

Molekulová dynamika dvou řetězců hyaluronanu ve směsných rozpouštědlech (virtuální experiment)

Bc. Alena Kolaříková

Diplomová práce
2021



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav inženýrství polymerů

Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Alena Kolaříková**
Osobní číslo: **T19392**
Studijní program: **N0722A130001 Inženýrství polymerů**
Studijní obor: **Inženýrství polymerů**
Forma studia: **Prezenční**
Téma práce: **Molekulová dynamika dvou řetězců hyaluronanu ve směsných rozpouštědlech (virtuální experiment)**

Zásady pro vypracování

Molekulová dynamika, jedna z metod výpočetní chemie, umožňuje interpretovat výsledky experimentů na základě chování jednotlivých atomů. Virtuální a skutečný experiment se úspěšně doplňují například při studiu stavby makromolekul a jejich solvátového obalu.

Cílem práce je popsat interakce dvou řetězců hyaluronanu v čisté vodě a ve směsích vody a organických látek na základě simulací v programu NAMD. Zaměřit by se měla především na analýzu všech typů vodíkových vazeb, které podstatnou měrou ovlivňují sekundární a terciální strukturu makromolekul.

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam doporučené literatury:

1. Almond A., Multiscale modeling of glycosaminoglycan structure and dynamics: current methods and challenges. *Current Opinion in Structural Biology* 50, 58-64 (2018).
2. Tomobe K., Yamamoto E., Yasui M., Yasuoka K., Effect of temperature, concentration, and isomer on the hydration structure in monosaccharide solutions. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 19, 23, 15239-15246 (2017).
3. Bełdowski P., Mazurkiewicz A., Topoliński T., Małek T., Hydrogen and Water Bonding between Glycosaminoglycans and Phospholipids in the Synovial Fluid: Molecular Dynamics study. *Materials* 12, 2060 (2019).
4. Payne W. M., Svehkarev D., Kyrychenko A., Mohs A. M., The role of hydrophobic modification on hyaluronic acid dynamics and self-assembly. *Carbohydr Polym* 182, 132-141 (2018).

Vedoucí diplomové práce: **RNDr. Eva Kutálková, Ph.D.**
Ústav fyziky a mater. inženýrství

Datum zadání diplomové práce: **1. února 2021**
Termín odevzdání diplomové práce: **14. května 2021**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

Ing. Jana Navrátilová, Ph.D.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ AUTORA DIPLOMOVÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

- diplomová práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – diplomovou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- pokud bylo k vypracování diplomové práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem diplomové práce jakýkoliv softwarový produkt, považuji se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Prohlašuji,

- že jsem diplomové práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....
podpis studenta

ABSTRAKT

Diplomová práce se zabývá simulací dvou řetězců hyaluronanu sodného ve směsných rozpouštědlech voda/1,4-dioxan a voda/terc-butanol za dvou různých koncentrací NaCl. Teoretická část práce shrnuje předchozí poznatky, v praktické části jsou představeny výsledky simulací, prováděných pomocí softwaru NAMD. Bylo zjištěno, že přítomnost organické složky a vyšší koncentrace soli podporují vzájemnou interakci řetězců, která v přítomnosti dioxanu vede k tvorbě dvojitých šroubovic.

Klíčová slova: kyselina hyaluronová, virtuální simulace, molekulová dynamika, intermolekulární interakce, směsná rozpouštědla, vodíkové vazby

ABSTRACT

The diploma thesis deals with two hyaluronan sodium chains simulations in water/1,4-dioxane and water/tert-butanol mixed solvents at two NaCl concentrations. What is already known us summarized in the theoretical part of this thesis, the results of simulations performed by software NAMD are presented in the practical part. It was found that the presence of an organic component and higher salt concentration cause d a higher intermolecular interactions, which in water/dioxane solution resulted in the double-helical structure.

Keywords: hyaluronic acid, virtuál simulations, molecular dynamics, intermolecular interactions, mixed solvents, hydrogen bonds

Chtěla bych poděkovat své rodině za podporu při studiu a svým kamarádům za to, že tu pro mě vždycky byli. Velké poděkování patří také vedoucí mé práce RNDr. Evě Kutákové, Ph.D. za čas, který mi věnovala a za trpělivé zodpovězení všech mých otázek, ať už se týkaly vědy, nebo něčeho jiného.

Ráda bych poděkovala také Národní Gridové Infrastruktuře Metacentrum za to, že mi umožnili přístup k výpočetním a úložným zařízením za podpory projektu „e-Infrastruktura CZ“ (e-INFRA LM2018140), poskytovanému v rámci programu Projekty velkých výzkumných, vývojových a inovačních infrastruktur.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD	8
I TEORETICKÁ ČÁST	9
1 KYSELINA HYALURONOVÁ	10
1.1 STRUKTURA	10
1.2 VLASTNOSTI.....	14
2 MOLEKULOVÁ DYNAMIKA	17
2.1 PRINCIP SIMULACÍ	17
2.2 SOFTWARE VMD A NAMD	20
3 METODY	21
3.1 SIMULOVANÉ SYSTÉMY	21
3.3 POČÍTANÉ CHARAKTERISTIKY	24
II PRAKTICKÁ ČÁST	26
4 INTERAKCE MEZI ŘETĚZCI	27
4.2 ORIENTACE ŘETĚZCŮ PŘI INTERAKCI.....	28
4.3 VAZEBNÁ USPOŘÁDÁNÍ.....	30
5 DISTRIBUCE MOLEKUL ROZPOUŠTĚDLA	33
5.1 MOLEKULY ROZPOUŠTĚDLA V OKOLÍ ŘETĚZCŮ.....	33
5.2 IONTY V OKOLÍ ŘETĚZCŮ.....	36
6 CHOVÁNÍ ŘETĚZCŮ V ROZTOKU DIOXANU	38
6.1 OHEBNOST ŘETĚZCŮ	38
6.2 ANTIPARALELNÍ DVOUŠROUBOVICE	38
6.3 PARALELNÍ DVOUŠROUBOVICE.....	41
ZÁVĚR	45
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	47
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	51
SEZNAM OBRÁZKŮ	52
SEZNAM TABULEK	54
SEZNAM PŘÍLOH	55

ÚVOD

Kyselina hyaluronová je hydrofilní biopolysacharid, nacházející se ve své přirozené podobě v měkkých tkáních lidí, zvířat a obecně téměř všech živých organismů. Je lineární, v přítomnosti iontů tvoří energeticky stabilní šroubovice a je vysoce rozpustná ve vodě, kterou na sebe váže, čímž v těle podporuje hydrataci tkání. Protože roztoky hyaluronanu jsou silně pseudoplastické, podílí se také na tlumení nárazů a regulaci tlaku v chrupavkách. Díky těmto vlastnostem má kyselina hyaluronová celou řadu využití v klinické medicíně, farmacii a kosmetice.

Zatímco mechanické vlastnosti kyseliny hyaluronové jsou častým předmětem výzkumů, o molekulárních interakcích, které tyto vlastnosti zprostředkovávají, toho moc známo není. V minulosti bylo prováděno několik studií, cílených na vzájemné interakce řetězců hyaluronanu, ale všechny se zabývaly převážně intramolekulárními vodíkovými můstky, které zpevňují řetězec a stabilizují jeho prostorovou konformaci, případně vazbami na molekuly vody v okolí.

Účinným prostředkem pro studium těchto interakcí se ukázaly molekulárně dynamické simulace. Ty vychází z klasické Newtonské mechaniky, kdy na základě všech vazebných i nevazebných interakcí jednotlivých atomů predikují chování molekul. Protože tato oblast se neustále vyvíjí, je k dispozici několik programů a silových polí, schopných simulovat právě kyselinu hyaluronovou.

Tato práce se zabývá studiem vzájemných interakcí dvou řetězců hyaluronanu sodného ve vodě a ve směsných roztocích vody a organických látek (terc-butanolu a 1,4-dioxanu) pomocí softwaru pro molekulovou dynamiku NAMD a softwaru pro animaci a analýzu výsledků molekulové dynamiky VMD. Hlavním cílem práce bylo popsat vzájemnou interakci řetězců hyaluronanu a posoudit, zda na ni má vliv přítomnost organického rozpouštědla, vzájemná orientace řetězců, nebo množství soli v roztoku, se zvláštním zaměřením na analýzu vodíkových vazeb.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 KYSELINA HYALURONOVÁ

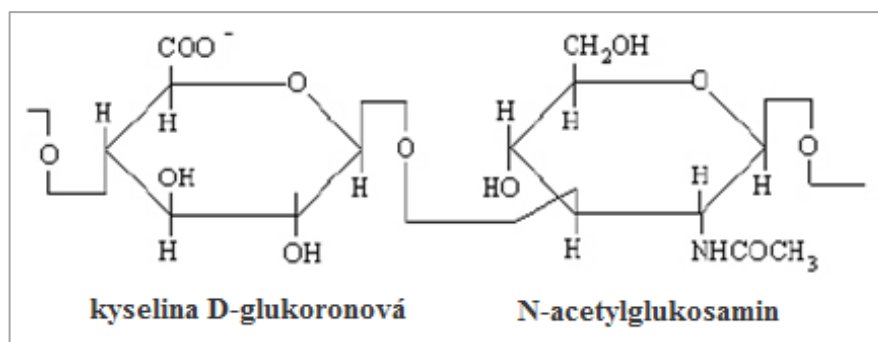
Kyselina hyaluronová (HA) je lineární mukopolysacharid. Patří do skupiny aniontových glykosaminglykanů, jako chondroitin nebo jeho sulfátovaná forma chondroitin sulfát [1], a je jednou z nejvíce hydrofilních molekul v přírodě [2].

Jako první byla popsána německými biochemiky – Karlem Meyerem a Johnem Palmerem v roce 1934 [3]. Od té doby byl hyaluronan předmětem mnoha studií, které zkoumaly převážně jeho fyzikálně-chemické vlastnosti a roli v biologických funkcích (např. u kmenových buněk nebo při lubrikaci tkání) [4], a již v 60. letech se začal aplikovat na léčbu popálenin či kožních vředů [5].

Kyselina hyaluronová je základní složkou extracelulární matrice obratlovců, ale je produkována také některými viry, bakteriemi a houbami [3]. V dospělém lidském těle se odhadem vyskytuje až 20 g HA ve formě soli – hyaluronátu, a to převážně v očním sklivci a jiných měkkých pojivových tkáních (v synoviální kloubní tekutině nebo ve Whartonově rosolu, který je součástí pupeční šňůry [6]). Vyskytuje se však také intracelulárně [2]. Téměř polovina HA z lidského těla se nachází v kůži [5].

1.1 Struktura

HA je alternující kopolymer kyseliny β -D-glukuronové a N-acetyl- α -D-glukosaminu, mezi nimiž jsou β (1 \rightarrow 3) a β (1 \rightarrow 4) glykosidické vazby (viz Obr. 1) [7]. Oba cukry jsou svým prostorovým uspořádáním příbuzné glukóze, která v beta konfiguraci umožňuje, aby všechny její objemné skupiny byly ve stericky příznivých ekvatoriálních polohách, zatímco všechny malé atomy vodíku zabírají méně stericky příznivé axiální polohy [2]. Struktura HA je proto energeticky velmi stabilní [2].

