



TŘI PŘÍSTUPY K POČÍTAČOVÉMU MODELOVÁNÍ STRUKTURY A INTERAKCÍ VELKÝCH MOLEKUL

K. Huml¹, J. Vondrášek²

¹Ústav makromolekulární chemie, Akademie věd České republiky, Heyrovského nám.2,
162 06 Praha 6

²Ústav organické chemie a biochemie, Akademie věd České republiky, Centrum pro komplexní
biomolekulární systémy a biomolekuly, Flemingovo nám.2,
166 10 Praha 6

Abstract

Different complementary approaches to the modelling of molecular structures can be applied. These are first of all the approaches based on atomic resolution of molecules and the methods of statistical thermodynamics connecting atomistic approach with the phenomenological methods of thermodynamics.

Keywords: molecular modelling, molecular mechanics, molecular dynamics, chemical thermodynamics

Abstrakt

K počítačovému modelování molekulárních struktur a molekulárních interakcí lze přistupovat různými způsoby, které se vzájemně doplňují. Jsou to především postupy vycházející z atomového rozlišení molekul, dále pak metody statistické termodynamiky, které spojují atomový přístup s fenomenologickými metodami termodynamiky.

1. Úvod

Vzájemné rozpoznávání a interakce molekul jsou předmětem zájmu mnoha oborů chemie, jako jsou například chemie enzymů, protilátek, léčiv a syntetických receptorů. V několika posledních desítkách let se v těchto oblastech uplatnily metody počítačového modelování (computer-aided molecular modelling, CAMM), resp. molekulární simulace. Zvýšený zájem řady autorů [1, 2] o tyto metody se setkával se skepsí jiných odborníků [3-6], jejichž odmítavý postoj vyplýval ze složitosti problémů a omezených možností výpočetní techniky. Ukázalo se, že střední cesta založená na kritickém přístupu k problematice a ověřování výsledků na základě experimentu jsou východiskem z uvedeného dilematu.

V následujících kapitolách si načrtneme tři standardní přístupy užívané v počítačovém modelování. Především jsou to mikroskopické metody vycházející z popisu molekul v atomovém rozlišení. Na ně navazují metody statistické termodynamiky, jejichž úkolem je simulovat makroskopické vlastnosti molekulárních systémů na základě mikroskopických modelů [7]. Statistická termodynamika tak tvoří most mezi přístupem mikroskopickým

a makroskopickým, který je reprezentován fenomenologickými metodami termodynamiky a kinetiky.

Po stránce výpočetní se v oblasti modelování velkých molekul uplatní především postupy založené na molekulární mechanice a proto se o nich zmíníme podrobněji. Přesnější metody kvantové mechaniky jsou zde aplikovány spíše jen na řešení některých speciálních úloh, jako je výpočet rozložení nábojů na molekulárních fragmentech a podobně. Pro vlastní modelování velkých molekul by byly časově i metodicky příliš náročné.

Zajímavá je kombinace obou metod, kdy kvantově mechanickými postupy řešíme úlohy jako jsou tvorba a zánik kovalentních vazeb, zatímco ostatní části problému jsou řešeny metodami molekulární mechaniky [1, 8, 9].

2. Mikroskopický přístup

Na této úrovni hovoříme o molekulárním modelování, kdy se na základě mikroskopických modelů snažíme vysvětlit strukturu molekul, jejich funkce a interakce [7]. V obecném případě jsou modely molekul sestavovány z jednotlivých atomů (metody *de novo*, anglicky též *from the scrab*) [10, 11] nebo molekulárních fragmentů (anglicky *fragment-based methods*) [12, 13]. Postupy vycházející ze znalosti třírozměrné struktury alespoň jednoho z partnerů (např. receptoru) jsou v anglické literatuře označovány jako „structure-based methods“, resp. „rational design“ [14-17]. Termín homologické modelování (anglicky též *knowledge-based modelling, comparative modelling*) [18-22] je použit v případech kdy je známa trojrozměrná struktura homologické sloučeniny (např. bílkoviny), v níž nahradíme její část fragmentem modelované látky, aniž bychom výrazně změnil výchozí třírozměrnou strukturu. Inverzní modelování (anglicky též *inverse folding*) označuje postup, kdy danou třírozměrnou strukturu tvoříme z primární struktury tak, aby její prostorový tvar nebyl narušen [23]. Je to vlastně extrémní případ homologického modelování, kdy jsou v případě proteinů nahrazeny všechny aminokyselinové zbytky. Další postupy molekulárního modelování s atomovým rozlišením nalezneme např. v publikacích [24-28].

