveno na jednu monovrstvu). Porovnáváním hustot jednotlivých skupin napříč všemi membránami zjišťujeme rozdílné umístění cholesterolů v membráně, tloušťku membrány apod.



Graf 2: Hustoty vybraných skupin v systému. Žlutou barvou zvýrazněné uhlíky acylových řetězců mají například nejvyšší hustotu hned na začátku grafu (tedy ve středu membrány).

#### 4.2.5.4 Vzđálenost atomů (tloušťka membrány)

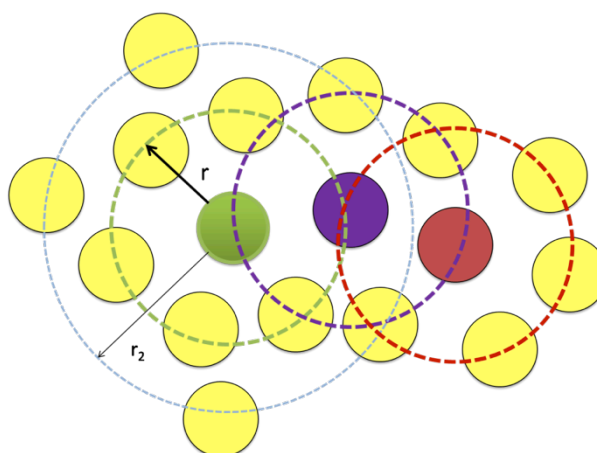
Pro zjištění tloušťky membrány, ale také pro počítání objemu jednoho lipidu (viz výše) bylo třeba zjistit, jak daleko jsou od sebe umístěny hlavy fosfolipidů (napříč membránou). U molekul DOPC a DPPC jsme počítali vzdálenosti atomů P (fosfátová skupina) a N (cholinová skupina), u ceramidů byla počítána vzdálenost mezi atomy N a O (oba umístěné v hlavě ceramidu). Stejně jako Area per lipid je tato analýza zobrazena jako vývoj v čase simulace a dochází k jisté prodlevě, než se membrána ustálí (Graf 3).



Graf 3: Vzdálenost atomů fosforu v membráně DPPC

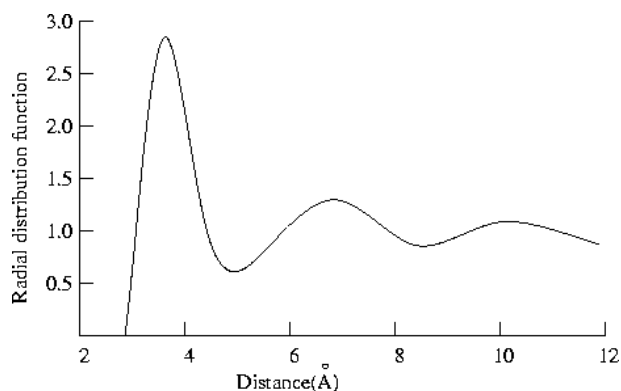
#### 4.2.5.5 RDF (Radiální distribuční funkce)

Radiální distribuční funkce (RDF) popisuje, jak se mění relativní hustota jako funkce vzdálenosti  $r$  od určitého bodu (atomu, molekuly, etc.). Určuje pravděpodobnost, s jakou můžeme najít ve vzdálenosti  $r$  od příslušného bodu (A) jiný určitý bod (B), (Obrázek 14). RDF se používá nejčastěji pro kapaliny. Kolem každého atomu A se v určité vzdálenosti, kterou nazýváme první solvatační vrstva, vyskytuje větší množství atomů B než v ostatních vzdálenostech. Blíž se většinou žádné jiné atomy nevyskytují. Ve větší vzdálenosti od atomu A se vyskytuje druhá solvatační vrstva, není ale tak výrazná jako první. Mezi první a druhou solvatační vrstvou by se v ideálním případě nemělo nacházet příliš mnoho atomů. Po druhé solvatační vrstvě se RDF ustaluje a pomalu se přibližuje k hustotě systému.



Obrázek 14: Výpočet radiální distribuční funkce. Kolem zeleně zobrazeného atomu se ve vzdálenosti  $r$  (zelená kružnice) nachází první solvatační vrstva. Ve větší vzdálenosti od tohoto atomu ve vzdálenosti  $r_2$  je druhá solvatační vrstva (modrá kružnice). Každému atomu jsou přisouzeny obě solvatační vrstvy a výsledek se průměruje.

Při sestrojení grafu (Obrázek 15) RDF vidíme vývoj se vzrůstající vzdáleností. Nejvýraznější pík zobrazuje první solvatační vrstvu (na ose x jsou vyneseny vzdálenosti této vrstvy od měřeného atomu), následuje spád, tedy místo, kde je koncentrace atomů malá. Směrem dál od měřeného atomu se nachází další zvýšená koncentrace (druhá solvatační vrstva) značená druhým, tentokrát již ne tak výrazným píkem. Dále se hodnoty grafu neustále přibližuje k hustotě systému, konkrétně v obrázku se křivka pohybuje směrem k/kolem hodnoty 1, což je hustota vody.



Obrázek 15: RDF vody, převzato z reference [24]

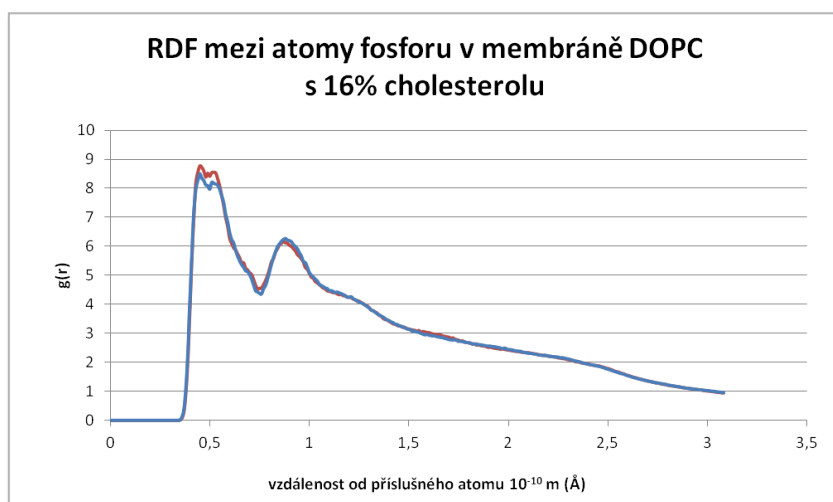
V našich výsledcích jsme počítali RDF mezi různými atomy, konkrétně:

- vzdálenost atomů v hlavě fosfolipidů: u DOPC a DPPC šlo o vzdálenost atomů fosforu, u ceramidů šlo o atomy dusíku
- vzdálenost atomů v hlavě fosfolipidu (fosfor nebo dusík) k atomům kyslíku obsaženým v molekule cholesterolu
- vzdálenost atomů kyslíku v cholesterolu
- vzdálenost atomů v hlavě fosfolipidu (fosfor nebo dusík) k atomům kyslíku obsaženým v molekule vody
- vzdálenost atomů kyslíku cholesterolu k atomům kyslíku obsaženým v molekule vody

Po výpočtu všech RDF jsou všechny výsledky průměrovány. Výsledkem tedy není graf, který by popisoval první a druhou solvatační vrstvu k jednomu konkrétnímu atomu, ale graf popisující průměrné solvatační vrstvy pro všechny atomy téhož druhu.

Jelikož program počítá ve 3D (membrána je fluidní a výsledky pouze ve dvou rozměrech by nebyly přesné), mohlo by dojít ke zkreslení výsledků, pokud by program bral v úvahu i

stejnějmené atomy z druhé monovrstvy. Proto byla před spuštěním analýzy membrána rozdělena na spodní a horní vrstvu.<sup>3</sup> Nabízí se nám proto i další možnost zkoumání výsledků a to porovnávání jednotlivých vrstev, jelikož výsledky vrstev z jedné membrány by měly být prakticky totožné (Graf 4).