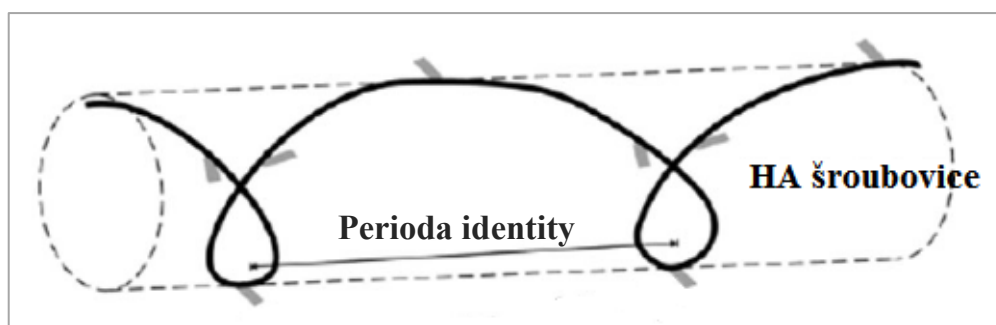


Obr. 1 – Struktura jedné jednotky hyaluronanu [2]

Hyaluronan je strukturálně nejjednodušším glykosaminoglykanem. Jako jediný není kovalentně spojena s centrálním proteinem, neobsahuje žádné sulfátové skupiny a jako

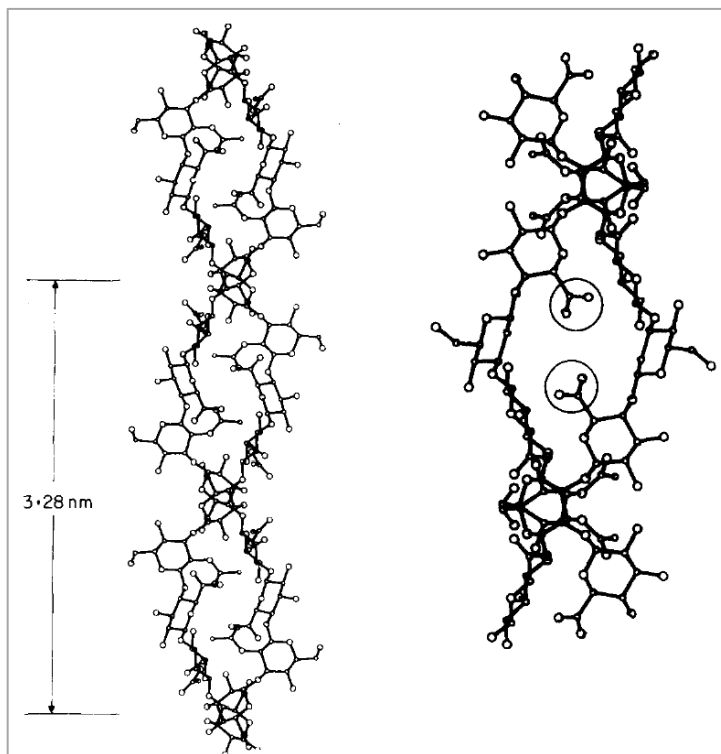
jediný není syntetizován v Golgiho aparátu [5]. HA je totiž produkován přímo z buněčných povrchů na vnitřní straně plazmatické membrány fibroblastů, pomocí třech různých hyaluronan-synteáz (liší se pravděpodobně délkou řetězce, který vytváří) [8] [3].

Zatímco primární struktura nemá žádné variace, sekundární a terciární struktury silně závisí na matrici a jejích vlastnostech (pH, koncentraci iontů a vlhkosti) [7]. Experimentální data měřená ve vodných roztocích naznačují, že v přítomnosti sodných a draselných iontů tvoří HA levotočivé šroubovice (Obr. 2) s periodou identity čtyři, nebo tři (v přítomnosti vápenných iontů) [8]. U vláken vystavených exotičtějším podmínkám byla pozorována dvoušroubovice (v přítomnosti iontů rubidia nebo cesia) nebo i šroubovice s periodou identity dva (při $\text{pH} = 2$) [9].



Obr. 2 – Ilustrace levotočivé šroubovice s periodou identity čtyři [10]

Ve všech výše uvedených případech bývají karboxylové skupiny orientovány směrem k jádru šroubovice (Obr. 3) [11]. Jelikož struktura se zdá stabilní, karboxylové skupiny s největší pravděpodobností nejsou nabitě - jsou protonované, nebo jsou na nich navázány ionty, což snižuje elektrostatickou interakci a umožňuje vznik vodíkových vazeb [11].



Obr. 3 - Struktura dvoušroubovic – na obrázku nejsou pro zajištění přehlednosti ukázány N-acetylové skupiny [11]

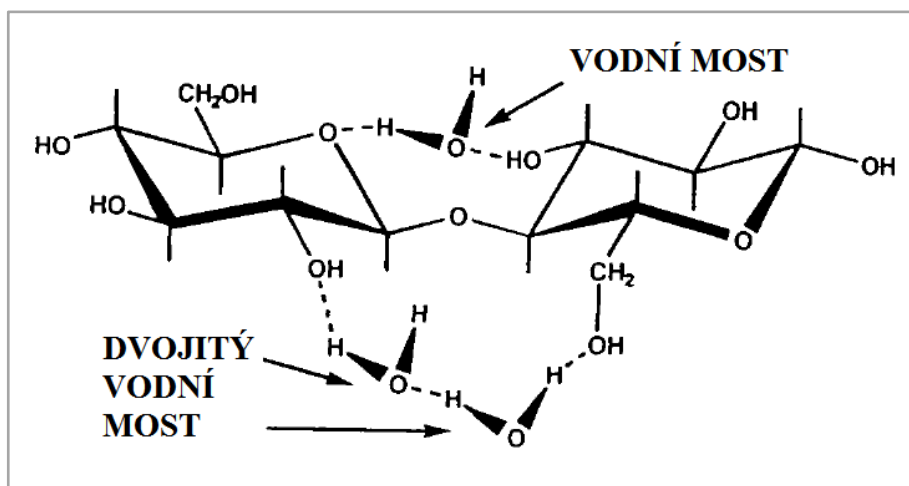
Na rozdíl od struktury HA v pevném stavu, která je dobře prozkoumaná, u roztoků HA jsou strukturální údaje vzácnější. I proto se za tímto účelem často využívají simulace molekulové dynamiky, které sice nemohou poskytnout přímé informace, ale lze je použít ke generování hypotéz, které lze experimentálně testovat [8].

Ve fyziologickém roztoku je páteř molekuly HA vyztužena intramolekulárními vodíkovými můstky přes glykosidické vazby, interakcí s rozpouštědlem a také elektrostatickým odpuzováním karboxylových skupin [12] [2]. Naopak neexistuje žádný důkaz o případných hydrofobních interakcích, nebo o jejich přispívání k vlastnostem sítě [12]. Hyaluronan zaujímá v roztoku formu náhodného klubka a řetězce jsou semiflexibilní [2].

Existuje řada experimentálních důkazů podporujících ve vodném roztoku přítomnost intramolekulárních vodíkových vazeb (HB), zejména mezi amidovými a karboxylovými skupinami [8] [4]. Tyto vazby lokálně zpevňují řetězec omezením rotace kolem glykosidických vazeb. Zároveň mohou také stabilizovat prostorové uspořádání (neboli konformaci) řetězců a mohou být také přímo odpovědné za jeho tvorbu [4] [9].

Dále jsou řetězce stabilizovány slabými přechodnými vodíkovými vazbami na molekuly rozpouštědla, resp. vodnými mosty (Obr. 4) [9]. Jejich podíl roste s hydratací a výrazně

zvyšují mezifázovou pevnost a tuhost na rozhraní hyaluronan-voda [13]. Byly pozorovány i takové mosty, které zahrnují dvě molekuly vody, nebo i více (obvykle na stejných místech, kde se tvoří i jedno-molekulové mosty) - k nárustu počtu zúčastněných molekul vody ve vodním můstku dochází při dalším zvyšování úrovně hydratace [8] [13]. Pevnost těchto mostů je narušována přítomností intramolekulárních vodíkových vazeb. S tím je spojen pokles mechanických vlastností na rozhraní voda-hyaluronan-voda [13].



Obr. 4 – Příklad struktury vodních mostů [8]

Zatímco v krystalu se mezi jednotlivými řetězci velmi běžně vyskytují intermolekulární vodíkové vazby, v roztoku jejich výskyt není tak hojný [7]. Vysoká viskozita HA při nízkých smykových rychlostech a neidealita při rychlostech vysokých, které bývají někdy mylně považovány za důkaz existence sítě, jsou jednoduše způsobeny fyzikálními zapleteninami mezi řetězci [3].

Mnoho článků už se tímto tématem zabývalo, ale kvůli nedostatku experimentálních dat se neobjevil žádný vyhovující model dynamického chování HA v roztoku [9]. Podle nejnovějších studií by měly stabilní vodíkové vazby vznikat při hodnotě pH = 2,5 a být tak zodpovědné za tvorbu gelu [14]. V rámci bakalářské práce, na kterou tato práce částečně navazuje, bylo v simulacích pozorováno, že malé množství HB (do 10 vazeb / 1 ns) mezi řetězci HA vzniká i při normálním pH [15].

Intermolekulární interakce HA ale nemohou být (za normálních podmínek) příliš stabilní. Kdyby byly, nezachovával by si čistý HA až do vysokých koncentrací svoji viskozitu, ale vytvořil by pevný gel [9]. Jak už bylo uvedeno výše, gel se sice vlivem molekulárních interakcí tvoří, ale jen při specifickém výše uvedeném pH [14].

1.2 Vlastnosti

Hyaluronan má obvykle velmi vysokou molekulovou hmotnost $10^5 - 10^6$ Da. To je přibližně 250 – 2500 disacharidových jednotek (některé zdroje uvádějí až 10^7 Da - tedy deset tisíc jednotek nebo i víc [5] [8]) [1]. Je lineární a záporně nabitý [13].

Řada fyziologických vlastností HA je ovlivněna délkou řetězce (v lidském těle se vyskytuje celá škála délek) [6]. Velké řetězce mají například v tělech savců antiangiogenní a imunosupresivní roli a podílejí se mimo jiné na hojení ran a regeneraci. Střední fragmenty (25 – 50 disacharidů) mají zánětlivé imunostimulační a vysoce angiogenní účinky a malé oligosacharidy jsou antiapoptotické a indukují proteiny tepelného šoku [5]. Pro rozsáhlé biologické funkce hraje důležitou roli také charakter okolního prostředí – pH nebo přítomnost iontů [7].

HA vykazuje za fyziologických podmínek výjimečně vysokou tuhost v ohybu (délka perzistence 4 – 7 nm, tedy přibližně 4 – 7 monomerů [4]. V roztoku jsou řetězce semiflexibilní [3].

Nativní HA je vysoce rozpustný ve vodě a v těle se rychle odbourává pomocí enzymů, radikálů a reaktivních forem kyslíku. Proto byly pro specifické aplikace vyvinuty chemicky modifikované deriváty. Typické chemické modifikace HA zahrnují úpravu karboxylových nebo hydroxylových skupin hlavního řetězce, na které je možné (zejména pro podporu síťování) naroubovat molekuly jiných látek. Nejčastěji je toho dosaženo s pomocí esterifikace, sulfatace nebo karboimidem zprostředkovaných reakcí [16]. Dále se v praxi provádí konjugace s léky nebo mikroenkapsulace [5].

Molekula je silně hydrofilní a váže na sebe vodu i ionty, čímž efektivně udržuje hydrataci tkání [3]. Na flexibilitu řetězce má významný vliv druh rozpouštědla nebo druh a koncentrace iontů. V silně alkalickém roztoku dojde k narušení vodíkových vazeb a řetězce se stanou podstatně flexibilnějšími [12], naopak přítomnost sodných iontů tvorbu vazeb podporuje (což bylo pozorováno i v rámci bakalářské práce [15]) [8], jelikož se zde mohou nacházet v pozici mezi dvěma sousedními řetězci a tvořit svou interakcí s oběma řetězci iontové mosty. Tato interakce je lépe pozorovatelná v krystalu - v roztoku ionty s řetězci interagují méně. Předpokládaným důvodem je přítomnost molekul vody a interakce s nimi [7].

Roztoky hyaluronanu vykazují velmi neobvyklé reologické vlastnosti (pravděpodobně kvůli intramolekulárním vodíkovým můstkům [12]) a jsou mimořádně lubrikační. Již 1% roztok

HA má vysokou smykově závislou viskozitu a je silně pseudoplastický [2]. Tato viskozita silně klesá při zvýšení teploty [4].

Organická rozpouštědla mají na ohebnost (a obecně i na další vlastnosti HA) výrazně silnější vliv než vodný roztok, zejména díky své nižší permitivitě. V ethanolu se např. pohyblivost HA zvyšuje (pravděpodobně proto, že ethanol vytlačí z řetězců vodu a tím naruší vodíkové vazby) [12]. Podobných výsledků bylo dosaženo i při použití acetonitrilu [17].

1.3 Využití

Fyziologickými funkcemi HA v lidském těle je tlumení nárazů a lubrikace, regulace hydratace a transportu vody do měkkých tkání a modifikace chování buněk (např. při vzniku nádoru) [17] [2]. V kůži hraje HA roli lapače volných radikálů generovaných ultrafialovými paprsky ze slunečního záření a mimo jiné podporuje její pružnost (to je pravděpodobně důvodem vyšší koncentrace HA v pokožce zvířat žijících v podzemních tunelech) [5] [18]. Působí také jako lešení, na které se nekovalentně váží další proteoglykany při regulaci tlaku v chrupavce [9]. Mezi další možné funkce patří podpora deformovatelnosti tkáně a růstu buněk (zejména během těhotenství nebo při hojení ran), udržování průchodů pro buněčnou migraci, podpora buněčné adheze [8] a efektivní výplň prostoru, udržující hydrataci [17] [3].

V klinické medicíně se HA používá jako diagnostický marker pro mnoho nemocí včetně rakoviny (mnoho nádorů se vyznačuje nadměrnou produkcí hyaluronanu, který pak v okolí nádoru podporuje angiogenezi [18]), revmatoidní artritidy a jaterních patologií, nebo např. pro doplnění poškozené synoviální tekutiny u artritických pacientů [5]. Také byly z HA syntetizovány materiály reagující na prostředí (reakce na zánět, elektrickou stimulaci, teplo...) [2].