2.1 Molekulární mechanika (MM)

Pro tvorbu a hodnocení jednotlivých modelů s atomovým rozlišením se nejčastěji užívá metod založených na molekulární mechanice, která charakterizuje molekuly

pomocí potenciální energie (energy-based molecular modelling) [7, 29]. V molekulární mechanice bývá potenciální energie zavedena jako rozvoj funkcí vyjadřujících intramolekulární a intermolekulární síly Coulombovy, van der Waalsovy, dipólové, případně další síly, které nezávisí na intramolekulárních vazbách. Jsou proto nazývány potenciály ne vazebnými. Druhou skupinu tvoří tzv. vazebné potenciály vyjadřující síly vzniklé v důsledku odchylek vazebných parametrů (délky vazeb, valenční úhly, torzní úhly a pod.) navržené struktury od tabulkových hodnot stanovených experimentálně (nebo teoreticky) pro podobné látky jako je náš model. Tato skupina dílčích potenciálů, a tím i celkový potenciál užívaný v molekulární mechanice, je veličina relativní, vztažená k hypotetické střední struktuře jistých reprezentativních látek [30, 31]. Zde leží jedna ze zásadních potíží molekulární mechaniky: správná volba potenciálů. Autoři jednotlivých programů [32] užívaných v molekulární mechanice se proto snaží, aby jejich potenciály a konstanty v nich uložené, byly co nejobecnější. Tak postupně vznikly známé systémy potenciálů CVFF (Consistent Valence Forcefield), CFF91 (second generation, or class II, forcefield), ESFF (Extensible Systematic Forcefield), AMBER a další, které jsou sestavovány na základě experimentálních výsledků, případně i kvantové mechaniky.

Molekulární mechanika dovoluje takto navržený model optimalizovat metodami minimalizace potenciální energie. Obvykle jsou to algoritmy největšího spádu (steepest descent) nebo konjugovaných gradientů. Prvý postup má větší poloměr konvergence (tj. dovede optimalizovat i počáteční model značně vzdálený od optimálního), avšak pomalu konverguje v blízkosti hledaného minima potenciální energie. U metody konjugovaných gradientů je tomu právě naopak a proto se oba přístupy obvykle kombinují.

Pomocí molekulární mechaniky lze tedy sestavený model dané molekuly (resp. dvojice interagujících molekul) charakterizovat potenciální energií a následně ho optimalizovat. Výsledkem je právě jediný model. Vše se děje se zanedbáním kinetické energie, tj. výpočty probíhají pro teplotu absolutní nuly. V mnoha případech, jako např. v konformační analýze [33, 34], nás však zajímají i další možné konformace o nízké potenciální energii, případně model, kterému přísluší globální minimum potenciální energie. K tomu slouží metody, které procházejí konformačním prostorem a zaznamenávají jednotlivé konformace (bez optimalizace) a vytvářejí tak model statistického souboru všech možných konformací dané molekuly. Základním požadavkem je, aby takovéto metody byly ergodické, tj. aby postupně prošly celý konformační prostor. Potom lze nahradit výpočet časových středních hodnot molekulárních parametrů středováním přes soubor. Tomuto požadavku zajisté vyhovuje systematický výběr s pevně stanoveným krokem v konformačním prostoru. Časová náročnost, zejména u větších molekul, uvedený postup diskvalifikuje. Dáváme proto přednost takovým metodám, které upřednostňují výběr konformací v oblastech s nižší potenciální energií (anglicky *biased sampling*), tj. s vyšší pravděpodobností výskytu danou Boltzmannovým faktorem $\exp(-E/kT)$, kde E je potenciální energie, k je Boltz-

mannova konstanta a T je absolutní teplota. V následujícím si všimneme dvou takových postupů.