Graf 4: RDF pro spodní a horní monovrstvu též membrány

---

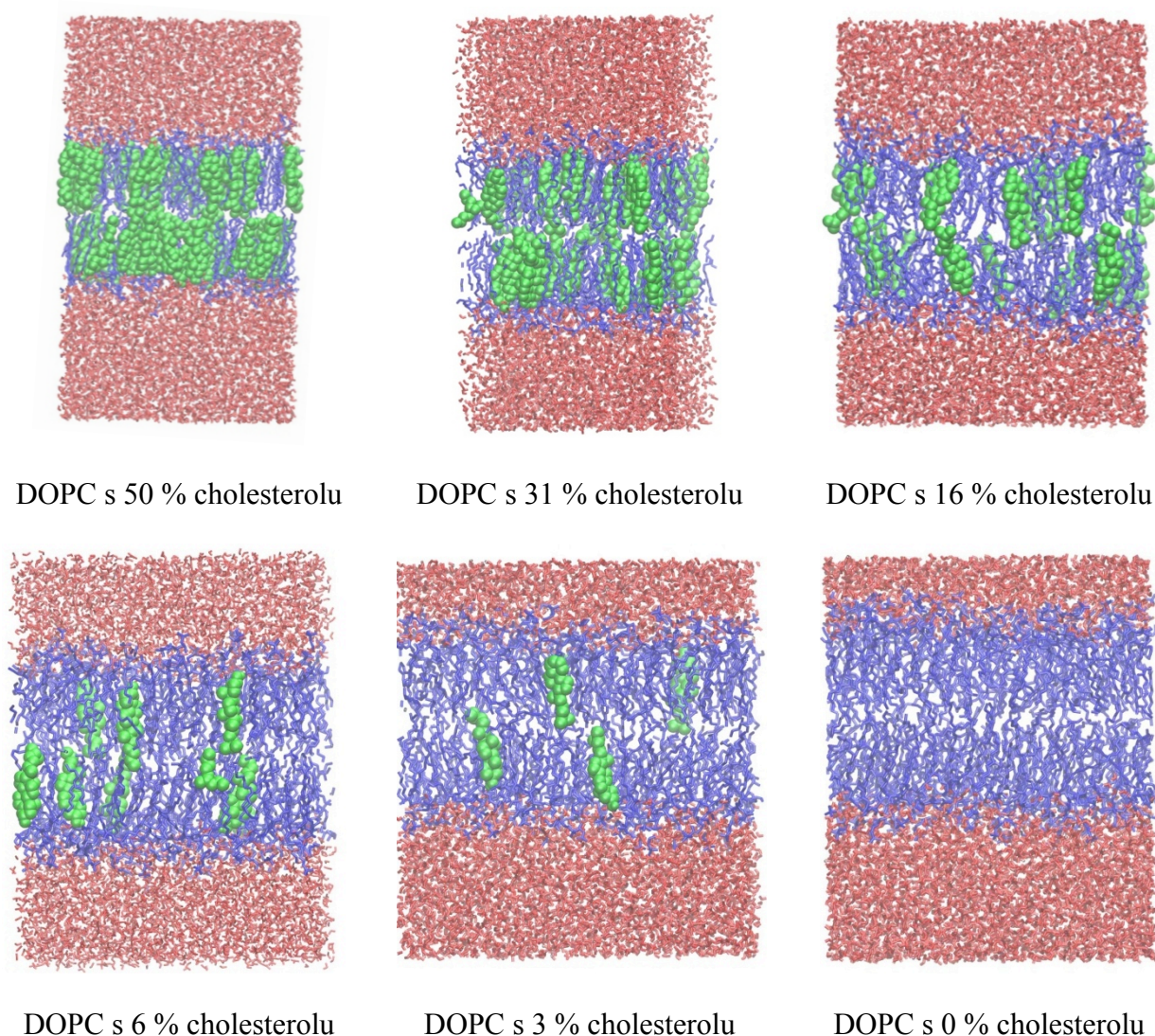
<sup>3</sup> V systému není přesně stanoveno, která monovrstva je spodní a která horní. Toto označení slouží pouze k lepší orientaci ve výsledcích.

## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Vizualizace

Při vizualizaci membrán jsme se setkali s očekávatelnými výsledky, ale i se situacemi, které jsou celkem vzácné. Na ukázkou bylo u každé membrány vytvořeno několik snímků, ve kterých je červenou barvou zvýrazněno rozpouštědlo (voda), modře lipidy (DOPC, DPPC, ceramidy) a zeleně molekuly cholesterolu.

#### 5.1.1 Membrány DOPC



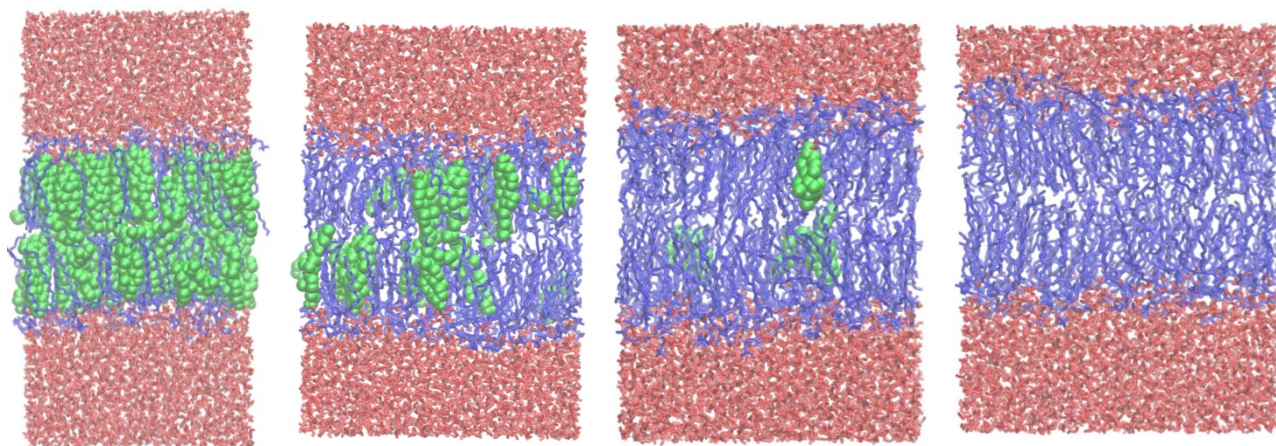
Obrázek 16: Membrány DOPC

Membrány složené z DOPC jsou díky stavbě těchto molekul velmi fluidní a neuspořádané. Tato neuspořádanost jde vidět i na obrázcích, řetězce se prolínají a překrývají. U membrán DOPC jsme pozorovali náznak flip-flopu cholesterolu, když se během simulace dostal do středu

membrány a ležel kolmo k ostatním lipidům. Někdy se stal flip-flop hned na začátku simulace, což bohužel nemůžeme považovat za směrodatné.

Oproti ceramidům se cholesterol nachází blízko středu membrány.