Protože je neimunogenní a biokompatibilní, je také vynikajícím základem pro nosiče léčiv, vývoj umělých tkání a dalších biomateriálů, včetně kardiovaskulárních, farmakologických, onkologických a ortopedických aplikací (viskosuplementace = zlepšování fyziologického prostředí v osteoartritickém kloubu doplněním tekutin) [14] [3]. Běžným využitím HA jsou povlaky na implantátech, bránící adhezi bakterií nebo koagulaci krve [2].

Další důležité lékařské aplikace jsou v oblasti kůže (obvazy, podporující hojení), očí a uší a to zejména při operacích, kde je potřeba manipulovat s choulostivými tkáněmi (viskochirurgie) [6]. Kyselina hyaluronanová se hojně využívá také k viscoaugmentaci (vyplnění a zvětšení tkáňových prostorů, jako jsou kůže, svaly svěrače, hlasové a hltanové

tkáně) zejména pro odstranění vrásek na obličeji a atrofických jizev. HA je pro tyto aplikace dokonce lepší než kolagen, jelikož je elastičtější a výsledný efekt vydrží déle [5].

Mimo klinické a v současné době také velmi populární kosmetické aplikace se HA obohacená o hydrofobní skupiny také používá k zachycení barviv a terapeutik [19].

2 MOLEKULOVÁ DYNAMIKA

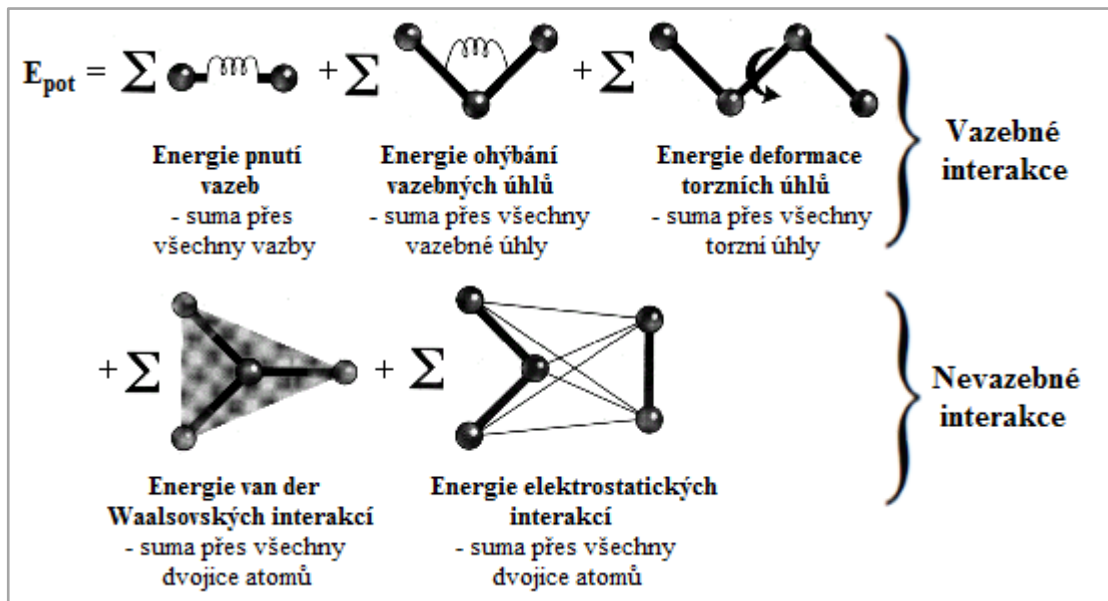
Klasická molekulová dynamika (MD) je druh počítačové simulace, která vychází z klasické Newtonské mechaniky a počítá potenciální energii molekuly jako součet energií všech vazebných i nevazebných interakcí jejích jednotlivých atomů [20] [21]. Tento nástroj pro predikci interakcí, vazebných míst a konformací je obzvláště užitečný v oblasti výzkumu, kde experimentální data neposkytují potřebné rozlišení [22] [23]. Ačkoli tyto simulace samy o sobě nemohou poskytnout přímé strukturální informace, lze je použít ke generování hypotéz, které lze následně experimentálně testovat [8].

MD je pro studium biosystémů velmi efektivní. Díky svému omezení na pouhou newtonskou fyziku je podstatně jednodušší oproti např. mechanice kvantové. Na popis chování makromolekul totiž zpravidla newtonská mechanika stačí. V případě lokálních problémů je možné využít data z kvantových výpočtů ve formě parametrů silových polí. Nevýhodou je nicméně neschopnost studovat chemické reakce – tedy vznik, resp. zánik chemických vazeb v průběhu simulace [24].

Už počátkem sedmdesátých let minulého století byla prováděna první výpočetní řešení struktur glykosaminoglykanů. Po prvních experimentech na chondroitinu byla v roce 1978 zkoumána i konformační analýza HA a to v jak v nabitém, tak v neutrálním stavu. Díky této studii se značně zlepšilo porozumění povrchové energii a rozměrům řetězce, které dobře korespondovaly s experimentálními výsledky krystalové analýzy. Na počátku osmdesátých let pak došlo u virtuálních experimentů k největšímu pokroku – byla vyvinuta molekulárně-mechanická silová pole a postupně byla začleňována do simulačních programů. Začaly se také hojněji využívat parametry naměřené NMR spektroskopii [23].

2.1 Princip simulací

MD aproximuje atomy a vazby mezi nimi kulovitými částicemi spojenými pružinami [24]. V jejich středu je lokalizován náboj, odpovídající danému atomu, tuhost každé z pružin je popsána speciální konstantou. Pro každý atom se zadají i další charakteristiky v podobě VdW poměru, náboje, relativní hmotnosti, vaznosti, nebo geometrie jeho vazeb. U vazeb je nutné znát jejich délku a úhly mezi nimi [21]. Výsledná potenciální energie je pak funkcí souřadnic jednotlivých atomů, které je do simulace nutno zadat, a interakcí, které na tyto atomy působí (viz Obr. 5), a to jak vazebných, tak nevazebných [24].



Obr. 5 – Jednotlivé složky potenciálové funkce molekul [24]

Mezi vazebné interakce patří pnutí jednotlivých vazeb, ohýbání valenčních úhlů a deformace torzních úhlů. Do nevazebných se počítají elektrostatické síly a van der Waalsovské interakce (coulombické, indukční a disperzní síly). Jejich nejlepším modelem je Lennard-Jonesova funkce 12-6:

$$E_{LJ} = 4\varepsilon \left[\left(\frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r} \right)^6 \right] \quad (1)$$

kde r je vzdálenost atomů, σ hraniční vzdálenost, kde na sebe jednotlivé atomy začínají silově působit a ε minimální energie pro danou dvojici atomů) [21].

Hlavní součástí simulace je model fyzikálního systému – tedy molekul, jejichž interakce má být studována. Časový vývoj interagujících molekul je popsán pohybovými rovnicemi jednotlivých atomů a je zcela určen počátečními pozicemi, rychlostmi a působícími silami [20].

Klíčovou součástí simulací jsou silová pole (force field), která jsou tvořeny potenciálovou funkcí (schématicky znázorněná na Obr. 5) a popisují délky vazeb, vazebné či torzní úhly nebo silové konstanty. Ty určují, jak moc se stav molekuly liší od ideálního [21]. Všechny zmiňované parametry jsou získávány buď experimentálně z empirických dat (RTG a neutronovou difrakcí, NMR, v případě silových konstant také rotační nebo vibrační spektroskopií...), nebo pomocí výpočtu z energetických hyperploch [24].

Silových polí je celá řada a neustále jsou vyvíjena a zdokonalována [21]. Mezi nejčastěji používaná silová pole patří AMBER (1984,1995), CHARMM (1983), GROMOS (2001) a

OPLS-AA (1996). Každé z nich má svoje vlastní metody, charakteristiky rozpouštědla a parametry. Pro studium glykosaminykanů se v dnešní době nejčastěji využívají GLYCAM (<http://glycam.org/>), CHARMM (<https://www.charmm.org/>) a GROMOS (<http://www.gromos.net/>). GLYCAM navíc obsahuje rozsáhlou knihovnu sacharidových sekvencí [23].

Příprava simulace

- a. Na počátku je nutné mít trojrozměrnou strukturu vybraných molekul, tzn. souřadnice všech simulovaných atomů a informaci, které atomy jsou spojeny vazbou. To je možné získat z některé z databází (např. Cambridge Structural Database), nebo vytvořit pomocí tomu určených nástrojů (např. CHARMM-GUI) [23].
- b. Některým z příslušných programů (VMD, Leap, X-leap, tleap, CGenFF, Topolbuild, TopolGen, pdb2gmx, PRODRG, ATB nebo ACPYPE) je potřeba pomocí příslušného topografického souboru přiřadit jednotlivým atomům hmotnosti, parciální náboje a typ atomu daného druhu, který rozhoduje o tom, jaké silové parametry budou jednotlivým interakcím přiřazeny. Dále je nutné zkontrolovat celkový náboj a případně jej vykompenzovat přidáním iontů [23]. Pro ideální průběh simulace je nutné, aby byl systém elektroneutrální. Pokud tomu tak není, simulace jsou nepřesné a výsledky jsou zatíženy velkou chybou [25].
- c. Následuje solvatace, nejčastěji vodou (existuje několik modelů molekul vody) a případně přidání dalších iontů (má-li být výsledným rozpouštědlem solný roztok). V tomto okamžiku je také zadán tvar simulovaného boxu (krychle, kvádr, oktaedr...) a jsou definovány periodické okrajové podmínky ve všech směrech [11]. Následuje minimalizace energie celého systému. Teprve potom je možné začít systém simulovat za dané teploty, resp. tlaku [23].

Při samotné pracovní simulaci probíhá řešení jednotlivých pohybových rovnic. To může trvat i poměrně dlouhou dobu, záleží na velikosti simulovaného systému a složitosti modelu. Neustálým mnohonásobným vyčíslováním relativně jednoduchých rovnic je získána časová závislost poloh jednotlivých atomů. Na závěr se konečně pozice a rychlosti částic uloží a je možné z nich vycházet v navazující simulaci. Z důvodů velkého objemu zpracovávaných dat je takovéto úlohy nutné provádět paralelně na několika výkonných procesorech [20].

2.2 Software VMD a NAMD

VMD (Visual Molecular Dynamics) je grafický program navržený pro práci s výsledky simulací – pro zobrazení, animaci a analýzu molekulárních sestav (zejména biopolymerů jako jsou proteiny a nukleové kyseliny, ale v současné době už i polysacharidy, lipidy, nebo další makromolekuly) [26].

VMD může současně zobrazit libovolný počet struktur za pomoci široké škály stylů vykreslování a barevných metod (viz obrázky v experimentální části práce) v konkrétním kroku simulace. Program je schopen pracovat jak s nepohyblivými molekulami, importovanými ze souborů s příponou „pdb“, nebo také se simulačními trajektoriemi získanými přímo z některého z programů MD. Ve VMD je pro tyto účely k dispozici program NAMD a propojovací software MDCOMM [26].

Program NAMD (NAnoscale Molecular Dynamics), oceněný několika cenami (např. Gordon Bell Award 2020), je paralelní MD software, navržený pro vysoce výkonnou simulaci různých biomolekulárních systémů. Při škálování využívá několik stovek až stovek tisíců jader (záleží na množství simulovaných molekul) [27].

NAMD používá pro přípravu simulovaného systému program molekulární grafiky VMD, pro topologie a silové parametry zpravidla CHARMM, ale je kompatibilní i s AMBER a X-PLOR. Všechny důležité parametry, jako velikost boxu, teplota, tlak nebo periodické okrajové podmínky, se zadají do konfiguračního souboru. Je zde možné nastavit i to, jestli jsou některé vazby považovány za tuhé, počáteční čas simulace (pokud není počáteční čas 0), její délka nebo také frekvence ukládání výsledků. Simulaci je možné spustit pomocí dávkového souboru s příponou „sh“, kde je možné definovat na jakém procesoru má simulace probíhat a případně kolik místa zabere. Software je distribuován zdarma i se svým zdrojovým kódem, pro nekomerční užití jednotlivců, firem nebo akademických institucí [27].

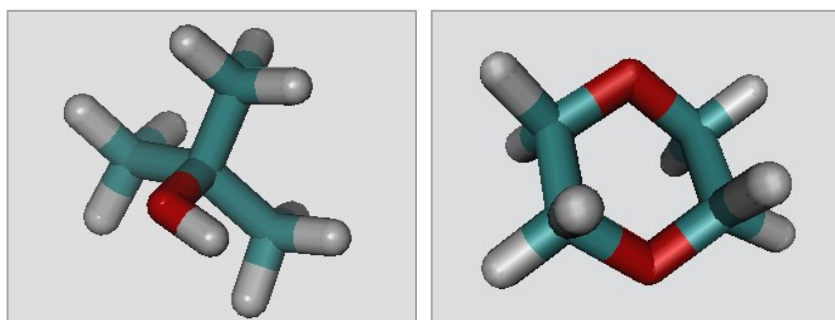
Mimo NAMD existují i další softwarové simulační nástroje. Mezi nejvyužívanější patří GROMACS nebo AMBER [23].