2.2 Molekulární dynamika (MD)

Tato metoda vychází z aplikace Newtonových pohybových rovnic klasické mechaniky na mikroskopický systém. Počáteční model je vystaven náhlému (nebo postupnému) "ohřevu" tak, že jednotlivým atomům je udělen náhodný impuls, přičemž množina všech impulsů působících na jednotlivé atomy vyhovuje Maxwellovu rozdělení energie odpovídající zvolené teplotě. Základní myšlenka použití tohoto postupu spočívá v předpokladu, že se atomy pohybují v poli konstantní potenciální energie. To je přibližně splněno po dobu řádově 1 fs. Potom je nutné potenciální energii systému znovu vypočítat vzhledem k nové geometrii molekuly a umožnit tak, aby systém postoupil na své trajektorii o další krok. Jde totiž o deterministický řetěz událostí, kdy stav předcházející jednoznačně určuje stav následující. V takto získaném souboru konformací je možno vyhledat oblasti s malou potenciální energií, tj. konformace s velkou pravděpodobností výskytu. K tomu nám slouží řada analytických metod, např. často užívaná metoda matice středních kvadratických odchylek (anglicky *RMS matrix*) [35, 36]. Uvedený postup hodnotí shodu geometrie každé nalezené konformace se všemi ostatními. Pro N konformací dostaneme tak symetrickou matici velikosti $N \times N$ s nulovou hlavní diagonálou a nízkými hodnotami podél ní, vzhledem k tomu, že dvě časově následující konformace jsou si obvykle blízké. Pokud jistá konformace leží v hlubokém minimu potenciální energie, pak systém jakoby "krouží" v příslušné potenciální jámě, dříve než překoná blízkou potenciální bariéru a pokračuje na své dráze v konformačním prostoru. To se projeví na korelační matici shlukem nízkých hodnot kolem příslušného bodu na hlavní diagonále, který přibližně reprezentuje konformaci odpovídající středu dané potenciální jámy. Mimodiagonální "ostrovy" nízkých hodnot nasvědčují tomu, že struktura má tendenci se vracet do některého potenciálního minima definovaného příslušným řádkem (resp. sloupcem), na kterém leží náš "ostrov". Tvar korelační matice ovšem závisí na zvolené teplotě simulace. Nízká teplota neumožňuje časté překonávání potenciálových bariér, takže systém setrvává po dlouhou dobu v některém lokálním minimu a výběr bodů v konformačním prostoru je velice omezen. Vysoká teplota simulace naopak "vyhání" systém z oblastí nízké potenciální energie a tak špatně detekuje hledané konformace. Z těchto důvodů se často používají postupy, kdy se systém pomalu ohřívá aby nedošlo na počátku simulace k velkým deformacím geometrie studované molekuly a posléze se opět pozvolna "chladí", aby bylo snadnější nalézt minima potenciální energie (tzv. *simulated annealing*) [7].

2.3 Metropolisova metoda Monte Carlo (MC)

Jak vyplývá z názvu Monte Carlo, jde o stochastickou metodu, jejíž modifikaci publikoval v roce 1953 Metropolis se svými spolupracovníky [37]. Proces začíná náhodným krokem z počátečního bodu A_0 konformačního



prostoru do nového bodu A_1 . Pokud změna potenciální energie ΔE vypočtená molekulární mechanikou je záporná, konformace v bodě A_1 se zaznamená do paměti a bod A_1 přijme se za nový počátek. Náhodný posun se pak opakuje do bodu A_2 . Jestliže je naopak ΔE kladná, potom se porovná hodnota Boltzmannova faktoru $\exp(-\Delta E/kT)$ s náhodně vybraným číslem z intervalu 0 až 1. Jestliže je Boltzmannův faktor větší než nalezená hodnota, přijme se konformace za nový počátek a pokračuje se v procesu do bodu A_2 . V opačném případě se vracíme do předcházejícího bodu a pokus s náhodným krokem v konformačním prostoru opakujeme.

Metropolisova metoda MC může při dostatečně vysoké teplotě T prohledávat i obtížně dostupné oblasti vysoké potenciální energie. Na druhé straně, zejména při nízké teplotě, obtížně překonává vyšší energetické bariéry a vykazuje tak pseudokonvergenci v místech lokálních minim [38]. Na rozdíl od metody MD, kde jsou pohybové rovnice integrovány numericky a vyžadují proto malý časový krok, Metropolisova metoda MC může volit i delší krok a tím i efektivněji prohledávat konformační prostor. Kroky lze navíc nasměrovat pouze do zajímavých oblastí, což je v angličtině označováno jako importance sampling nebo umbrella sampling [39].