### 5.1.2 Membrány DPPC



DPPC s 50 %  
cholesterolu

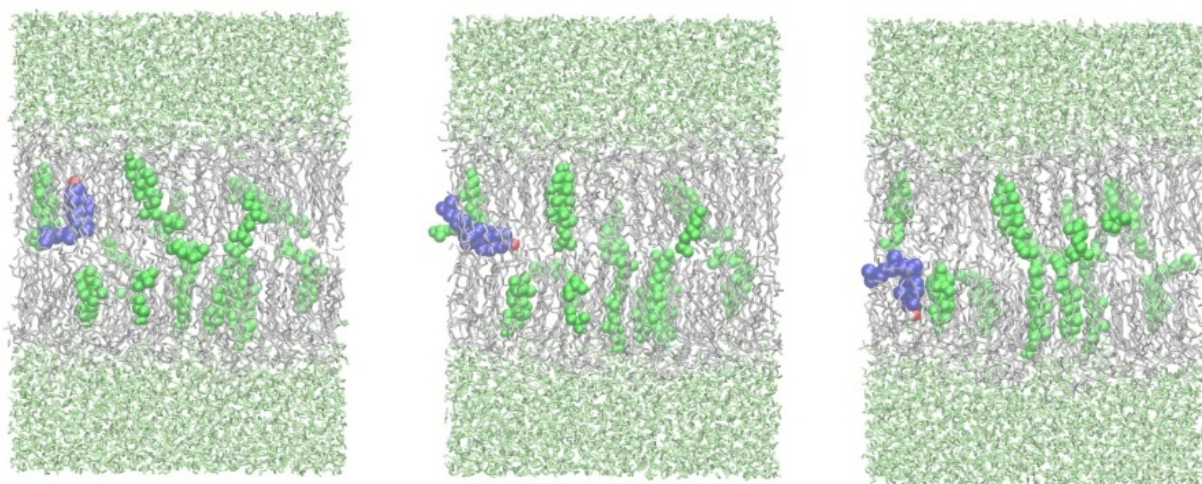
DPPC s 16 %  
cholesterolu

DPPC s 3 %  
cholesterolu

DPPC s 0 %  
cholesterolu

Obrázek 17: Membrány DPPC

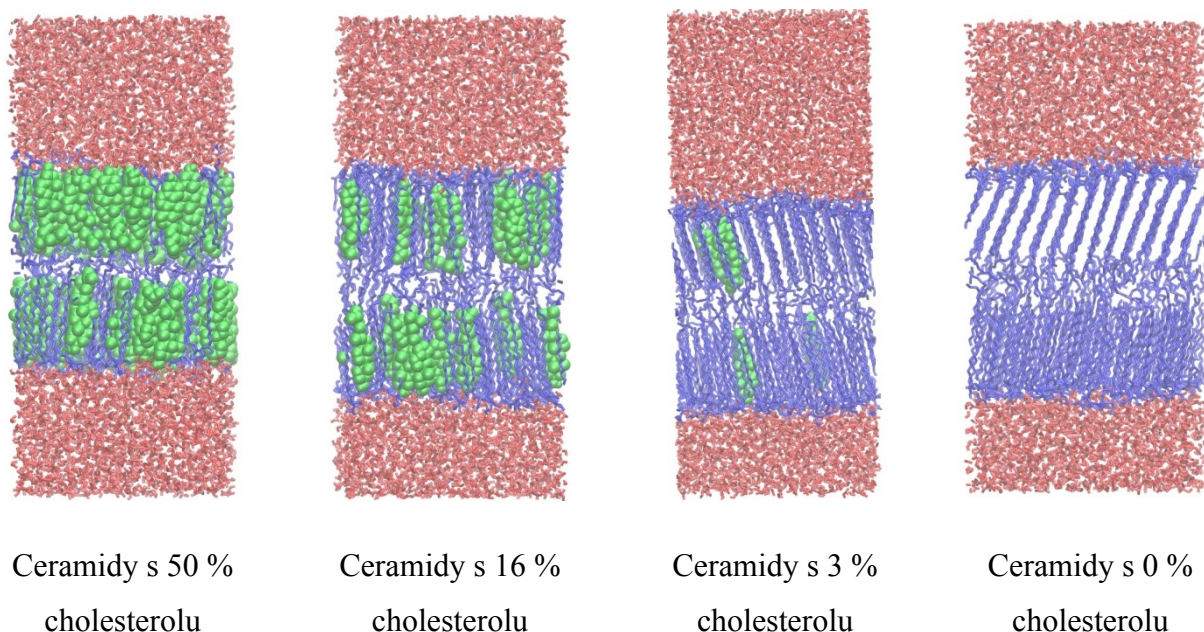
Membrány DPPC mají podobné vlastnosti jako DOPC. Mají rovnější řetězce a proto je membrána více uspořádaná a pevná. U membrány s 9 % zastoupením cholesterolu jsme pozorovali flip-flop cholesterolu (Obrázek 18).



Obrázek 18: Flip-flop v membráně DPPC s 9 % cholesterolu



### 5.1.3 Membrány Ceramidu 2

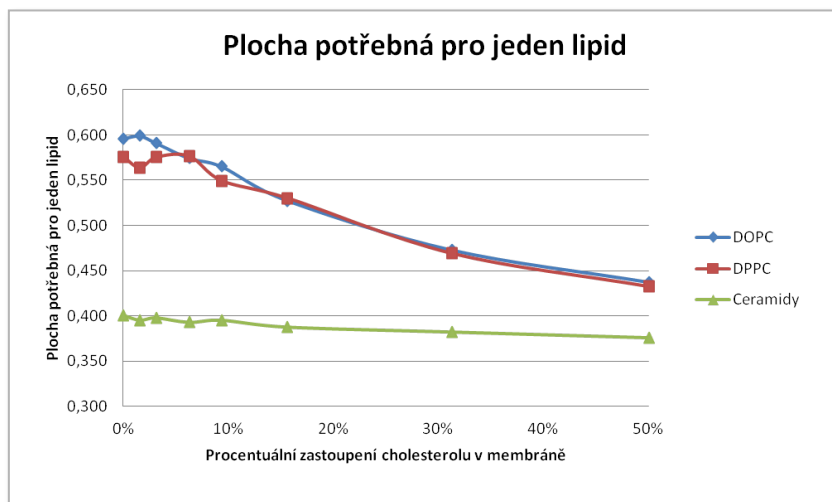


Obrázek 19: Membrány ceramidů

Molekuly ceramidů si po celou dobu trvání simulace zachovávají pravidelnost v mřížce, můžeme tedy mluvit o uspořádané membráně v gel-fázi. Díky tomu lze při vhodném natočení membrány ve VMD vidět skrz (viz membrána s 0 % zastoupením cholesterolu). V čisté membráně (bez cholesterolu) jsou molekuly ceramidů uspořádány pod úhlem menším než  $90^\circ$  ke středu membrány (mírně šikmo). S přidáváním cholesterolu se ale ceramidy vzhledem ke středu membrány narovnávají a jsou na ni kolmé, stejně jako v případě fosfatidylcholinů.

## 5.2 Plocha potřebná pro jeden lipid

Hodnota plochy potřebné pro jeden lipid je značně ovlivněna obsahem cholesterolu v membráně. U všech membrán dochází k poklesu plochy se zvětšováním obsahu cholesterolu v membráně. V membránách glycerofosfolipidů (DOPC a DPPC) dochází k mnohem prudšímu vývoji. U DOPC se cholesterol nachází v mezerách, které v membráně způsobují zakřivení v řetězcích a vyplňováním těchto mezer činí membránu tužší a pevnější. Podobně je to i u DPPC, které má sice řetězce rovné, ale i přesto je jasně vidět, že cholesterol membránu ovlivňuje. U ceramidů dochází pouze k velmi pozvolným změnám. Rozdíl mezi membránami DOPC a DPPC je největší, když neobsahují žádný cholesterol. Čím více je v těchto membránách obsaženo cholesterolu, tím více jsou si podobné.

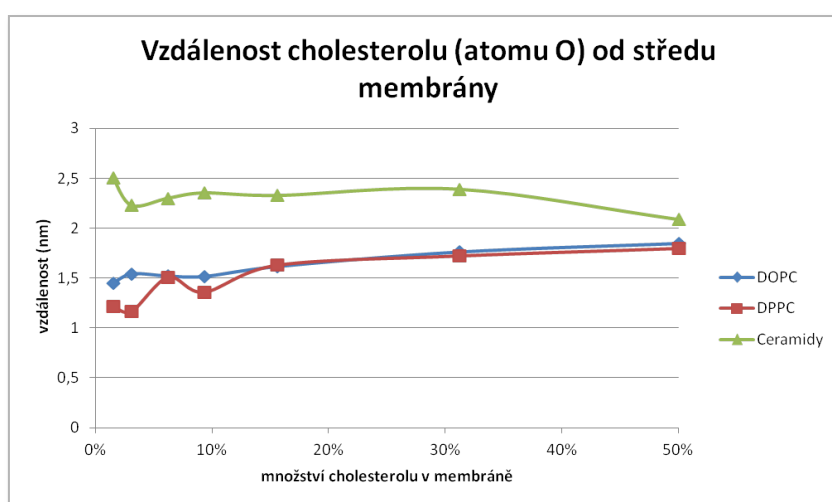


Graf 5: Závislosti proměnné plochy potřebné pro jeden lipid na množství cholesterolu v membráně

## 5.3 Hustota atomů

### 5.3.1 Cholesterol

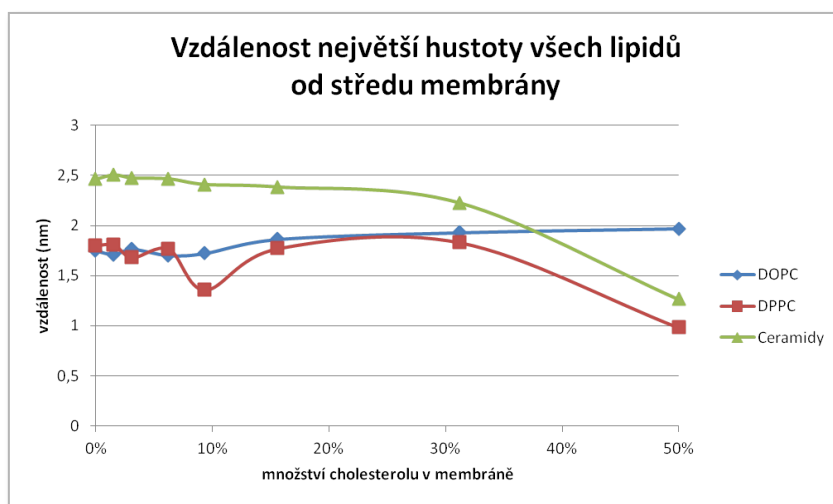
Podle výsledků můžeme usoudit, že se cholesterol vyskytuje uprostřed monovrstvy. U glycerofosfolipidů dochází přibližování cholesterolu k hlavám fosfolipidů s jeho vzrůstajícím zastoupením v membráně. Naopak čím více cholesterolů je v membráně ceramidů, tím více se cholesterol pohybuje doprostřed membrány. Rozdíl v poloze cholesterolu mezi jednotlivými membránami se s přidáváním cholesterolu postupně snižuje.