3 METODY

3.1 Simulované systémy

V rámci této práce byly prováděny simulace chování dvou řetězců hyaluronanu. Každý z nich se skládal z deseti disacharidových jednotek (dvacet sacharidových residuí). Simulace molekul hyaluronanu (a molekulové, ale i kvantové dynamiky obecně [22]) se pro co největší jednoduchost obvykle provádějí s poměrně krátkými řetězci, na nichž lze ale docela dobře aproximovat i chování celku [12].

Jako rozpouštědlo byla zvolena voda. U třetiny systémů bylo do vody přidáno pouze NaCl, ve zbytku tvořila voda směsné rozpouštědlo v objemovém poměru 1:1 s některou z organických molekul – terc-butanolem a dioxanem (Obr. 6). Směsi vody a alkoholů se zkoumají velmi často a terc-butanol je největší alkohol, který lze ještě smístit s vodou [28]. Heterocyklický 1,4-dioxacyklohexan, nazývaný jednoduše „dioxan“ (protože s jeho izomery se lze setkat jen zřídka) je s vodou také dobře mísitelný a jeho využití do směsných rozpouštědel vody a organiky má dlouhou historii [29]. Z těchto rozpouštědel má nejvyšší permitivitu při 20 °C voda (80,1), následuje terc-butanol (17,8) a nejnižší hodnotu má dioxan (2,25) [30] [31].



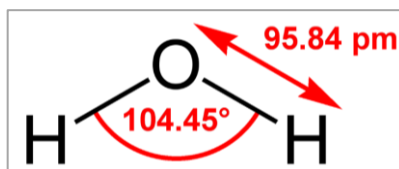
Obr. 6 – Grafické znázornění molekul terc-butanolu a dioxanu

Koncentrace soli byly dvě: 0M (systémy byly pouze neutralizovány ionty) a 0,2M. Každý takový systém měl dvě varianty vzájemné orientace řetězců – antiparalelní (tak jako v předcházející bakalářské práci) i paralelní (viz Tab. 1).

Tab. 1 – Přehled simulovaných systémů a zavedení jejich značení

	voda	voda + dioxan	voda + terc-butanol	
0M	a_w_0M	a_w_d_0M	a_w_t_0M	antiparalelní orientace
0.2M	a_w_02M	a_w_d_02M	a_w_t_02M	
0M	p_w_0M	p_w_d_0M	p_w_t_0M	paralelní orientace
0.2M	p_w_02M	p_w_d_02M	p_w_t_02M	

Zatímco řetězce ani organické molekuly nebyly nijak upravovány a zjednodušovány, při simulaci vody je možné si zvolit některý z mnoha modelů, jak už bylo uvedeno v předchozích kapitolách. V případě této práce byl zvolen velmi jednoduchý model TIP3P (Obr. 7), poprvé zmíněn 1961 [12]. Tento model je založený na geometrii molekuly vody v plynné fázi a pro zjednodušení nezahrnuje kmitání vazeb ani úhlu mezi nimi. Silová pole CHARMM jsou vyvíjena tak, aby byla kompatibilní právě s tímto modelem [32].



Obr. 7 – Model vody TIP3P

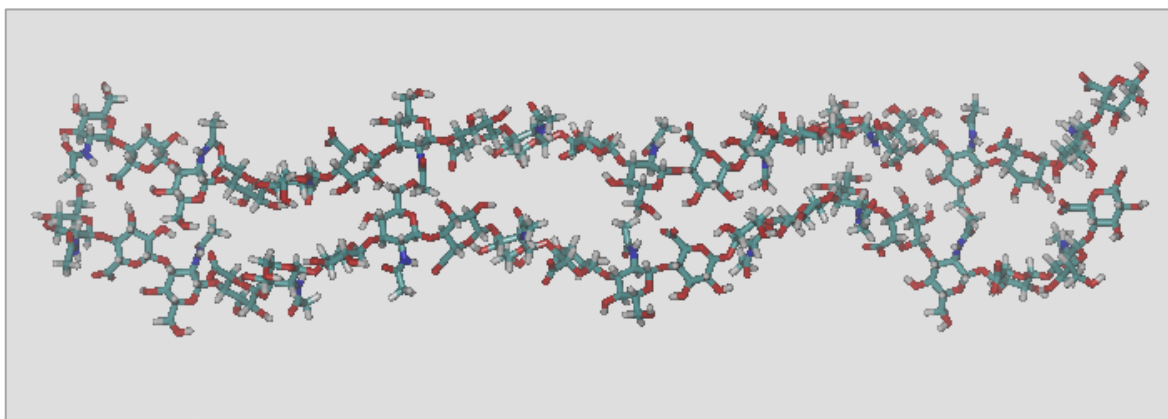
Tvorba simulovaných systémů probíhala tak, že byly vytvořeny simulační boxy o hraně 40 Å s definovanými počty molekul rozpouštěla pomocí volně dostupného programu PACKMOL. Následně byly tyto boxy simulovány pomocí programu NAMD a teprve po získání relativně rovnoměrné distribuce byly těmito solvatačními boxy ze všech stran obklopeny řetězce HA. Jako poslední byly vkládány ionty dle zamýšlené koncentrace. Proto se v každém systému vyskytuje odlišný počet molekul (Tab. 2).

Tab. 2 – Počet atomů a molekul v jednotlivých systémech (přepočet počtu atomů na počet molekul byl prováděn dělením – v případě vody třemi, u dioxanu čtrnácti a u terc-butanolu patnácti)

		počet atomů		počet molekul	
		0M	02M	0M	02M
antiparalelní	voda (w)	142 842	141 714	47 614	47 238
	voda (w_d)	73 200	72 654	24 400	24 218
	voda (w_t)	71 631	71 079	23 877	23 693
	dioxan	64 638		4 617	
	terc-butanol	65 625		4 375	
	ionty (w)	20	376	-	
	ionty (w_d)	20	202	-	
	ionty (w_t)	20	198	-	
paralelní	voda (w)	128 712	127 692	42 904	42 564
	voda (w_d)	66 009	65 517	22 003	21 839
	voda (w_t)	64 251	63 771	21 417	21 257
	dioxan	57 470		4 105	
	terc-butanol	58 980		3 932	
	ionty (w)	20	340	-	
	ionty (w_d)	20	184	-	
	ionty (w_t)	20	180	-	

Celkový počet molekul vody byl tedy mírně odlišný u každého systému, ale vždy se pohyboval okolo 47 000 molekul, případně 24 000 molekul vody plus 4 450 molekul organického rozpouštědla. Objem boxu se v průběhu simulací lehce měnil, ale řádově se vždy jednalo o přibližně 150 \AA^3 .

Počáteční konfigurace všech paralelně orientovaných systémů byla stejná (viz Obr. 8). U antiparalelních se lišila systém od systému. Vždy ale vycházela z náhodně vzniklého přirozeného natočení řetězců v některé z předcházejících simulací.



Obr. 8 – Počáteční konfigurace paralelních systémů

Řetězce nebyly nijak fixovány, proto se v průběhu simulace často vzdálily natolik, že už na sebe nemohly nijak působit. V takovém případě bylo nutné řetězce manuálně přiblížit a případně i otočit, aby opět zaujaly požadovanou orientaci. Počet těchto manuálních zásahů se lišil pro každý systém, ale nikdy se nejednalo o větší číslo, než pět.

Samotné simulace probíhaly s využitím organizace Metacentrum na výpočetních počítačích v Praze a v Brně. Spojení s těmito počítači zajišťovalo příkazové rozhraní PuTTY a software WinSCP. Zadávání a zpracování výsledků pak bylo prováděno na výpočetním počítači UFMI FT UTB pomocí programů NAMD a VMD.

3.2 Parametry simulací

Všechny parametry simulací byly zadávány do konfiguračního souboru s příponou „.namd“ (viz Příloha P I), jak už bylo uvedeno v kapitole o MD.

Simulace probíhaly při pokojové teplotě $298,15 \text{ K}$ a standardním tlaku jedné atmosféry. Tlak i teplota byly konstantní. Časový krok simulací byl 1 fs , což odpovídalo rychlosti kmitání vodíků a tím pádem i vzniku a zániku námi studovaných interakcí. Pro výpočet ne vazebných interakcí byl použit časový krok 2 fs , kdy dosah ne vazebných interakcí byl do 10 \AA . Výpočet

elektrostatických energií a sil byl prováděn každou šestou fs pomocí metody PME (Particle mesh Ewald), využívané pro velké, periodicky se opakující systémy [33].

Před každou simulací probíhala minimalizace potenciální energie, u systémů simulovaných v této práci byla obvykle 5 400 kroků. V případech, kdy proběhlo manuální přiblížení řetězců, bylo ovšem nutné provádět minimalizaci delší dobu a to buď 10 800 kroků, nebo v některých komplikovanějších případech dokonce i 108 000 kroků. Frekvence ukládání souřadnic jednotlivých atomů a dalších fyzikálních charakteristik systému, jako jsou např. teplota nebo tlak, byla nastavena na každých 3 600 fs.

Pro získání co nejporovnatelnějších výsledků bylo u všech systémů napočítáno alespoň 100 ns (Tab. 3). Výjimku tvořily systémy čisté vody, u kterých byla v průběhu simulací zjištěna vada v počátečním nastavení a nemělo proto smysl je počítat dál. Pro případné porovnání bylo navíc možné použít i výsledky z bakalářské práce, resp. na ni navazující letní stáže, přestože tam byly počítány interakce delších řetězců a při jiných teplotách.

Tab. 3 – Doba simulací jednotlivých systémů [ns]

antiparalelní			paralelní		
	0M	0.2M		0M	0.2M
w	55	68	w	94	115
w_t	74	142	w_t	154	142
w_d	106	104	w_d	141	122

3.3 Počítané charakteristiky

Vzhledem k zadání diplomové práce byly nejčastěji počítanou charakteristikou vodíkové vazby. Výpočty HB byly prováděny přímo v programu VMD na základě jejich geometrické definice: stav, kdy je vzdálenost donoru a akceptoru menší nebo rovná 3 Å a úhel, který svírají roviny donor-vodík a vodík-akceptor, je menší než 20°. Do programového rozhraní bylo zadáno, mezi kterými systémy mají být HB hledány (řetězec jedna a řetězec dva) a program vyhodnotil počet vazeb ve všech zobrazených krocích simulace, ale při pokročilém nastavení také to, mezi kterými atomy vznikají HB nejčastěji a jakou procentuální obsazenost vazbami mají daná místa na řetězci. Všechny výše jmenované charakteristiky byly exportovány ve formě datového souboru (Obr. 9) a následně zpracovávány v programu Excel.

Found 6 hbonds.		
donor	acceptor	occupancy
NAG12-Side-O6	NAG8-Main-O	0.34%
NAG10-Side-O6	GCU7-Side-O2	0.34%
GCU7-Side-O2	NAG10-Side-O6	0.17%
NAG10-Side-O6	NAG8-Main-O	0.17%
GCU7-Side-O2	GCU9-Side-O3	0.51%
NAG8-Side-O6	GCU7-Side-O2	0.17%

Obr. 9 – Datový soubor s výstupy

Další vyšetřovanou charakteristikou byla distribuce molekul rozpouštědla v okolí řetězců. Její výpočet probíhal pomocí TCL skriptů (viz Příloha P II), nahrávaných do programu VMD pomocí příkazového rozhraní TK Console, které zjišťovaly počet atomů daného typu ve vzdálenostech 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 a 22 Å od řetězců. Tyto počty byly pak vyděleny celkovým počtem atomů daného typu v konkrétní simulaci (např. počet atomů vody v blízkosti / celkový počet atomů vody v simulaci). Byl tak získán procentuální podíl výskytu daných atomů v jednotlivých vzdálenostech od řetězce, který bylo možné porovnávat i mezi jednotlivými systémy. Pro zjištění „podílu atomů vody a organiky v blízkosti řetězců“ byl počet atomů vody vydělen počtem atomů organické složky.

TCL skripty byly dále využívány na zjištění počtu iontů ve vzdálenosti 4 a 10 Å od HA řetězců a také při podrobnějším vyšetřování chování řetězců. V takovém případě bylo provedeno pozorování pro zjištění, kde se tvoří vazba a jak se jmenují na ní se podílející atomy, a následně byl vytvořen skript, počítající vzdálenost atomů rozpouštědla právě od těchto atomů.