3. Statistická termodynamika

Statistická termodynamika, jakožto součást statistické mechaniky, má za úkol z vlastností velkého výběru konformací molekul s atomovým rozlišením vysvětlit makroskopické vlastnosti molekul a jejich interakcí. Hovoříme o tzv. počítačové simulaci. Pomocí těchto metod lze například odvodit statistická analoga jednotlivých termodynamických veličin. Základní funkcí, kterou se snažíme získat ze souboru konformací je tzv. partiční funkce, která v případě kanonického souboru (konstantní počet částic N , objem V i teplota T) má tvar

$$Q = \sum_i \exp(-E_i / kT) \quad [N, V, T]$$

kde E_i je (celková) energie i -té molekuly, k je Boltzmannova konstanta a T je absolutní teplota [40]. Z partiční funkce Q lze pak odvodit analoga termodynamických funkcí, jako například Helmholtzovy energie, pro kterou platí

$$F = -kT \ln Q$$

Absolutní hodnoty Helmholtzovy energie jsou však našim metodám nedostupné [41]. V praxi nás však často zajímá spíše změna Helmholtzovy energie při přechodu mezi dvěma rovnovážnými stavy $A \rightarrow B$

$$\Delta F = -kT \ln \frac{Q_B}{Q_A}$$

kde jsou simulační metody již použitelné. V případě konstantního tlaku platí obdobný výraz i pro Gibbsovu energii G , která je nejčastěji užívanou funkcí při popisu chemických reakcí. Kvalita odhadu volné energie závisí na rozsahu a způsobu výběru v konformačním prostoru.

Ukazuje se, že zde spočívá druhá slabina počítačové simulace.

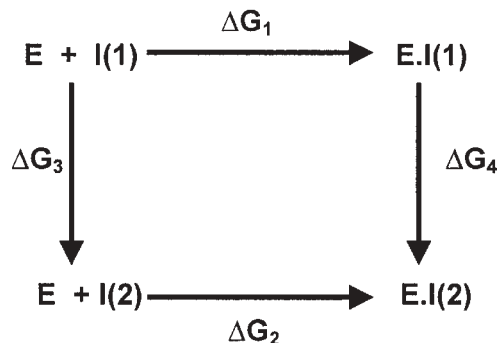
Připomeňme si, že Gibbsova energie je stavová funkce, a tudíž její změna může být počítána podél libovolné reversibilní cesty spojující počáteční a konečný stav systému [41]. Uvedená vlastnost však již neplatí pro jednotlivé složky Gibbsovy energie, na které je často rozkládána [42-51].

Pro úplnost uvádíme některé postupy užívané v oblasti molekulární simulace, jejichž součástí jsou metody molekulární dynamiky nebo Monte Carlo, generující základní soubory molekulárních konformací. Mezi nejznámější patří metoda perturbační (anglicky Free Energy Perturbation Method, FEP), která je rigorosní, ale velice náročná na výpočetní čas [1, 16, 41, 42, 52-55]. Alternativní postup je tzv. termodynamická integrace (TI, anglicky též Continuous-Coupling Technique) [1, 41, 54]. Třetí, často užívaná metoda je metoda pomalého růstu, která za určitých omezujících podmínek, vyplývá z minulých dvou metod [1]. Kombinací FEP a IT vznikla účinná metoda FDTI (Finite Difference Thermodynamic Integration) [56], která je užitá např. v programu DISCOVER fy BIOSYM [32].

Poněkud jinou filosofii používá postup známý pod anglickým názvem "Potential of Mean Force", kdy výpočet postupuje podél reakční cesty daného procesu, čímž umožňuje lepší výběr než ostatní metody [42, 52, 53]. Z novějších postupů jmenujme na tomto místě metodu lineární interakční energie (LIE) [57, 58] nebo metodu λ -dynamiky [42, 59, 60]. Klasifikace některých metod je uvedena v práci Lee et al [61].

4. Makroskopický přístup

Do této skupiny metod patří především chemická termodynamika a chemická kinetika. Obě metody vycházejí z postulátů odvozených z experimentů s makroskopickými objemy látek bez přihlídnutí k jejich atomové struktuře. Fenomenologické veličiny, které vystupují v teoreticky postulovaných vztazích, jsou při počítačovém modelování nahrazeny příslušnými analogy, odvozenými metodami



Obrázek 1. Termodynamický cyklus. Porovnání energie vazby enzymu E s inhibitorem $I(1)$, resp. $I(2)$. Změny ΔG_1 a ΔG_2 odpovídají chemickým cestám, změny ΔG_3 a ΔG_4 alchymistickým cestám.

statistické termodynamiky ze souborů získaných simulačními postupy.