Graf 6: Vzdálenost atomu O v molekule cholesterolu od středu membrány v závislosti na množství cholesterolu v membráně obsaženém.

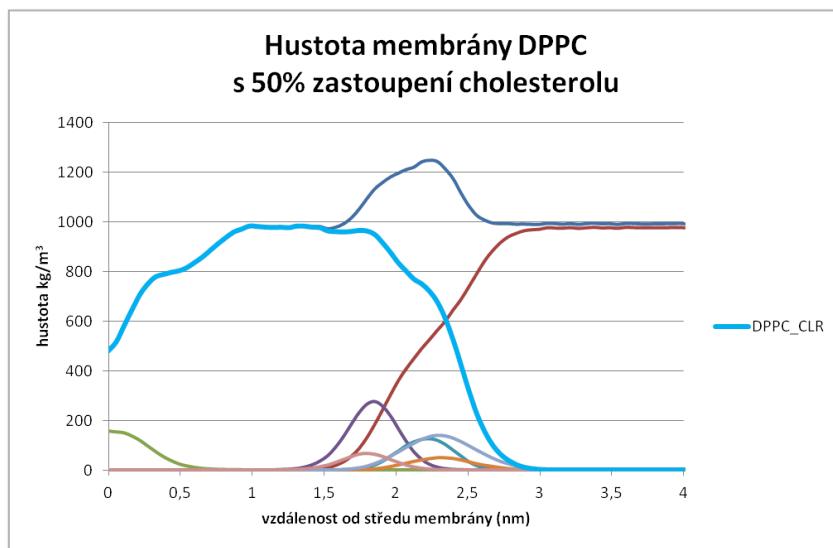
### 5.3.2 Všechny lipidy

U ceramidů můžeme popsat následující trend: se zvyšujícím se obsahem cholesterolu se stále více lipidů nachází blíže ke středu membrány. Usuzujeme, že je membrána užší nebo také tenčí. Glycerofosfolipidy mají podobný vývoj, u membrán z DOPC můžeme mluvit o mírném zvětšování vzdálenosti od středu membrány s přibývajícím cholesterolem. Totéž bychom mohli díky podobnému vývoji tvrdit i o membránách složených z DPPC, hodnota u membrány s 50 % obsahem cholesterolu toto tvrzení ale nepotvrzuje.



Graf 7: Vzdálenost největší hustoty všech lipidů od středu membrány

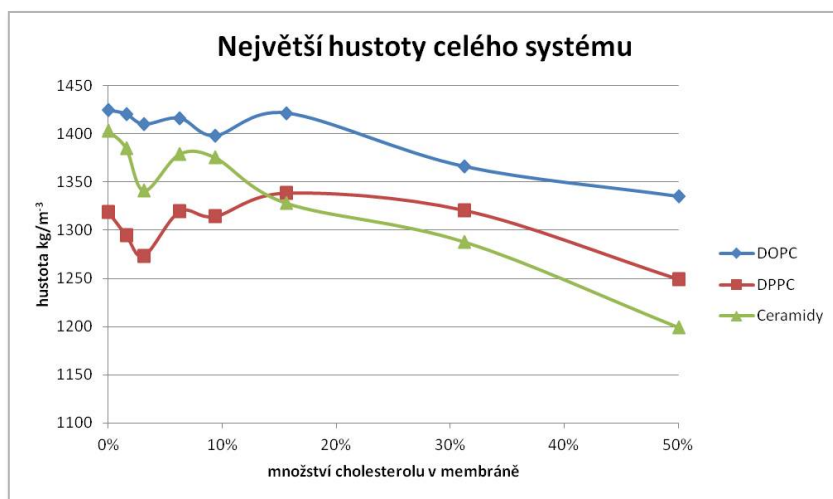
Překvapivý vývoj křivky u membrán DPPC (náhlý pokles při 50 % obsahu cholesterolu) pochází již z prvotní analýzy hustoty. Světle modrou barvou zvýrazněná křivka, zobrazující hustotu všech lipidů v membráně, postrádá klasický pík, jako všechny ostatní membrány (viz Graf 2: Hustoty vybraných skupin v systému). Nejvíce pravděpodobná je hypotéza, že výsledky ovlivnilo velké množství cholesterolu v membráně.



Graf 8: Hustota membrány DPPC s 50 % cholesterolu, světle modrou barvou zvýrazněná křivka vývoje hustoty všech lipidů (DPPC a cholesterolu dohromady)

### 5.3.3 Největší hustoty celého systému

Při malé koncentraci cholesterolu nelze pozorovat jasný trend, se zvyšujícím se obsahem cholesterolu už ale ano. Hustota celého systému klesá s přidáváním molekul cholesterolu.

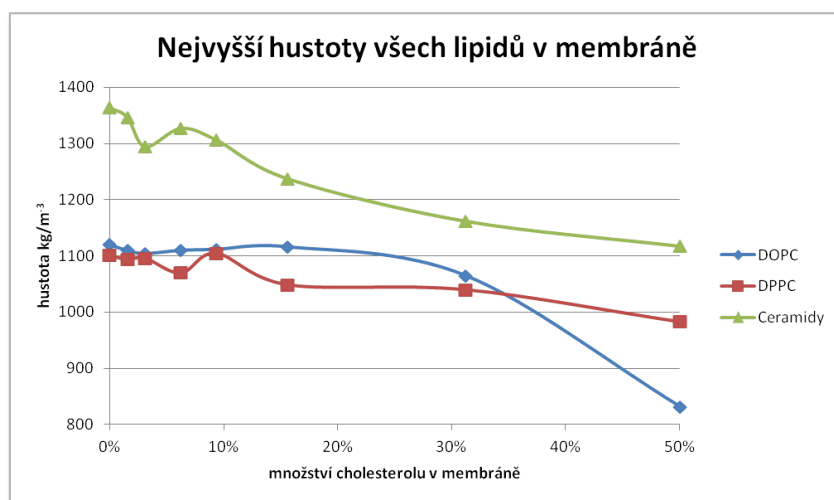


Graf 9: Největší hustoty celého systému v membránách

### 5.3.4 Největší hustoty všech lipidů v membráně

Při srovnávání nejvyšších hustot všech lipidů v systému můžeme sledovat pokles u všech typů membrán s narůstajícím množstvím cholesterolu. Pokud budeme srovnávat nejvyšší hustoty všech lipidů s nejvyššími hustotami celého systému, můžeme vyvodit množství vody, které se pohybuje mezi hlavami lipidů. Membrány ceramidů mají při nulovém obsahu cholesterolu téměř

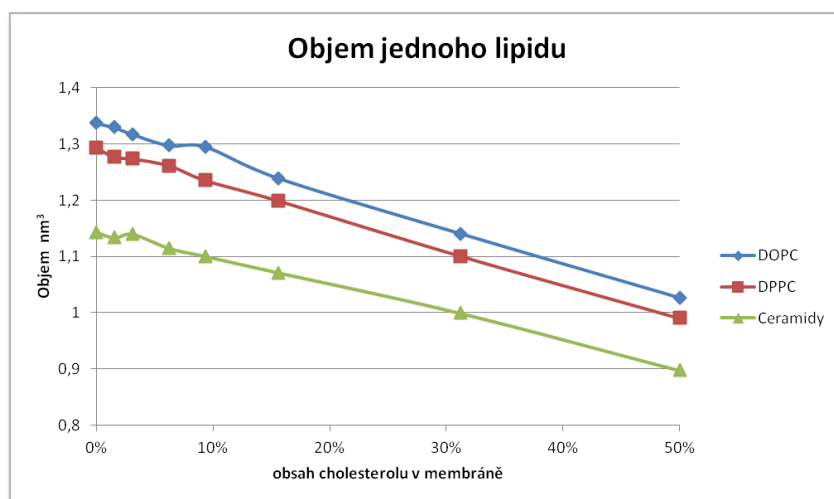
stejně obě hodnoty, z čehož vyplývá, že se mezi hlavami lipidů vyskytuje minimum vody. Nejvíce vody se mezi hlavami ceramidů vyskytuje, když obsahují 50 mol % cholesterolu. U membrán DOPC se množství vody opět s přidáním cholesterolu zvětšuje, hodně molekul vody je ale přítomno již při nulové koncentraci. Nejstabilnější vývoj pozorujeme u membrán DPPC.