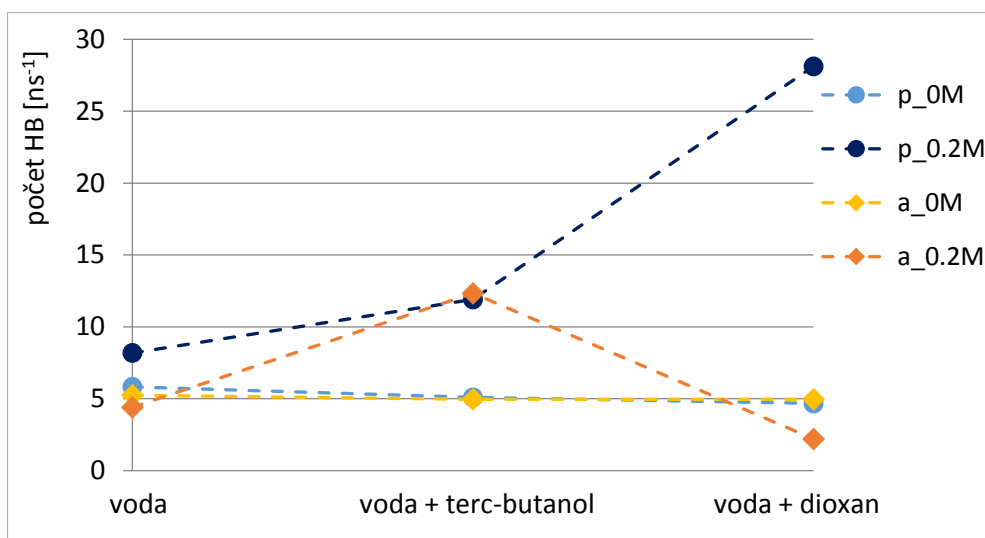
Pro vizuální výstupy simulací (a také pro obrázky, použité v experimentální části této práce), bylo použito zobrazení řetězců HA jako linií, většinou zbarvených dle běžného značení atomů (červená = kyslík, bílá = vodík, tyrkysová = uhlík a modrá = dusík). Molekuly rozpouštědel byly zobrazovány stejným způsobem, jen s tenčími linkami. Ionty NaCl jsou na obrázcích reprezentovány jejich Van der Waalsovským poloměrem, tedy jsou zobrazovány jako sféry, zbarvené dle druhu atomu (žlutá = Na⁺, zelenomodrá = Cl⁻).

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 INTERAKCE MEZI ŘETĚZCI

4.1 Vodíkové vazby

Cílem této práce bylo vyšetření interakcí HA se zaměřením na vodíkové vazby. Bylo proto provedeno srovnání počtu intermolekulárních HB v jednotlivých systémech (Obr. 10, časové průběhy všech systémů jsou v Přílohách – P III). Pro zajištění srovnatelnosti byl počet HB vydělen dobou simulace daného systému.

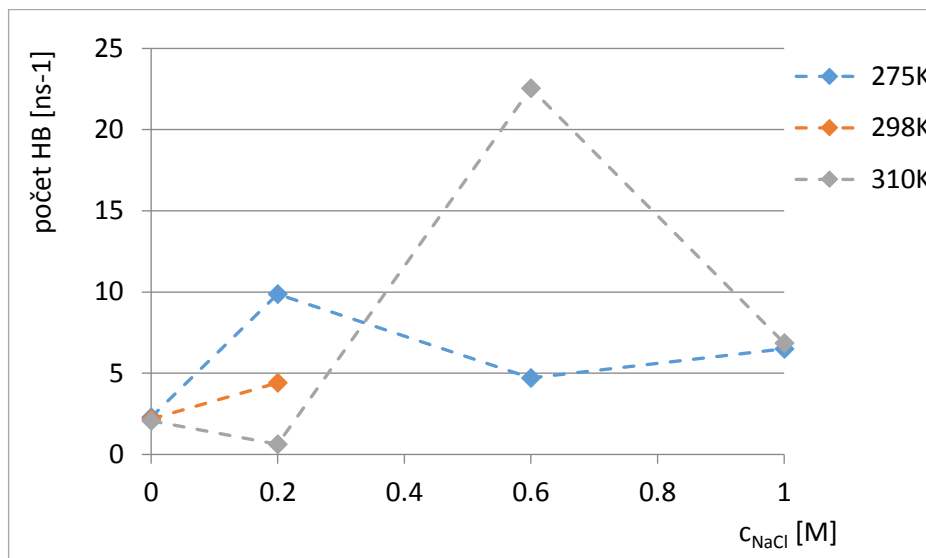


Obr. 10 – Počet HB v jednotlivých systémech pro paralelní („p“) i antiparalelní („a“) řetězce

Na základě tohoto grafu lze usoudit, že na interakce mezi řetězci má kromě použitého rozpouštědla a přítomnosti soli (bez níž se všechny systémy chovají podobně) vliv také vzájemné uspořádání. Zatímco v přítomnosti terc-butanolu se více vázaly antiparalelní řetězce, v prostředí dioxanu se podstatně více HB tvořilo mezi řetězci paralelními. Obecně je možné konstatovat, že více vazeb vznikalo v přítomnosti terc-butanolu s jednou jasně patrnou výjimkou, které se více věnuje kapitola 6 – Chování řetězců v roztoku dioxanu.

Počty intermolekulárních HB mezi antiparalelně orientovanými řetězci byly také porovnány s daty, získanými během bakalářské práce (simulace při teplotě 275 K) a na ni navazující stáže (simulace při teplotě 310 K). V případě těchto předcházejících prací se jednalo o simulace delších řetězců (každý měl 48 monosacharidových jednotek) ve vodě s 0, 0.2, 0.6 a 1M koncentrací NaCl, srovnání je tedy proto spíše orientační (Obr. 11). I tak je zajímavé, že se oranžová křivka nachází přímo mezi dvěma zbývajících křivkami, což odpovídá teplotnímu rozložení. Protože na rozdíl od předchozích prací nebylo hlavním cílem zkoumat chování řetězců při vyšších koncentracích, ale hlavně popis interakcí ve směsných

rozpouštědlech, nebyly v rámci diplomové práce prováděny simulace 0,6M a 0M koncentrace NaCl. Proto není možné říci, jak by oranžová křivka pokračovala a zda by i ona vykazovala při koncentraci NaCl 0,6 M podobné neočekávané výsledky.



Obr. 11 – Počet HB za 1 ns v závislosti na koncentraci iontů, hodnoty normovány pro řetězce s dvaceti sacharidy

4.2 Orientace řetězců při interakci

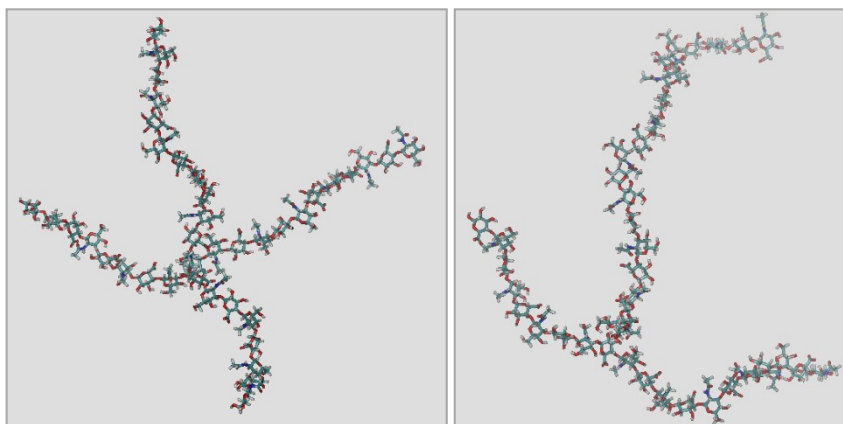
Protože řetězce měly v některých systémech tendenci se vzdalovat, bylo je nutné několikrát vrátit do těsné blízkosti. Není jisté, jestli se řetězce vzdalovaly jen náhodou, nebo zda vzdálení souviselo s nedostatkem vzájemné interakce. Ale z porovnání počtu přibližování jednotlivých systémů jasně vyplývá, že vyšší tendenci vzdalovat se měly řetězce orientované paralelně, a to zejména pokud byl systém solí pouze neutralizován (Tab. 4).

Tab. 4 – Počet přibližování u jednotlivých systémů

		w	w_d	w_t
antiparalelní	0M	1	2	3
	0.2M	2	1	1
paralelní	0M	4	3	4
	0.2M	3	1	1

Někdy se také stalo, že řetězce v průběhu simulace spontánně změnily svou vzájemnou orientaci. Zatímco paralelní řetězce se při změně orientace úplně přetočily, antiparalelní řetězce měly ve velkém počtu případů tendenci se stáčet jen částečně a tvořit vazby téměř až do kříže (stále však částečně orientovány antiparalelně), případně zejména v přítomnosti terc-butanolu byla velmi častým fenoménem vazba do tvaru písmene T – tedy tak, že konec

jednoho z řetězců se vázal ke středu řetězce druhého, než došlo k dalšímu přetočení (Obr. 12).



Obr. 12 – Řetězce, interagující do kříže a do tvaru písmene T

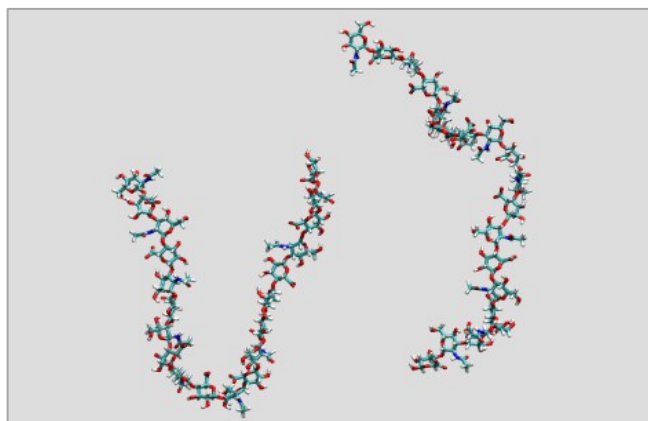
Následkem vzdálení nebo křížení řetězců někdy došlo k tak velkému přetočení, že se úplně změnila orientace (z antiparalelní na paralelní a naopak). V takovém případě musely být řetězce kromě přiblížení i znovu otočeny. Při srovnání počtu nutného manuálního přetáčení mezi jednotlivými systémy je zřejmé, že i zde jsou vyšší čísla u systémů paralelních (Tab. 5).

Tab. 5 – Počet přetáčení u jednotlivých systémů

		w	w _d	w _t
antiparalelní	0M	0	1,5	0
	0.2M	0	0	0
paralelní	0M	0	2,5	0
	0.2M	1	1	1

Podle tabulek 4 a 5 řetězce dávají přednost antiparalelní orientaci. Všechny paralelní systémy se alespoň jednou vzdálily a ve čtyřech případech z šesti došlo alespoň jednou k přetočení do antiparalelního uspořádání. Velmi často se sice jednalo o situaci, kdy se řetězce nejprve vzdálily a teprve poté došlo ke změně vzájemné orientace, ale i přes to je zajímavé, že se takto točily jen ty paralelní.

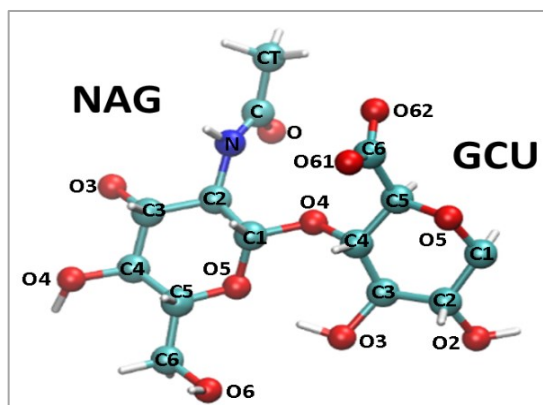
Jediným antiparalelním systémem, který měnil svou orientaci, byly řetězce v roztoku dioxanu, konkrétně u systému a_w_d_0M. Zde docházelo k tak významnému ohýbání řetězců, že část ještě byla uspořádána antiparalelně, zatímco jiná část řetězce už byla paralelní (Obr. 13). Proto jsou také v tabulce některé hodnoty neceločíselné. Celkově je možné konstatovat, že řetězce preferovaly antiparalelní uspořádání.



Obr. 13 – Řetězce v 0M dioxanu, zde „paralelní“

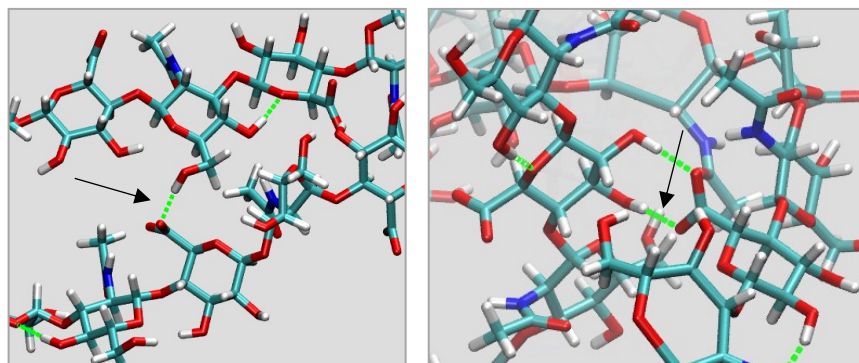
4.3 Vazebná uspořádání

Kromě celkového počtu intermolekulárních HB bylo také zkoumáno, které atomy kterých residuí se interakcí nejčastěji účastní. Pojmenování atomů N-acetyl- α -D-glukosaminu (NAG) a kyseliny β -D-glukoronové (GCU) v řetězcích HA vycházelo z jejich pojmenování v zadávacích souborech simulací (přehled na Obr. 14).