4.1 Chemická termodynamika

Uvedený obor zkoumá výměnu energie mezi ustálenými stavy soustav a nezajímá se o časový průběh změn mezi nimi. Změna Gibbsovy energie je významnou mírou fyzikálních i chemických procesů, jako např. solvatace látek [52, 62, 63], inhibice enzymů [45, 61, 64, 65], vazby ligandů na proteiny včetně receptorů [47, 48, 66-69]. Dále pak v úlohách týkajících se interakce enzymu se substrátem [45, 70-73] a interakce protilátky s antigenem [71, 74]. Rovněž byly publikovány práce týkající se vlivu mutací na energii vazby [75-77], konformačních změn [78] nebo reakcí typu S_N2 [79].

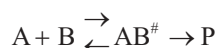
Často se využívá tzv. termodynamického cyklu, založeného na Hessově druhém termochemickém zákonu [80], který dovoluje volit cestu výpočtu, dostupnou při modelování. Jako příklad si uvedeme úlohu, kdy hledáme energii vazby mezi enzymem E a jeho inhibitorem I(1), respektive chemicky odlišným inhibitorem I(2). Lze předpokládat, že vyšší bariera svědčí o úspěšnější inhibici. Jestliže počáteční stavy i konečné stavy jsou rovnovážné, pak z obr.1 plyne rovnost

$$\Delta\Delta G = \Delta G_2 - \Delta G_1 = \Delta G_4 - \Delta G_3$$

To znamená, že rozdíl Gibbsových energií podél chemických cest (2 a 1) je roven rozdílu Gibbsových energií podél tzv. alchymistických cest (4 a 3). O alchymii se zde hovoří ve spojitosti s transmutací jednoho chemicky odlišného inhibitoru v druhý [52]. Tuto transmutaci lze simulovat na počítači například metodami, které jsme uvedli v předcházející kapitole a vyhnout se tak výpočtu (či experimentu) podél chemické cesty.

4.2 Chemická kinetika

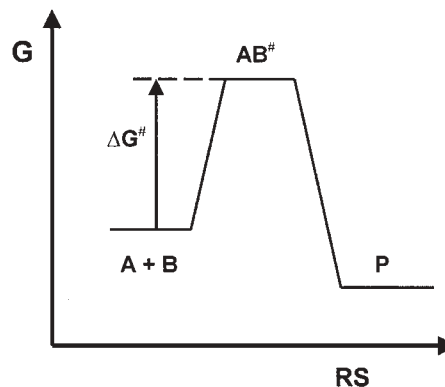
V protikladu k termodynamice se chemická kinetika zajímá především o časový průběh reakcí a výpočet příslušných rychlostních konstant. Počítačové modelování v této oblasti obvykle vychází z Eyringovy teorie [81, 82], tzv. aktivovaného komplexu [31, 72, 83-87], který je transičním stavem AB^\ddagger na reakční cestě od reaktantů A a B k produktům P (obr.2)



Přestože je aktivovaný komplex nestabilní, autoři uvedené teorie s ním pracovali jako se stavem rovnovážným [88, 89] a dospěli v jednoduchém případě ke vztahu mezi rychlostní konstantou k dopředné reakce a Gibbsovou aktivační energií ΔG^\ddagger ve tvaru

$$k = (kT/h) \exp(-\Delta G^\ddagger / RT)$$

kde R je plynová konstanta [40, 89-96]. Jestliže se na reakční cestě nachází více transičních stavů, pak je úloha složitější. Pokud mezi transičními stavy jeden co do výšky



Obrázek 2. Průběh Gibbsovy energie G podél reakční souřadnice RS . Symboly A , B značí reaktanty, AB^\ddagger aktivovaný komplex (transiční stav), P produkt a ΔG^\ddagger aktivační energii.

energetické bariéry dominuje, pak lze úlohu výrazně zjednodušit [97].

V řadě případů, jako například u některých enzymatických reakcí, je v blízkosti vrcholu aktivovaného komplexu lokální minimum Gibbsovy energie, (hlubší než kT), což umožňuje tvorbu reaktivního meziprojektu [31, 71, 88, 98-100] zjizitelného i experimentálně [101-103]. Takovýmto reaktivním meziprojektu je u katepsinu B, resp. u a-chymotrypsinu, acylenzym v tetraedrickém uspořádání, který je vhodným objektem modelování struktury v blízkosti transičního stavu, a tím i odhadu aktivační energie daného reakčního kroku. Vyšší rychlostní konstanta k může svědčit o vhodnějším substrátu daného enzymu.