Graf 10: Nejvyšší hustoty všech lipidů v membránách

### 5.4 Objem potřebný pro jeden lipid (volume per lipid)

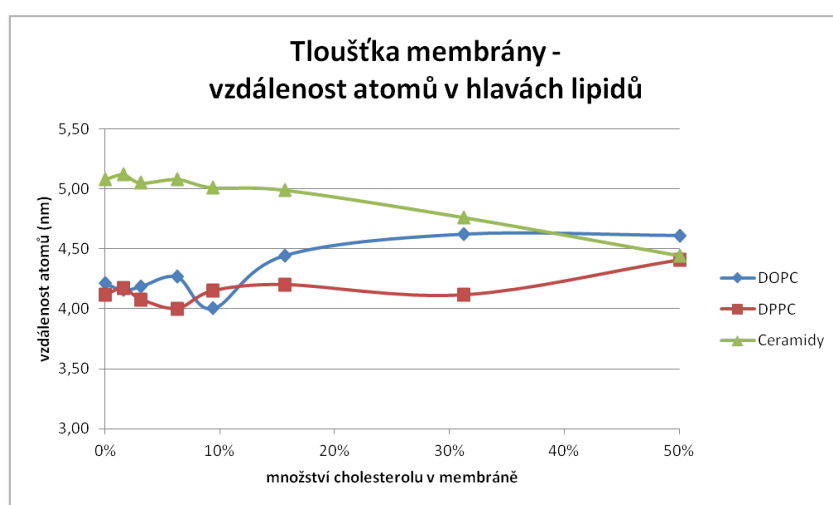
Objem jednoho lipidu v závislosti na cholesterolu přítomném v membráně se u všech membrán vyvíjí stejně. S vyšším obsahem cholesterolu se snižuje objem potřebný pro jeden lipid. Z toho můžeme usoudit, že cholesterol membránu zpevňuje a uspořádává.



Graf 11: Objem jednoho lipidu

## 5.5 Vzdálenost atomů (tloušťka membrány)

Zjištěním vzdálenosti atomů, které se nachází v hydrofilní části fosfolipidů, odvozujeme tloušťku membrány. U glycerofosfolipidů pozorujeme opět stejný trend, a to zvětšování této vzdálenosti s rostoucím množstvím cholesterolu. Ceramidy se chovají zcela opačně. Čím více cholesterolů v membráně je, tím menší je vzdálenost mezi hydrofilními hlavami. Membrány tvořené glycerofosfolipidy jsou tedy silnější (tlustější), pokud je v nich obsaženo více cholesterolu, zato membrány ze sfingolipidů se díky cholesterolům „smršťují“.



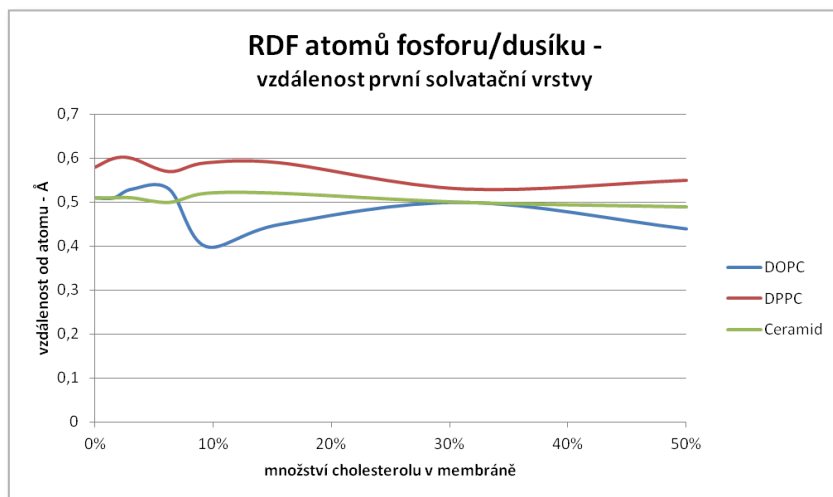
Graf 12: Tloušťka membrány

## 5.6 RDF (Radiální distribuční funkce)

Výsledky radiální distribuční funkce nám prakticky neodkryly žádné jasné trendy, proto ve výsledcích komentuji pouze zajímavé výsledky.

### 5.6.1 Vztah atomů v hydrofilních hlavách fosfolipidů (atomy fosforu nebo atomy dusíku)

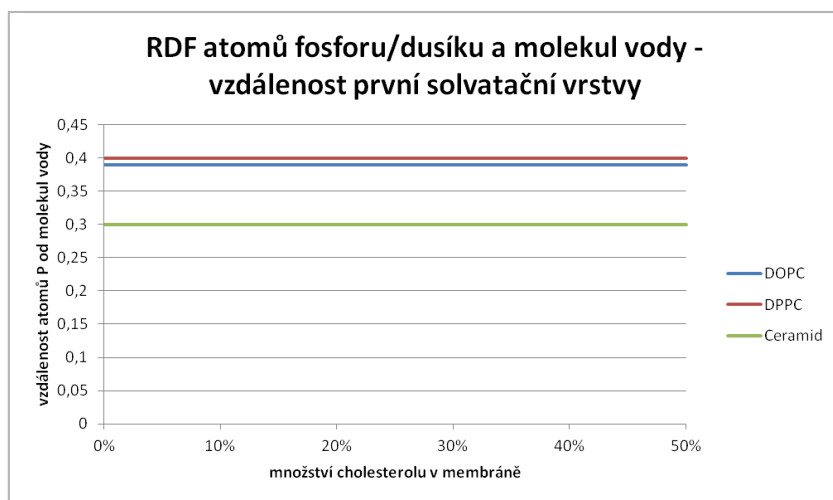
U membrán složených z glycerofosfolipidů nelze pozorovat výrazný trend. Zato první solvatační vrstva se u ceramidů s přibývajícím cholesterolem skoro nemění, z čehož lze usuzovat pravidelnost a strukturovanost těchto membrán.



Graf 13: RDF atomů fosforu (DOPC, DPPC) nebo dusíku (ceramidy)

### 5.6.2 Vztah atomů fosforu/dusíku k molekulám vody

Vzdálenost první solvatační vrstvy mezi atomy v hlavě fosfolipidu a vodou je naprosto konstantní. Molekuly vody se tedy nedostávají blíže k hlavním atomům hydrofilních hlav. Množství cholesterolu tedy neovlivňuje povrchové vlastnosti membrány.



Graf 14: RDF atomů fosforu/dusíku a molekul vody – vzdálenost první solvatační vrstvy

## 6 ZÁVĚR A DISKUZE

Bylo provedeno celkem dvacet čtyři simulací buněčných membrán složených z molekul DOPC, DPPC nebo Ceramidů 2. Jednotlivé membrány se lišily obsahem cholesterolu, který v nich byl přítomen. Simulace trvaly 200 ns.

Při pozorování jednotlivých membrán i při zkoumání výsledků se ukázalo, že rozdílné membrány s nulovou koncentrací cholesterolu se liší ve svých vlastnostech. Zatímco membrány z ceramidů jsou uspořádané a viskózní, membrány glycerofosfolipidů jsou spíše neuspořádané a fluidní.

Cholesterol výrazně ovlivňuje rozměry simulačního boxu. S postupným přidáváním cholesterolu do membrán se přibližují vlastnosti membrán DOPC a DPPC i přes to, že mají jiné řetězce. Lze tvrdit, že vlastnosti těchto lipidů ovlivňují hlavně polární hlavy, které mají DOPC i DPPC stejné. Membrány složené z Ceramidu 2 si zachovávají svou viskozitu a uspořádanost.