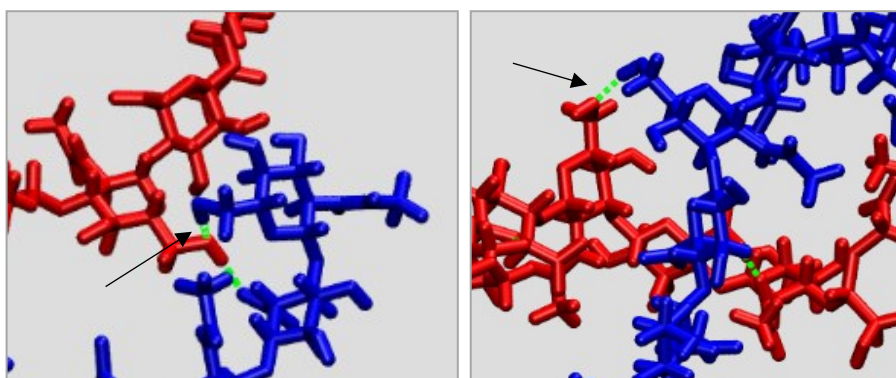
Obr. 14 – Označení jednotlivých atomů

Obecně je možné říci, že nejvýznamnější a nejčastější byly HB mezi kyslíkem O6 na NAG jednoho řetězce a karboxylovou skupinou na GCU druhého řetězce (Obr. 15). Tyto vazby se vyskytly ve všech simulovaných systémech (bez ohledu na orientaci řetězců, nebo druh rozpouštědla) a přestože v některých případech netvořily mezi druhy vazeb většinový podíl, vždy zaujímaly minimálně 30 %. Toto pozorování odpovídá i výsledkům z bakalářské práce a také navazující stáže, kde i při jiných teplotách vznikala velmi často právě tento typ vazby.



Obr. 15 – Nejčastější typy HB: O6-NAG (vlevo) a O3-GCU (vpravo) na karboxylovou skupinu (GCU)

Druhým velmi frekventovaným uspořádáním byla vazba mezi kyslíkem O3 na GCU a karboxylovou skupinou na GCU druhého řetězce (Obr. 15). Mimo výše uvedené se pak často vyskytovaly různé kombinace těchto atomů, případně ještě O2 na GCU nebo O a N na NAG. Při porovnání četnosti vazeb mezi skupinami GCU a NAG vždy převažovaly vazby na GCU (ať už z jiného GCU, nebo z NAG). Jedinou anomálií mezi všemi systémy byly řetězce a_w_d_02M, které měly naprostou převahu vazeb typu „O6-NAG“ na „O6-NAG“ (Obr. 16). Důvodem této výjimky je specifická konformace dvoušroubovice, kterou řetězce v tomto roztoku dioxanu zaujaly (viz 6 – Chování řetězců v roztoku dioxanu).



Obr. 16 – Detail vazby O6-O6 na dvou různých místech (a_w_d_02M)

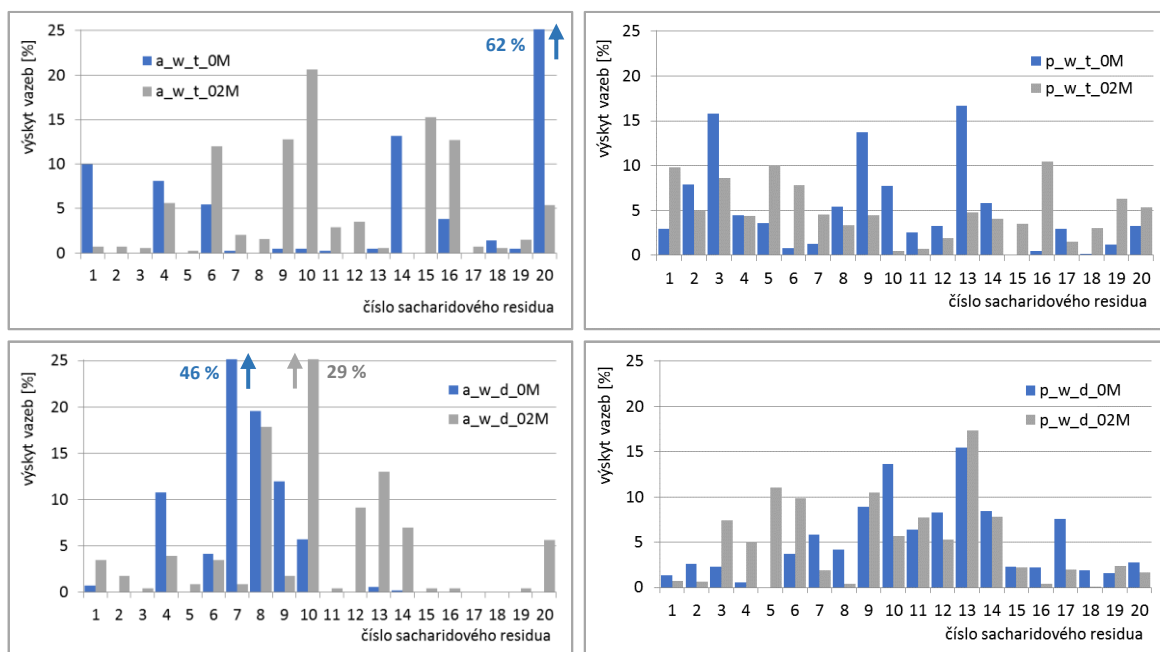
Mimo systém s dioxanem nebyly pozorovány žádné významné rozdíly v konkrétních typech vazeb mezi jednotlivými druhy rozpouštědla. Rozdíl byl ale znatelný mezi různě orientovanými řetězci.

V případě paralelních řetězců převažovala interakce mezi odlišnými residui (GCU-NAG), zatímco u antiparalelních byl větší podíl vazeb mezi stejnými sacharidy (GCU-GCU, NAG-NAG). U antiparalelních systémů bylo také podstatně častěji možné pozorovat vazbu mezi totožnými skupinami, nejčastěji mezi kyslíky O3 nebo O2 na GCU.

Překvapivé je, že by se dalo očekávat, že to budou právě paralelní řetězce, u kterých se budou více vázat stejná sacharidová residua (protože při paralelním uspořádání by měla být stejná residua vedle sebe). A naopak v případě antiparalelních by pak bylo logické, kdyby se zde častěji vázaly NAG a CCU. Ale není tomu tak, což potvrzuje i analýza míst tvorby HB.

Při analýze nejpreferovanějších míst vazby bylo zjišťováno, kde na řetězcích nejčastěji vzniká vazba. Překvapivým zjištěním bylo, že zatímco u paralelních řetězců byl podíl GCU a NAG (tedy lichých a sudých čísel, značících jednotlivá sacharidová residua) vyrovnaný a vazby se tvořily téměř na všech částech řetězce, u antiparalelních řetězců se vazby mnohdy objevovaly převážně na sudých residuích, tedy na N-acetylglukosaminech a jejich distribuce nebyla ani zdaleka tak vyrovnaná, jako u paralelních.

Při porovnání podílu vazeb na řetězcích u systémů v organických rozpouštědlech (Obr. 17) je vidět, že zatímco v paralelních systémech se vazby tvoří téměř ve všech částech řetězců, u systémů antiparalelních se vazby tvoří jen v několika specifických a obzvláště v terc-butanolu od sebe více vzdálených místech.



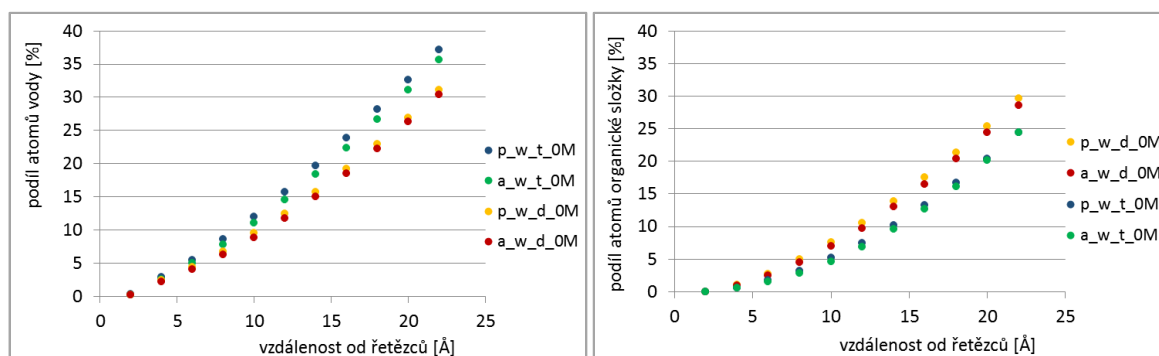
Obr. 17 – Výskyt HB na různých místech řetězce u systémů s terc-butanolem a dioxanem

V předchozí podkapitole bylo zmiňováno, že antiparalelní řetězce měly tendenci se stáčet a tvořit vazby do tvaru písmene T (hlavně a_w_t_0M). Jak je vidět z levého horního grafu na obrázku 16, řetězec, který se takto vázal na střed jiného řetězce, musel být k němu většinu času orientován residuem 20, tedy NAG skupinou. Je zajímavé, že i když se vazby na druhý konec, tedy na sacharid 1 – GCU občas vyskytovaly, u žádného systému nepřevažovaly.

5 DISTRIBUCE MOLEKUL ROZPOUŠTĚDLA

5.1 Molekuly rozpouštědla v okolí řetězců

Distribuce molekul rozpouštědla v okolí řetězců byla prováděna jak u řetězců vzájemně interagujících, tak i u těch, které se od sebe vzdálily (pro zajištění co největší objektivity – v okolí takto vzdálených řetězců se nacházelo opravdu jenom rozpouštědlo). Výsledky této analýzy pro nenasolené systémy je vidět na obrázcích 18 a 19 (kdy výpočet „podílu atomů“ je definován v kapitole 3.3 – Počítané charakteristiky).



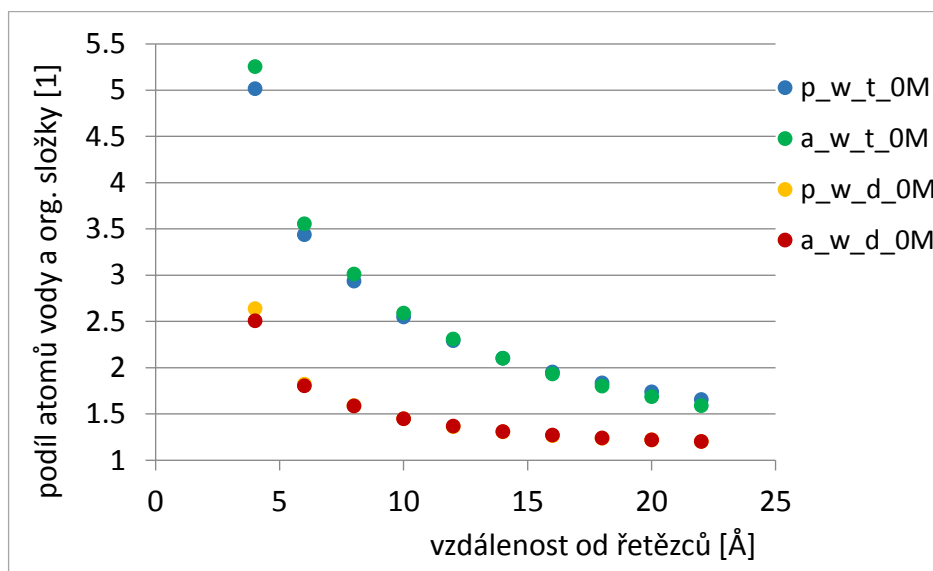
Obr. 18 – Podíl počtu atomů rozpouštědla a celkové počtu těchto atomů v různých vzdálenostech od řetězců HA

Při porovnání grafů je jasně patrné, že v okolí řetězců vždy převažuje voda nad organickou složkou. Tento přebytek je zvlášť výrazný u roztoku terc-butanolu (jak je vidět i z grafu na Obr. 19). Nejvíce vody mají v okolí řetězce v roztoku terc-butanolu, kdy v systému s neutralizovaným roztokem terc-butanolu se do vzdálenosti 22 Å od řetězců nacházelo téměř 40 % všech atomů vody ze simulace. Naopak větší podíl atomů organické složky bylo možné pozorovat u směsi s dioxanem. Pravděpodobným důvodem může být jednak fakt, že molekuly dioxanu jsou menší, a proto se lépe mísí s vodou, a pak také to, že terc-butanol ve vodě není schopen dosáhnout dokonalé distribuce a uspořádává se do viditelně odlišných oblastí terc-butanolu a oblastí vody.