5. Závěr

Počítačové modelování struktur molekul a interakce molekul prošlo během posledních dvaceti let rychlým vývojem. Řada prací prokázala dobrou shodu mezi teoreticky odvozenými počítačovými modely a realitou. Teprve budoucnost však ukáže, do jaké míry lze naše poznatky o stavbě a chování látek formulovat teoreticky na takové úrovni, že počítačové řešení plně nahradí chemický experiment experimentem počítačovým. V každém případě je již dnes jasné, že počítačové modelování má svá dětská léta za sebou. Jeho nejrozšířenější využití pro návrh léčiv v mnohém předznamenalo jeho další použití a rozvoj.

Tato práce byla podpořena Grantovou agenturou České republiky (grant 307/96/K226), Ministerstvem průmyslu a obchodu České republiky (grant #PP-Z1/24/99) a Ministerstvem školství (projekt LN00A032 - Centrum pro komplexní biomolekulární systémy a biomolekuly)

Literatura

1. P. Kollman: *Chem. Rev.* **93** (1993) 2395.
2. S. Boresch, M. Karplus: *J. Mol. Biol.* **254** (1995) 801.
3. J. Hermans: *Protein* **17**, (1993) ii.



4. Y.Y. Shi, A.E. Mark, C.-X. Wang, F. Huang, H.J.C. Berendsen, W.F. van Gunsteren : *Protein Eng.* **6** (1993) 289.
5. S. Yun-Yu et al: *Protein Eng.* **6** (1993) 289.
6. A.E. Mark, W.F. van Gunsteren: *J. Mol. Biol.* **240** (1994) 167.
7. J.-P. Doucet, J. Weber: *Computer-Aided Molecular Design*, London : Academic Press (1996).
8. W.L. Jorgensen: *Acc. Chem. Res.* **22** (1989) 184.
9. A. Warshel : *Computer Modeling of Chemical Reactions in Enzymes and Solutions*. New York : Wiley-Interscience (1991).
10. S. Borman: *S et EN* **70** (1992) 18.
11. J.S. Richardson, D.C. Richardson, N.B. Tweedy, K.M. Gernet, T.P. Quin, M.H. Hecht, B.W. Erickson, Y. Yan, R.D. McClain, M.E. Donlan, M.C. Surles : *Biophys. J.* **63** (1992) 1186.
12. S.H. Rothstein, M.A. Murcko: *J. Med. Chem.* **36** (1993) 1700.
13. S.H. Rothstein, M.A. Murcko: *J. Mol. Graphics* **12** (1994) 78.
14. J.A. Dimasi et al: *Drug Devel. Clin. Pharm. Ther.* **50** (1991) 471.
15. Y.S. Babu, S.E. Ealick, C.E. Bugg, M.D. Erion, W.C. Guida, J.A. Montgomery, J.A. Secrist : *Acta Crystallogr.* **D51** (1995) 529.
16. M.K. Holloway et al: *J. Med. Chem.* **38** (1995) 305.
17. I.D. Kuntz: *Science* **257**, (1992) 1078.
18. T.L. Blundell, B.L. Sibanda. M.J.E. Sternberg, J.M. Thornton: *Nature* **326** (1987) 347.
19. K. Burt, C.W. Hutchins, J. Greer: *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1** (1991) 213.
20. W.R. Pitt, J.M. Murray-Rust J.M. Goodfellow: *J. Comput. Chem.* **14** (1993) 1007.
21. J. Bajorath: *Protein Sci.* **2** (1993) 317.
22. J. Bajorath: *Protein Sci.* **5** (1996) 240.
23. H.S. Chan, K.A. Dill: *Phys. Today* **42** (1993) 24, No 2.
24. T.C. Terwilliger et al: *Protein Sci.* **7** (1981) 1851.
25. R.A. Lewis: *J. Mol. Graphics* **10** (1993) 131.
26. M.A. Hendrickson , N.C. Nicklaus, G.W.A. Milne: *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **33** (1993) 155.