Při extrémním množství cholesterolu se vlastnosti všech membrán velmi přibližují. Pokud tedy bude v buněčné membráně obsaženo příliš velké množství cholesterolu, může to vést až ke změně vlastností membrány a tím i ke změně její funkčnosti.

Taktéž jsem srovnala výsledky našich analýz s již provedenými výzkumy. Pozorovala jsem sice jiné absolutní hodnoty, ovšem stejné celkové trendy. Rozdíly v absolutních hodnotách jsou způsobeny jiným obsahem použitého cholesterolu v membráně nebo (v případě plochy a objemu potřebného pro jeden

lipid) neoddělením lipidu a cholesterolu (viz výše). Jednotlivá data jsou zpracována v příloze IV.

Počítačové simulace jsou sice mladou vědeckou disciplínou, její význam a budoucnost bychom ale neměli podceňovat. V současné době probíhá na katedře fyzikální chemie UP v Olomouci srovnávání experimentálních výsledků se simulacemi za účelem určení co nejpřesnějšího silového pole, které by mělo být nadále pro výzkumy používáno. Toto srovnávání přináší zajímavé výsledky a ukazuje se, že hodnoty z počítačových simulací se od hodnot naměřených experimentálně zásadně neliší.

Věřím, že tato práce bude zdrojem pro další analýzy chování buněčných membrán. Po vytvoření více simulačních boxů s jinými poměry mezi cholesterolem a lipidy by mohly být jasněji definovány jednotlivé trendy a tím i upřesněny dosavadní výsledky. Na stávajících membránách je možné provést několik dalších analýz, které by ukázaly další změny, které cholesterol vyvolává.



## 7 REFERENCE

### Literatura

1. HOFSSÄB, Christofer, LINDAHL, Erik and EDHOLM, Olle. Molecular Dynamics Simulations of Phospholipid Bilayers with Cholesterol. *Biophysical Journal*. 2192–2206. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1302786/>. [Online]
2. MARTINEZ-SEARA, Hector, RÓG, Tomasz, PASENKIEWICZ-GIERULA, Marta, VATTULAINEN, Ilpo, KARTTUNEN, Mikko and REIGADA, Ramon. Interplay of Unsaturated Phospholipids and Cholesterol in Membranes: Effect of the Double-Bond Position. *Biophysical Journal*. 1 October 2008, Sv. Volume 95, Issue 7, ISSN 0006-3495. p.3295-3305.
3. VOET, Donald. *Biochemie*. 1. vyd. VICTORIA PUBLISHING, 1995, 1325 s. ISBN 80-856-0544-9. s. 297-340.
4. ALBERTS, Bruce. *Biochemie: úvod do molekulární biologie buňky*. 2. vyd. Překlad Arnošt Kotyk, Bohumil Bouzek, Pavel Hozák. Ústí nad Labem: Espero, 1998, 1 sv. ISBN 80-902-9062-0.
5. MCMURRY, John. *Organická chemie*. Vyd. 1. V Brně: VUTIUM, 2007, xxv, 1176, 61, 31 s. Překlady vysokoškolských učebnic. ISBN 978-80-214-3291-8.
6. OHVO-REKILÄ H., RAMSTEDT B., LEPPIMÄKI P., SLOTTE JP. Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. *Progress in Lipid Research*. 2002, Sv. 41, p. 66-97.
7. POUCHLÝ, Julius. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. Vyd. 3. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2008. ISBN 978-80-7080-674-6.
8. CAMPBELL, Neil A. a REECE, Jane B. *Biologie*. Vyd. 1. Brno: Computer Press, 2006. xxxiv, 1332 s. ISBN 80-251-1178-4.
9. LEACH, Andrew R. *Molecular modelling: principles and applications*. 2nd ed. New York: Prentice Hall, 2001. ISBN 05-823-8210-6.
10. PALONCÝOVÁ, Markéta. *Simulace látek na buněčných membránách* [online]. 2012 [cit. 2014-02-23]. Diplomová práce. UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Karel Berka. Dostupné z: <http://theses.cz/id/6o800e/>. [Online]

11. HOOPEES, Matthew I., NORO, Massimo, LONGO, Marjorie L., and FALLER, Roland: Bilayer Structure and Lipid Dynamics in a Model Stratum Corneum with Oleic Acid. *J. Phys. Chem. B.* 115(12). p. 3164-3171, (2011). Copyright © 2011 American Chemical Society
12. KOČA, Jaroslav. Kam se ubírá počítačová chemie - zaostřeno na modelování větších molekul. *Chemické listy.* 1998, Roč. 92, č. 2, s. 101-113. ISSN: 0009-2770 a 1213-7103 (elektronická verze), s. 101-113. [Online]
13. JUNGWIRTH, Pavel. Klasická a kvantová molekulová dynamika. <http://marge.uochb.cas.cz/~jungwirt/>. [Online]
14. SMONDYREV, Alexander M. a BERKOWITZ, Max L. Structure of dipalmitoylphosphatidylcholine/cholesterol bilayer at low and high cholesterol concentrations: molecular dynamics simulation. *Biophys J.* 1999 October. p. 2075–2089, 77(4):.
15. ZÁVODSKÁ, Radka. *Biologie buněk: základy cytologie, bakteriologie, virologie.* 1. vyd. Praha: Scientia, 2006. 160 s. *Biologie pro gymnázia.* ISBN 80-86960-15-3.
16. VOKURKA, Martin a Jan HUGO. *Velký lékařský slovník: úvod do molekulární biologie buňky.* 4. aktualiz. vyd. Překlad Arnošt Kotyk, Bohumil Bouzek, Pavel Hozák. Praha: Maxdorf, 2004, xv, 966 s. ISBN 80-734-5037-2.
17. VACÍK, Jiří et al. *Přehled středoškolské chemie.* 4. vyd., V SPN - pedagogickém nakladatelství 2. vyd. Praha: SPN - pedagogické nakladatelství, 1999. 365 s. ISBN 80-7235-108-7.
18. MAREČEK, Aleš a Jaroslav HONZA. *Chemie pro čtyřletá gymnázia: úvod do molekulární biologie buňky.* 1. vyd. Překlad Arnošt Kotyk, Bohumil Bouzek, Pavel Hozák. Olomouc: Nakladatelství Olomouc, 2000, 250 s. ISBN 80-7182-057-1.
19. KOČÁREK, Eduard. *Biologie člověka.* 1. vyd. Praha: Scientia, 2010. 2 sv. (336, 207 s.). *Biologie pro gymnázia.* ISBN 978-80-86960-47-0.

### **Internetové zdroje**

20. DOMAŇSKI, Jan, Oliver BECKSTEIN a Mark S. P. SANSOM. Lipidbook: A Public Repository for Force Field Parameters Used in Membrane Simulations. [online]. [cit. 2014-05-04]. Dostupné z URL: <http://lipidbook.bioch.ox.ac.uk/>



21. HOOPEES, Matthew I., Massimo NORO, Marjorie L. LONGO a Roland FALLER. Gromacs topology file for Ceramide NS (Cermide 2), C24:0. In: [online]. [cit. 2014-05-05]. Dostupné z: <http://www.chms.ucdavis.edu/research/web/faller/downloads/CR224.itp>
22. LHCHEM. Sphingolipids general structures.png. In: Wikipedia: the free encyclopedia [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2014-05-05]. Dostupné z: [http://en.wikipedia.org/wiki/File:Sphingolipids\\_general\\_structures.png](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Sphingolipids_general_structures.png)
23. SPOEL, D. van der, E. LINDAHL, B. HESS, A. R. van BUUREN, E. APOL, P. J. MEULENHOF, D. P. TIELEMAN, A. L. T. M. SIJBERS, K. A. FEENSTRA, R. van DRUNEN and H. J. C. Berendsen, Gromacs User Manual version 3.2,. Dostupné z URL: [www.gromacs.org](http://www.gromacs.org) (2004)
24. SARNITSKIY, Grigory. Lennard-Jones Radial Distribution Function. In: Wikipedia: the free encyclopedia [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2014-05-05]. Dostupné z: [http://en.wikipedia.org/wiki/File:Lennard-Jones\\_Radial\\_Distribution\\_Function.svg](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Lennard-Jones_Radial_Distribution_Function.svg)
25. KUKOL, A. Lipid Models for United-Atom Molecular Dynamics Simulations of Proteins. In: J. Chem. Theo. Comput. 2009 [cit. 2014-05-05]. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/journal/jctcce>
26. ATB, Mark AE a ET. AL. Force field for sterols, manuscript in preparation. In: [online]. 2010 [cit. 2014-05-05]. Dostupné z: <http://compbio.chemistry.uq.edu.au/atb/>
27. Berger lipid force field for DOPC. In: [online]. Oct 2007 [cit. 2014-05-05]. Dostupné z: <http://www.bioinf.uni-sb.de/RB>
28. Humphrey, W., Dalke, A. and Schulten, K., "VMD - Visual Molecular Dynamics", J. Molec. Graphics, 1996, vol. 14, pp. 33-38. Dostupné z URL: <http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>
29. Persistence of Vision Pty. Ltd. (2004), Persistence of Vision Raytracer (Version 3.6), [Computer software]. Dostupné z URL: <http://www.povray.org/download/>