Zajímavé je, že je zde možné pozorovat rozdíl mezi paralelním a antiparalelním uspořádáním, kdy v blízkosti paralelních řetězců se dle provedených výpočtů nachází větší podíl vody i organické složky, než v blízkosti řetězců antiparalelních.

Zatímco směs vody a terc-butanolu se nikdy dokonale nepromíchala, což dokazuje jak rozdíl mezi počtem atomů vody a organické složky, tak přímé pozorování simulovaných systémů v programu VMD, u dioxanu byl rozdíl podstatně menší a podíl molekul vody a organiky byl proto mnohem blíže k 1 (Obr. 19). Při analýze podílu molekul vody a molekul

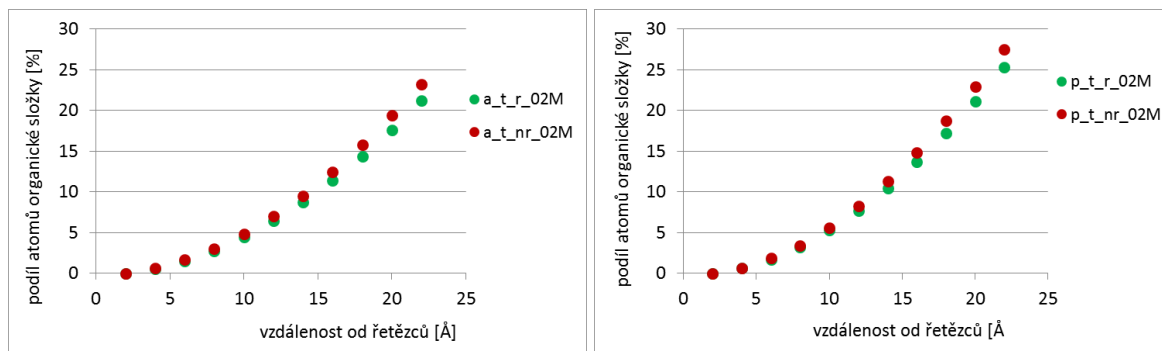
organických je vidět, že distribuce dioxanu je už ve vzdálenosti 10 angströmů od řetězců v podstatě vyrovnaná, zatímco podíl vody a terc-butanolu ani ve vzdálenosti 22 angströmů neklesl pod 1,5.



Obr. 19 – Distribuce molekul rozpouštědla v okolí řetězců

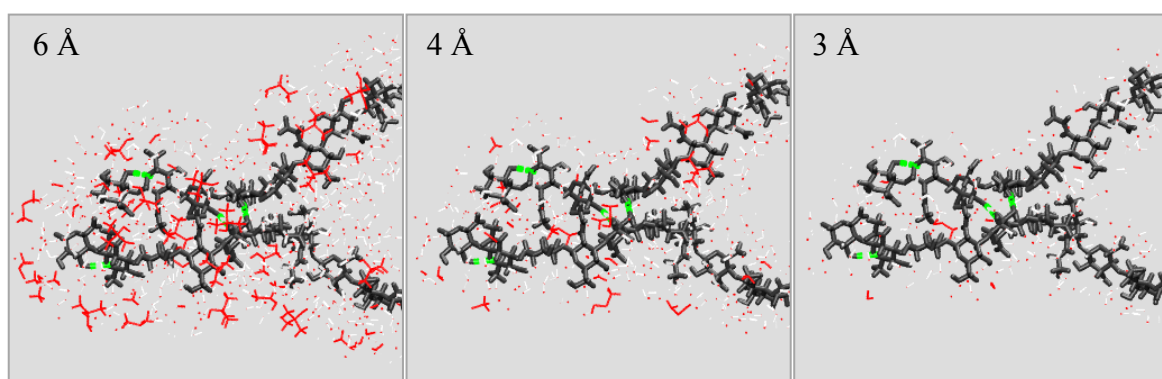
Rozdíly mezi oběma vzájemnými polohami řetězců jsou zde minimální – poměr počtu atomů vody k počtu atomů organiky je v okolí antiparalelních a paralelních řetězců téměř stejný. To odpovídá výše uváděnému pozorování, že přestože v okolí paralelních řetězců se nachází více vody, nachází se zde také více organické složky a poměr proto zůstává nezměněn. Důvodem, proč je v blízkosti paralelně natočených řetězců víc atomů, bude pravděpodobně odlišné sterické uspořádání, zřejmě více vyhovující přiblížení jak vody, tak organických molekul.

Mimo výše uváděné byla vyšetřována také distribuce molekul v systémech s 0,2M koncentrací NaCl, ale ukázalo se, že v přítomnosti iontů bylo obtížné pozorovat pravidelné trendy. Jediný pozoruhodný výsledek vykázalo porovnání výskytu atomů terc-butanolu v okolí vzdálených řetězců („rozplavaných“) a řetězců, nacházejících se poblíž sebe („nerozplavaných“). U všech ostatních systémů se v okolí interagujících řetězců nacházelo méně atomů rozpouštědla (s nejvyšší pravděpodobností proto, že část okolí každého řetězce již zabíral řetězec druhý), roztok terc-butanolu s 0,2M koncentrací soli byl ale z neznámého důvodu výjimkou (Obr. 20).



Obr. 20 – Distribuce terc-butanolu v okolí interagujících (nr) a vzdálených (r) řetězců

Navržené vysvětlení, že interakce řetězců ve směsi vody a terc-butanolu probíhá právě v oblastech, kde je terc-butanolu více, nebylo možné potvrdit, ani vyvrátit. Byly sice počítány molekuly terc-butanolu v okolí vazeb, ale nepodařilo se najít žádnou souvislost – v některých případech se HB vyskytovaly jen v nepřítomnosti terc-butanolu, jindy právě naopak. Bylo prováděno i vizuální zkoumání, zda se v blízkosti interagujících řetězců nachází terc-butanol, nebo ne, ale výsledek byl také neprůkazný (Obr. 21).

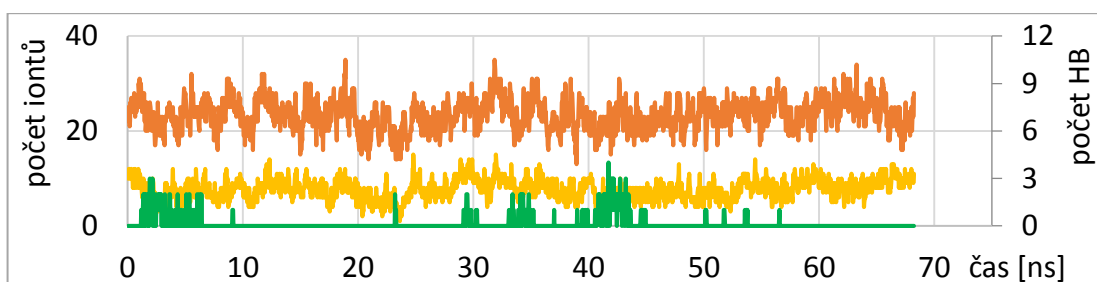


Obr. 21 – Molekuly terc-butanolu (červeně) v různých vzdálenostech od interagujících řetězců (p_w_t_02M), HB znázorněny zelenou přerušovanou čarou

Terc-butanol se v okolí vazeb občas nachází, ale mnohem víc je tam vody (na obrázku bílou barvou, aby vynikl terc-butanol). V úplné blízkosti řetězců se pak už nachází jenom voda a terc-butanol už tam není vůbec a v bezprostřední blízkosti intermolekulárních HB (ty dvě vazby vpravo) se nezdá, že by bylo významně více molekul terc-butanolu oproti ostatním částem řetězce. Je ale možné, že větší množství nerovnoměrně distribuovaného terc-butanolu v blízkosti řetězců (bez ohledu na to, zda přímo v místě vazby, nebo někde jinde) jejich vzájemnou interakci podporuje.

5.2 Ionty v okolí řetězců

Byl vyšetřován i počet iontů v okolí řetězců a případná souvislost s počtem HB. Nepodařilo se však najít nic, co by potvrdovalo, nebo vyvracelo, že počet iontů v okolí a počet vazeb by spolu mohly nějak souviset. Při porovnání počtů iontů a HB v grafu (Obr. 22) není vidět žádný trend.



Obr. 22 – Časový vývoj počtu HB (zelená) a iontů do vzdálenosti 4 Å (žlutá) a 10 Å (oranžová) pro systém a_w_02M

Samotné počty iontů ale vykazovaly poměrně zajímavé výsledky. Již z grafů časového vývoje bylo vidět, že v systémech s 0,2M koncentrací NaCl byl rozdíl mezi počtem iontů do vzdálenosti 4 Å a 10 Å výrazně odlišnější. Proto byl spočítán průměrný počet iontů v těchto dvou vzdálenostech v každém systému (Tab. 6).

Tab. 6 – Průměrný počet iontů do vzdálenosti 4 a 10 Å od řetězců, poslední cifra každé hodnoty je zasažena chybou

		Vzdálenost od řetězců – 4 Å			Vzdálenost od řetězců – 10 Å		
orientace	c _{NaCl}	w	w _d	w _t	w	w _d	w _t
antiparalelní	0M		7.74	4.46		11.90	8.76
	0.2M	7.71	16.47	13.68	23.41	26.19	26.14
paralelní	0M		6.98	4.88		10.95	9.24
	0.2M	6.70	14.97	12.00	21.64	23.17	24.65

Z tabulky 6 je jasně patrné, že do vzdálenosti 4 Å má nejvíc iontů v blízkosti systém s dioxanem, pak systém s terc-butanolem a nejméně iontů je v okolí vody. To odpovídá permitivitě těchto rozpouštědel, kdy voda má nejvíce a dioxan nejméně. Do vzdálenosti 10 Å je trend stejný u 0M systémů. V případě systémů s 0,2M koncentrací soli je počet iontů v čisté vodě opět nejnižší, ale v organických rozpouštědlech už je vyrovnaný.

Při vzájemném porovnání antiparalelních a paralelních systémů je vidět, že téměř vždy je více iontů v okolí antiparalelních řetězců. To by mohlo souviset s tím, že je zde větší poměr

molekul vody oproti molekulám organických rozpouštědel (viz předchozí podkapitola). I zde je ale jedna výjimka a tou je systém p_w_t_0M. Důvod této anomálie není jasný.

Dále byly porovnány počty iontů v prostoru mezi 4 a 10 Å od řetězců, tedy rozdíl dvou výše uvedených vzdáleností (Tab. 7). Zde došlo k pochopitelné situaci, kde u všech systémů, které byly pouze neutralizované (a bylo v nich tedy pouze 20 iontů Na⁺), vycházel průměrný počet iontů v daném prostoru stejně – 4.

Tab. 7 – Průměrný počet iontů v prostoru mezi 4 a 10 Å od řetězců, poslední cifra každé hodnoty je zasažena chybou

		w	w_d	w_t
0M	antiparalelní		4.2	4.3
	paralelní		4.0	4.4
02M	antiparalelní	15.7	9.7	12.5
	paralelní	14.9	8.2	12.6

Nejvíce iontů bylo mezi 4 a 10 Å od řetězců ve vodě, potom v terc-butanolu a nejméně iontů se vyskytovalo v případě systémů s dioxanem. Toto pořadí opět odpovídá seřazení podle elektrické permitivity. Při porovnání antiparalelních a paralelních systémů v tabulce 7 je patrné, že opět se víc iontů nacházelo v okolí antiparalelních řetězců s výjimkou systémů s terc-butanolem.

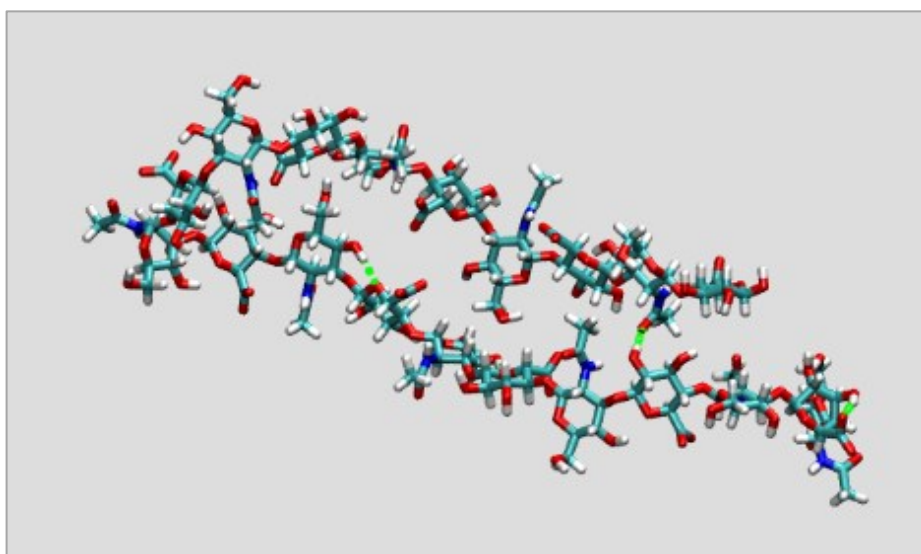
Při pohledu na tabulky 6 a 7 je zajímavé, že iontů bylo celkově nejvíc v dioxanu, přičemž tyto ionty se převážně nacházely ve vzdálenosti menší než 4 Å od řetězců. Ve vodě bylo iontů nejméně a i ty, které tam byly, tak se vyskytovaly spíše dál od řetězců. U terc-butanolu pak byla distribuce iontů nejvyrovnanější. Důvod, proč se tolik iontů nacházelo v blízkosti řetězců zrovna v dioxanu, bude více rozveden v další kapitole.