27. R.C. Glen, A.W.R. Payne: *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **9** (1995) 181.
28. N.L. Summers , M. Karplus: *J. Mol. Biol.* **210** (1989) 785.
29. H.J. Hoeltje, G. Folkers: *Molecular Modelling*, Munich: VCH, 1997, s.103.
30. D.F. DeTar, C.J. Tenpas: *J. Amer. Chem. Soc.* **98** (1976) 7903.
31. D.F. DeTar : *Biochemistry* **20** (1981) 1730.
32. DISCOVER, User guide, Part 1, Biosym Tech., San Diego, CA 92121-4778 (1994).
33. K. Huml, P. Soldán , W. Hummel: *Acta Crystallogr.* **A49(S)** (1993) C53.
34. T.M. Frimurer, G.H. Peters, M.D. Sorensen, J.J. Led, O.I. Olsen : *Protein Sci.* **8** (1999) 25.
35. D.H.J. Mackay, A.J. Cross, A.T. Hagler: in *Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation*, Ed. G. Fasman, New York : Plenum Press (1987) 317.
36. S.K. Burt, D. Mackay, A.T. Hagler: in *Computer-Aided Drug Design*, Ed. T.J. Perun and C.L. Propst, New York and Basel , M. Dekker, Inc., (1989).
37. N. Metropolis, A.W. Rosenbluth, M.N. Rosenbluth, A.H. Teller, E. Teller: *J. Chem. Phys.* **21** (1953) 1087.
38. B. Robsen, J. Garnier: *Introduction to Proteins and Protein Engineering*, Amsterrdam, New York, Oxford : Elsevier (1988).
39. J.P. Valleau, J. Torrie: *Statistical Mechanics*, Part A, Ed. B. Berne, New York: Plenum Press (1977).
40. E. Hála, A. Reiser: *Fysikální chemie 1,2* , Praha : ČSAV (1960, 1966).
41. W.F. van Gunsteren: in *Proc. Free Energy Perturbation Colloquium*, Ed. P. Weiner : Princeton Dec. 1987, Mass. USA.
42. X. Kong, C.L. Brooks, III: *J. Chem. Phys.* **105** (1996) 2414.
43. K.A. Dill: *USCF CAMD course*, San Francisco Jan 16-18 (1999).
44. M.S. Searle, D.H. Williams, U. Gerhard: *J. Amer. Chem. Soc.* **114** (1992) 10 697.
45. M.R. Pincus, H.A. Sheraga: *Chem. Ann. Soc.* **12** (1979) 633.
46. C.L. Brooks, III, M. Karplus, B.M. Pettit: *Adv. Chem. Phys.* **71** (1988) 59.
47. D.H. Williams et al: *J. Amer. Chem. Soc.* **113** (1991) 7020.
48. N. Froloff, A. Windemuth, B. Honig: *Protein Sci.* **6** (1997) 1293.
49. S. Vajda, Z. Weng, R. Rosenfeld, C. DeList: *Biochemistry* **33** (1994) 13977.
50. S. Krystek, T. Stouch, J. Novotny: *J. Mol. Biol.* **234** (1993) 661.
51. Ajay, M.A. Murcko: *J. Med. Chem.* **38** (1995) 4954.
52. B.L. Tembe, J.A. McCammon: *Comput. Chem.* **8** (1984) 281.
53. W.L. Jorgensen, C. Ravimohan: *J. Chem. Phys.* **83** (1985) 3050.
54. D.L. Beveridge, F.M. Di Capua: *Annu. Rev. Biophys. Chem.* **18** (1989) 431.
55. R.W. Zwanzig: *J. Chem. Phys.* **22** (1954) 1420.
56. P.G. Mezey: *Potential Energy Hypersurfaces*, Amsterdam : Elsevier (1987).
57. T. Hanson, J. Marelius, J. Aquist: *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **12** (1998) 27.
58. J. Marelius, Graffner-Nordberg, T. Hansson, A. Hallberg, J. Aquist: *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **12** (1998) 119.
59. Z. Guo, C.L. Brooks, III, X. Kong: *J. Phys. Chem.* **B102** (1998) 2032.
60. Z. Guo, C.L. Brooks, III: *J. Amer. Chem. Soc.* **120** (1998) 1920.