## 8 SEZNAM OBRÁZKŮ A GRAFŮ

Obrázek 1: Buněčná membrána .....	9
Obrázek 2: Struktura molekuly cholesterolu.....	11
Obrázek 3: Molekuly cholesterolu v membráně .....	12
Obrázek 4: Tvary molekul lipidů, převzato z reference [7] .....	14
Obrázek 5: Schéma častého pohybu fosfolipidů.....	14
Obrázek 6: Schéma překlápění (flip-flop) [8] .....	15
Obrázek 7: Viskózní (uspořádaná) a fluidní (neuspořádaná) membrána .....	15
Obrázek 8: Simulační box .....	20
Obrázek 9: Molekula DOPC .....	21
Obrázek 10: Molekula DPPC .....	21
Obrázek 11: Molekula Ceramidu 2 .....	22
Obrázek 12: Molekula cholesterolu .....	22
Obrázek 13: Periodické okrajové podmínky .....	23
Obrázek 14: Výpočet radiální distribuční funkce .....	26
Obrázek 15: RDF vody, převzato z reference [24] .....	27
Obrázek 16: Membrány DOPC .....	29
Obrázek 17: Membrány DPPC.....	30
Obrázek 18: Flip-flop v membráně DPPC s 9 % cholesterolu.....	30
Obrázek 19: Membrány ceramidů.....	31
Obrázek 20: Schéma stavby glycerofosfolipidu.....	45
Obrázek 21: Sfingolipidy (převzato z reference [22]).....	47
Graf 1: Plocha potřebná pro jeden lipid .....	24
Graf 2: Hustoty vybraných skupin v systému .....	25
Graf 3: Vzdálenost atomů fosforu v membráně DPPC .....	26
Graf 4: RDF pro spodní a horní monovrstvu též membrány.....	28
Graf 5: Area per lipid (plocha potřebná pro jeden lipid).....	32
Graf 6: Vzdálenost atomu O v molekule cholesterolu od středu membrány .....	32
Graf 7: Vzdálenost největší hustoty všech lipidů od středu membrány .....	33
Graf 8: Hustota membrány DPPC s 50% cholesterolu .....	34
Graf 9: Největší hustoty celého systému v membránách .....	34
Graf 10: Nejvyšší hustoty všech lipidů v membránách.....	35



---

Graf 11: Objem jednoho lipidu .....	35
Graf 12: Tloušťka membrány .....	36
Graf 13: RDF atomů fosforu (DOPC, DPPC) nebo dusíku (ceramidy).....	37
Graf 14: RDF atomů fosforu/dusíku a molekul vody .....	37

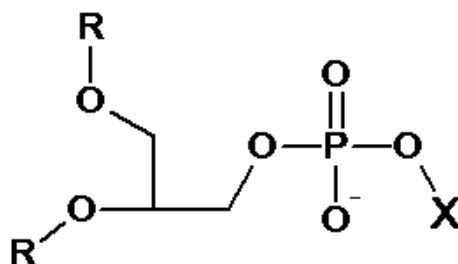
Všechny obrázky, grafy i tabulky jsem vytvořila sama. Výjimkou jsou obrázky 4, 15 a 21, které byly převzaty z uvedených referencí.

**9 SEZNAM PŘÍLOH**

PŘÍLOHA I: DRUHY LIPIDŮ V MEMBRÁNÁCH.....	45
PŘÍLOHA II: VÝPOČETNÍ VZTAHY MM A MD .....	48
PŘÍLOHA III: LIPOPROTEINY .....	50
PŘÍLOHA IV: SROVNÁNÍ VÝSLEDKŮ .....	51

**PŘÍLOHA I: DRUHY LIPIDŮ V MEMBRÁNÁCH**

**Glycerofosfolipidy** jsou tvořeny molekulou glycerolu, na který jsou esterovou vazbou připojeny dva acylové zbytky (R) odvozené od vyšší mastných kyselin (tabulka). Na poslední kyslík glycerolu je připojena polární fosfátová skupina, na kterou se v případě glycerofosfolipidů vážou skupiny odvozené od alkoholů (X). V tabulkách jsou zvýrazněny molekuly, s kterými jsme v této práci pracovali.



Obrázek 20: Schéma stavby glycerofosfolipidu

NÁZEV KYSELINY	VZOREC	POČET UHLÍKŮ : POČTU DVOJNÝCH VAZEB
Laurová	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$	12:0
Myristová	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$	14:0
Palmitová	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$	16:0
Stearová	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$	18:0
Arachidová	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$	20:0
Behenová	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{COOH}$	22:0
Lignocerová	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{COOH}$	24:0
Palmitoolejná	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	16:1
Olejová	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	18:1
Linolová	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_2(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$	18:2
Nervovová	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_{13}\text{COOH}$	24:1

Tabulka 2: Vyšší mastné kyseliny, jejichž acylové zbytky se nacházejí v glycerofosfolipidech

POLÁRNÍ SKUPINY ODVOZENY OD ALKOHOLŮ	VZOREC SKUPINY	NÁZEV FOSFOLIPIDU
Voda	- H	Fosfatidová kyselina
Etanolamin	- CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	Fosfatidylethanolamin (kefalin)
Cholin	- CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	fosfatidylcholin
Serin	- CH <sub>2</sub> CH(NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> )COO <sup>-</sup>	Fosfatidylserin (kefalin)
Glycerol	- CH <sub>2</sub> CH(OH)CH <sub>2</sub> OH	fosfatidylglycerol

Tabulka 3: Skupiny připojené na lipid v místě označeném písmenem X

#### Názvosloví:

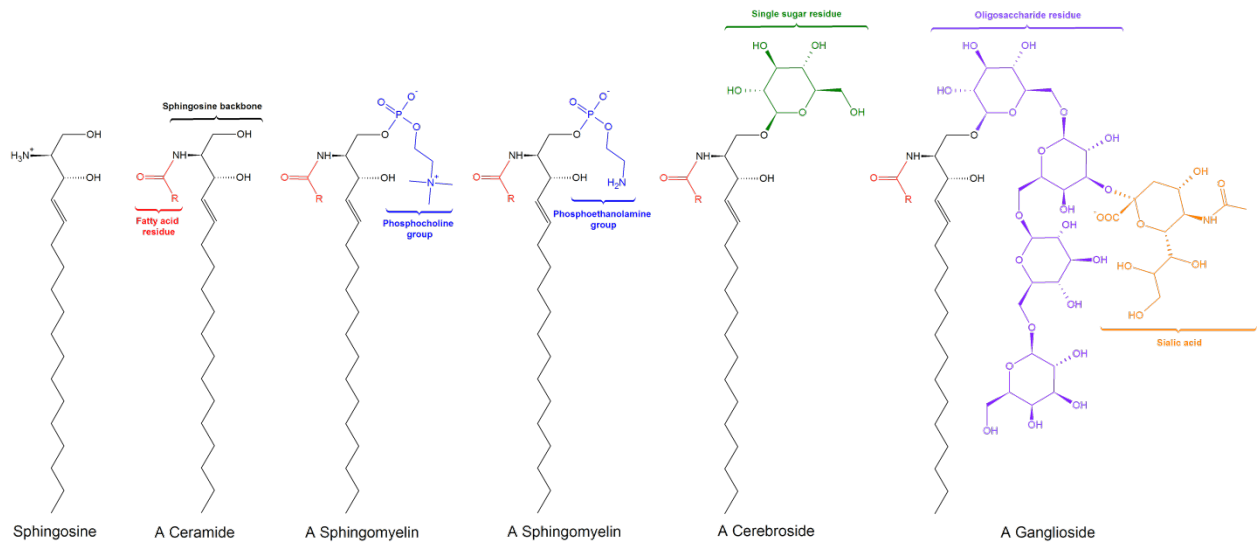
První dvě písmena charakterizují řetězce na lipidu, třetí a čtvrté pojmenovávají polární hlavičku.