61. C.Y. Lee, P.K. Yang, W.S. Tzou, M.J. Hwang: *Protein Eng.* **11** (1998) 429.
62. M. Orosco, C. Alhambra, X. Barril, J.M. Lopez, M.A. Busqvets, F.J. Loque: *J. Mol. Model.* **2** (1996) 1.
63. V.C. Singh, F.K. Brown, P.A. Bash, P.A. Kollman: *J. Amer. Chem. Soc.* **109** (1987) 1607.
64. M. Shoken, D. Arad: *J. Mol. Model.* **2** (1996) 390.
65. S. Miertus: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **3** (1993) 2105.
66. T.P. Lybrand, J.A. McCammon, G. Wipff: *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **83** (1986) 833.
67. R. Wang, L. Liu, L. Lai, Y. Tang: *J. Mol. Model.* **4** (1998) 379.
68. G. Weber: *Adv. Protein Chem.* **29** (1975) 2.
69. H.-J. Boehm: *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **8** (1994) 243.
70. A.R. Fersht: *Biochemistry* **27** (1988) 1577.
71. G. Wipff, A. Dearing, P.K. Weiner, J.M. Blaney, P.A. Kollman: *J. Am. Chem. Soc.* **105** (1983) 997.
72. W.P. Jencks: *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **43** (1975) 219.
73. F.T.K. Lau, M. Karplus: *J. Mol. Biol.* **236** (1994) 1049.
74. J. Novotný, R. Brucolleri, F.A. Saul: *Biochemistry* **28** (1989) 4735.
75. J. Gao, K. Kutzera, B. Tidor, M. Karplus: *Science* **224** (1989) 1069.
76. H.H.L. Shih, J. Brady, M. Karplus: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82** (1985) 1697.
77. S.J. Wodak, M. Prévost: *Statistical Mechanics, Prot. Struct., and Prot. Substrate Interactions*, Ed. S. Doniah, New York: Plenum Press (1994).
78. A. Di Nola, H.J.C. Berendsen, O. Edholm: *Macromolecules* **17** (1984) 2044.
79. D.F. DeTar, N.P. Luthra: *J. Amer. Chem. Soc.* **102** (1980) 4505.
80. R. Brdička, M. Kalousek, A. Schütz: *Úvod do fyzikální chemie*, Praha: SNTL (1963).
81. H. Eyring: *J. Chem. Phys.* **3** (1935) 107.
82. H. Eyring: *Chem. Rev.* **17** (1935) 65.
83. J.-K. Hwang, A. Warshel: *Biochemistry* **26** (1987) 2669.
84. M. Sana, G. Reckinger, G. Leroy: *Theor. Chim. Acta* **58** (1981) 145.
85. A.R. Fersht: *Proc. R. Soc. London, Ser. B* **187** (1974) 397.
86. A. Kotyk, J. Horák: *Enzymová kinetika*, Praha: Academia (1977).
87. V. Massey: *Biochem. J.* **53** (1953) 72.
88. J.H. Noggle: *Physical Chemistry*, Glenview, Ill., Boston, London (1988).
89. K.J. Laidler, P.S. Bunting: *The Chemical Kinetics of Enzymes Action*, Oxford: Clarendon Press (1973).
90. I.T. Weber, R.W. Harrison: *Protein Eng.* **9** (1996) 679.
91. W.W. Leland: *Biochemistry* **14** (1975) 3220.
92. S. Glasstone, K.J. Laidler: *The Theory of Rate Processes*, New York, London: McGraw-Hill (1941).
93. K.J. Laidler, B. Peterman: in *Contemporary Enzyme Kinetics and Mechanism*, Ed. D.L. Purich, New York, London: Acad. Press (1983) 149.
94. A.A. Frost, R.G. Pearson: *Kinetics and Mechanism*, New York, London: J. Wiley and Sons (1961).
95. I.H. Segal: *Enzyme Kinetics*, New York, London etc.: Wiley-Interscience (1975).
96. D.V. Roberts: *Enzyme Kinetics*, Cambridge: Cambridge Univ. Press (1977).
97. K. Huml: *Mater. Struct.*, v. 6 (1999) v tisku.
98. M.R. Pincus, H.A. Sheraga: *Acc. Chem. Res.* **14** (1981) 299.
99. J.W. Caldwell, D.A. Agard, P.A. Kollman: *Proteins* **10** (1991) 140.
100. M. Dixon, E.C. Webb: *Enzymes*, 3rd ed., London: Longman Group Ltd (1979).
101. M.W. Hunkapiller, M.D. Forgac, J.H. Richards: *Biochemistry* **15** (1976) 5581.
102. S. Rejander: *J. Amer. Chem. Soc.* **92** (1971) 1378.
103. B. Capon, A.K. Ghost, D.McL.A. Grieve: *Acc. Chem. Res.* **14** (1981) 306.