DOPC **Di**Oleoyl**Phos**pho**Ch**olin - dioleoylfosfatidylcholin

DPPC **Di**Palmitoyl**Phos**ho**Ch**olin – dipalmitoylfosfatidylcholin

**Sfingolipidy** jsou tvořeny molekulou alkoholu sfingosinu, na který je přes amidovou vazbu navázán zbytek mastné kyseliny (Tabulka 2). Této struktuře se říká ceramid. Na něj mohou být, podobně jako v případě glycerofosfolipidů, navázány různé polární hlavičky (Tabulka 3) nebo sacharidy, čímž vznikají sfingomyeliny, cerebrosidy nebo gangliosidy.





Obrázek 21: Sřingolipidy (převzato z reference [22])



## PŘÍLOHA II: VÝPOČETNÍ VZTAHY MM A MD

Abychom získali hodnoty potenciální energie pro jednotlivé atomy, potřebujeme určit vztahy mezi nimi a popsat tedy, jak spolu navzájem interagují. Pro získání celkové energie sčítáme vazebné a nevazebné příspěvky k energii.

$$E = E_{vazebná} + E_{nevazebná}$$

Příspěvek vazebné energie můžeme rozepsat do jednotlivých vztahů:

### Energie vazeb

Vazby v molekulové mechanice chápeme jako pružiny, tedy jednoduché harmonické oscilátory. Pro vlastnosti pružiny v mechanice potřebujeme znát silovou konstantu pružiny. Výpočty probíhají podle rovnice:

$$E_{vazeb} = \frac{k_r}{2}(r - r_0)^2 \quad (4),$$

kde  $k_r$  je silová konstanta vazby,  $r$  je aktuální vzdálenost a  $r_0$  je rovnovážná vzdálenost atomů. Rovnovážná vzdálenost atomů je určena pro takovou délku vazby, při které je potenciální energie co nejmenší. Pokud tuto hodnotu odečteme od aktuální vzdálenosti atomů, dostaneme tzv. výchylku z rovnovážné polohy. Vazby mezi různými atomy mají i jiné parametry, takže například vazba mezi atomy vodíku v molekule  $H_2$  má jinou silovou konstantu a rovnovážnou vzdálenost vazby, než atomy vodíku a chlóru v molekule  $HCl$ .

### Energie vazebných úhlů

K výpočtu energetického příspěvku vazebných úhlů k celkové potenciální energii používáme podobný aparát jako k výpočtu energie vazeb. Vazebný úhel je rovněž charakterizován jako pružina, potřebujeme tedy podobné parametry:

$$E_{vú} = \frac{k_\theta}{2}(\theta - \theta_0)^2 \quad (5),$$

kde  $k_\theta$  je silová konstanta úhlu,  $\theta$  je aktuální úhel a  $\theta_0$  je rovnovážný úhel vazby.

### Energie nepřímých dihedrálních úhlů:

Opět počítáme podobným systémem

$$E_{dú} = \frac{k_\omega}{2}(\omega - \omega_0)^2 \quad (6),$$

$k_\omega$  je silová konstanta úhlu,  $\omega$  a  $\omega_0$  jsou aktuální a rovnovážný úhel vazby.

**Dihedrální (torzní úhel):**

K výpočtu příspěvku torzních úhlů potřebujeme znát množství ekvivalentních poloh v rámci  $360^\circ$  neboli multiplicitu.

$$E_d = \frac{k_\varphi}{2} (1 + \cos(n\varphi - \varphi_0)) \quad (7),$$

$k_\varphi$  je silová konstanta úhlu,  $n$  je multiplicita,  $\varphi$  a  $\varphi_0$  jsou úhel a rovnovážný dihedrální úhel.

**Coulombický potenciál/elektrostatická interakce**

Z Coulombova zákona, popisuje interakci dvou multipólů v monopólovém rozvoji.

$$E_c = \frac{1}{4\pi\epsilon_r\epsilon_0} \frac{q_i q_j}{r_{ij}} \quad (8),$$

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

**Lennard-Jonesův potenciál**

Počítá s nekovalentními interakcemi:

$$E_{LJ} = \left(\frac{c_{ij}}{r_{ij}}\right)^{12} - \left(\frac{c_{ij}}{r_{ij}}\right)^6 \quad (9),$$

parametry  $c_{ij}$  závisí na typech atomů,  $r_{ij}$  je vzdálenost těchto dvou atomů,  $c_{ij}$  van der Waalsův poloměr.

**Molekulová dynamika**

Z celkové potenciální energie vypočítá MD sílu, která působí na každý atom. Pomocí Newtonova zákona převede tuto energii na zrychlení, čímž ovlivní rychlost atomu.

$$F = m \times a \quad (10),$$

## PŘÍLOHA III: LIPOPROTEINY

Lipoproteiny jsou částice tvořené z nekovalentně asociovaných lipidů a proteinů nacházející se v krevní plazmě. Tvarem jsou podobné micelám, kulovité částice s nepolárním jádrem tvořeným triacylglyceroly a estery cholesterolu. Jádro je obklopeno obalem z proteinů, fosfolipidů a cholesterolu. Podle vlastností a funkcí dělíme lipoproteiny do hlavních pěti kategorií:

- Chylomikrony
- VLDL – endogenní triacylglyceroly, estery cholesterolu, cholesterol
- IDL – estery cholesterolu, triacylglyceroly, cholesterol
- LDL – estery cholesterolu, cholesterol, triacylglyceroly
- HDL – estery cholesterolu, cholesterol

### **Chylomikrony**

Transportují exogenní triacylglyceroly a cholesterol ze střev do tkání.

### **Lipoproteiny s velmi nízkou hustotou (VLDL), střední hustotou (IDL) a s nízkou hustotou (LDL)**

Přenášejí vnitřní triacylglyceroly a cholesterol z jater do tkání. LDL je hlavním přenašečem cholesterolu v krevním řečišti [3]. LDL je přijímáný receptorem na povrchu plazmatické membrány, shlukuje se s ostatními proteiny a poté je ve váčku vtažen do buňky (endocytóza). Díky tomuto mechanismu je v plazmatické membráně neustále dostatek cholesterolu. Vysoká koncentrace cholesterol vážící se na tuto částici v krvi může zapříčinit aterosklerózu (proto se mu často přezdívá „zlý cholesterol“).

### **Lipoproteiny s vysokou hustotou**

Přenášejí endogenní cholesterol z tkání do jater („hodný cholesterol“). Obsahují méně lipidů než LDL.

## PŘÍLOHA IV: SROVNÁNÍ VÝSLEDKŮ

Srovnání hodnot pro membrány s DOPC									
Plocha potřebná pro jeden lipid									
SOČ	cholesterol v membráně	0 mol %	2 mol %	3 mol %	6 mol %	9 mol %	16 mol %	31 mol %	50 mol %
		0,576	0,564	0,575	0,577	0,549	0,530	0,469	0,432
REFERENCE [1]	cholesterol v membráně	0 mol %			5 mol %	10 mol %	15 mol %	25 mol %	40 mol %
		0,635			0,583	0,582	0,573	0,554	0,542
Objem potřebný pro jeden lipid									
SOČ	cholesterol v membráně	0 mol %	2 mol %	3 mol %	6 mol %	9 mol %	16 mol %	31 mol %	50 mol %
		1,294	1,276	1,274	1,261	1,235	1,199	1,100	0,990
REFERENCE [1]	cholesterol v membráně	0 mol %			5 mol %	10 mol %	15 mol %	25 mol %	40 mol %
		1,225			1,213	1,211	1,212	1,198	1,189
Vzdálenost atomů P (tloušťka membrány) (nm)									
SOČ	cholesterol v membráně	0 mol %	2 mol %	3 mol %	6 mol %	9 mol %	16 mol %	31 mol %	50 mol %
		4,11	4,17	4,08	4,00	4,15	4,20	4,11	4,41
REFERENCE [2]	cholesterol v membráně						20 mol %		
							4,04		
Vzdálenost atomu O (cholesterolu) od středu membrány (nm)									
SOČ	cholesterol v membráně	0 mol %	2 mol %	3 mol %	6 mol %	9 mol %	16 mol %	31 mol %	50 mol %
			1,22	1,16	1,51	1,36	1,63	1,72	1,80
REFERENCE [14]	cholesterol v membráně					11 mol %			50 mol %
						1,55			1,82

Tabulka 4: Srovnání výsledků s referencemi