6 CHOVÁNÍ ŘETĚZCŮ V ROZTOKU DIOXANU

6.1 Ohebnost řetězců

Na základě všech výše uvedených analýz je možné říci, že nejodlišnější chování mají řetězce HA právě v přítomnosti dioxanu. Z prováděných pozorování se například zdá, že HA je v dioxanu podstatně ohebnější než ve vodě, nebo v terc-butanolu. V průběhu simulací řetězců v dioxanové směsi (bez přítomnosti iontů) došlo hned dvakrát k situaci, kdy se jeden z řetězců ohnul natolik, že bylo při následném přibližování obtížné určit, zda se jednalo o paralelní nebo antiparalelní uspořádání (Obr. 13).

V jednom z případů byl řetězec dokonce ohnutý tolik, že bylo možné mezi jednotlivými částmi řetězce pozorovat intramolekulární vazby (Obr. 23) a to v poměrně velkém množství – 7,2 HB/ns. V takovémto tvaru zůstal řetězec přibližně 14 ns a pravděpodobně by zůstal ještě déle, kdyby se pokračovalo v simulaci. Vzhledem k tomu, že hlavním zájmem této práce byly interakce mezi řetězci a ne v rámci jednoho řetězce, byla simulace v tomto bodě přerušena.

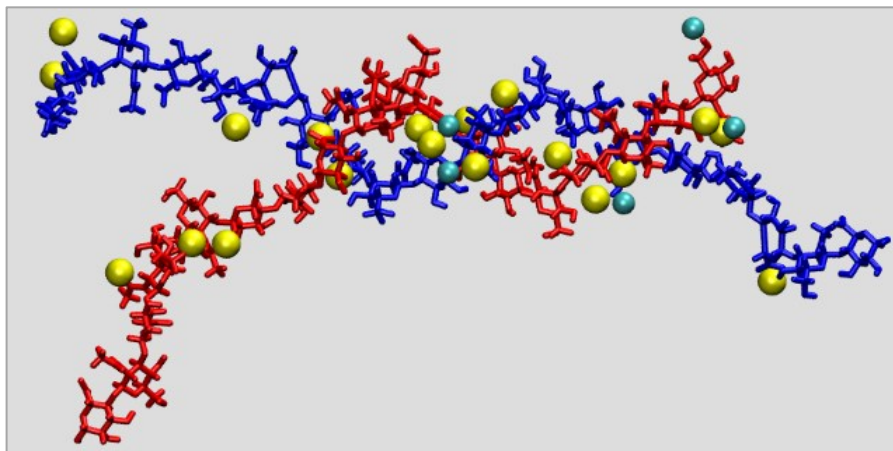


Obr. 23 – Řetězec v 0M dioxanu, původně paralelní, s HB (zeleně)

6.2 Antiparalelní dvoušroubovice

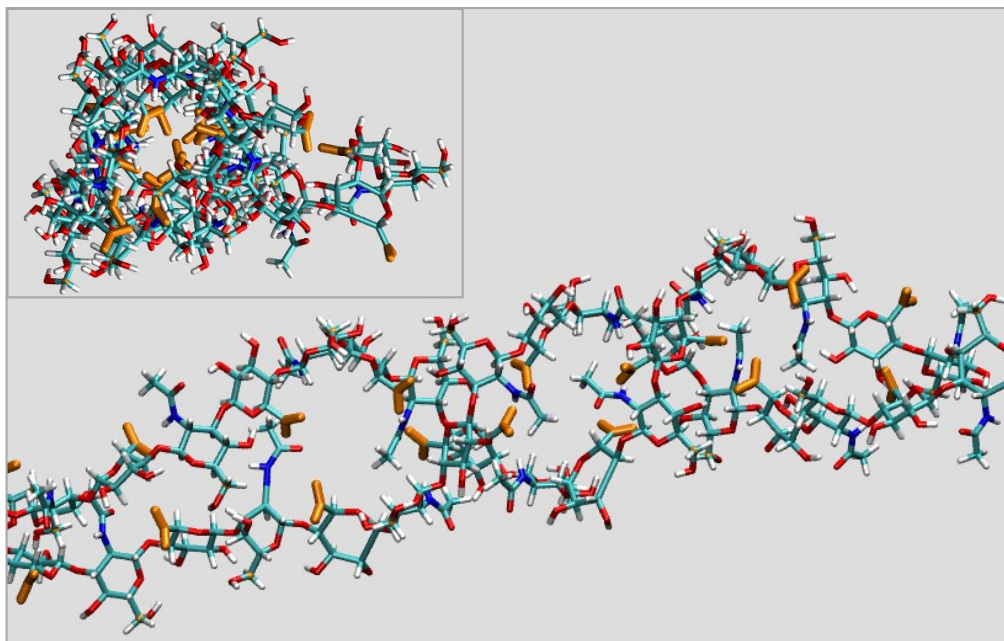
Při pohledu na počet HB mezi řetězci s 0,2M koncentrací soli (Obr. 10 v kapitole 4 – 27 interakce mezi řetězci) je u dioxanu poněkud zarážející, že při 0,2M koncentraci soli je v případě paralelního uspořádání řetězců počet vazeb maximální, zatímco při antiparalelní orientaci absolutně minimální. Důvodem tohoto jevu je to, že v roztoku dioxanu se za

přítomnosti NaCl řetězce HA doopravdy stočily do dvoušroubovice, o které se píše v odborné literatuře (Obr. 24).



Obr. 24 – Antiparalelní dvoušroubovice s ionty (sodnými žlutě, chloridovými zelenomodře) do vzdálenosti 4 Å

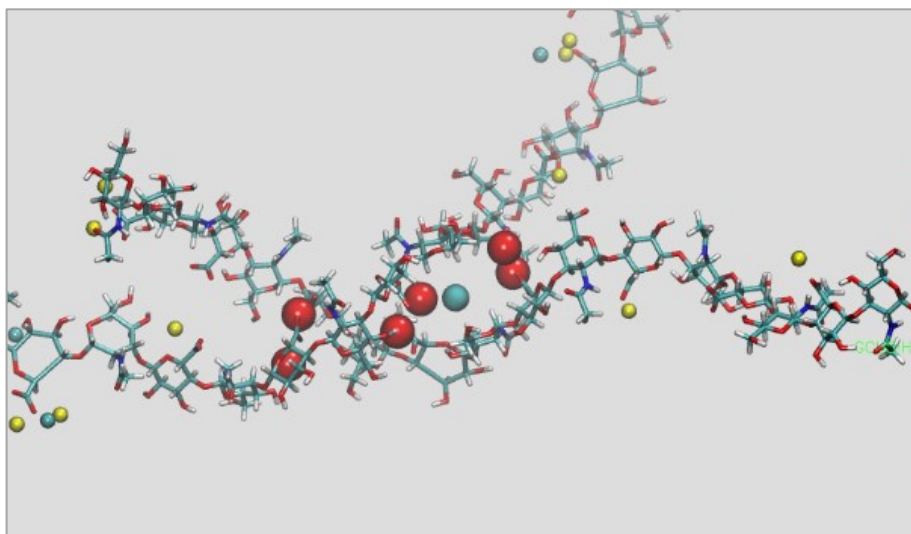
Šroubovice zde vypadá přesně tak, jak ji popisuje odborná literatura. Například je možné poměrně zřetelně pozorovat tvrzení z kapitoly 1.2 – Struktura, že karboxylové skupiny jsou orientovány dovnitř šroubovice (Obr. 25).



Obr. 25 – Karboxylové skupiny (oranžově), orientované ke středu šroubovice, u systému a_w_d_02M s detailním pohledem ze strany

Tím, co šroubovici drželo pohromadě, nebyly ovšem HB, ale ionty, které se mezi řetězci vyskytovaly ve dvojicích, nebo i samostatně, jak bylo vidět i na obrázku 24. V některých

případech ionty tvořily jakési „dvojmůstky“ (Obr. 26), kterými podporovaly interakci mezi řetězci a umožňovaly jim zaujmout právě tvar dvoušroubovice.

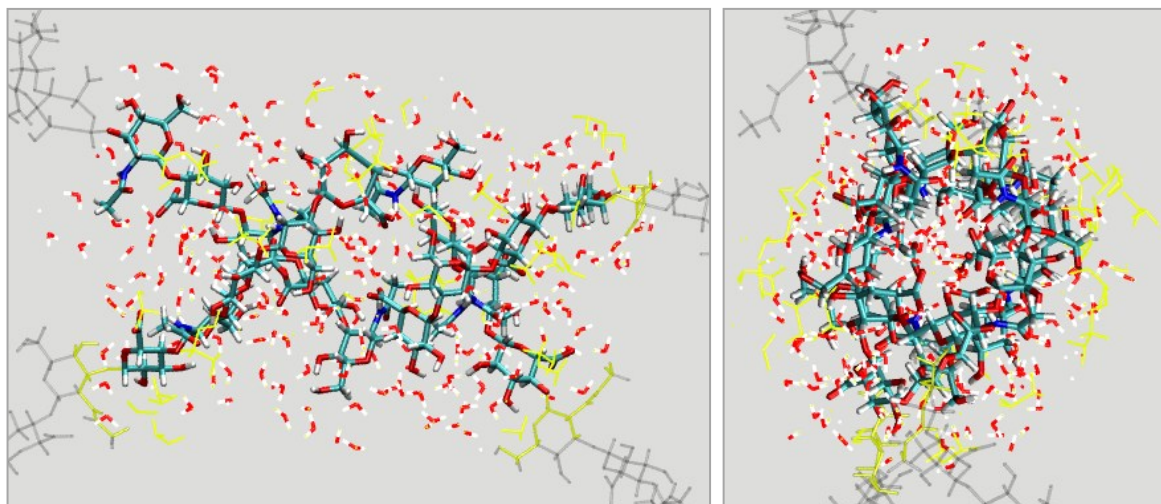


Obr. 26 – Iontové mosty (červeně) při tvorbě šroubovice v a_w_d_02M, kdy menšími kuličkami jsou znázorněny ostatní ionty

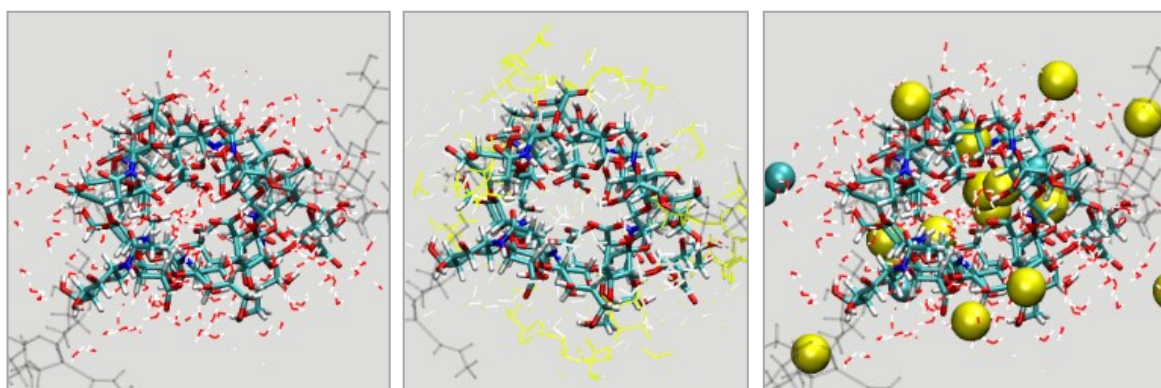
Ionty pomáhaly i při vzniku dvoušroubovice, kdy v případě antiparalelního systému se nejprve řetězce pootočily do vazby ve tvaru kříže. Následně začaly ionty v blízkosti tohoto překřížení přitahovat řetězce blíž k sobě a stáčet je. Příklad toho, jak iontové dvojice pomáhaly formovat dvoušroubovici, je možné vidět v přílohách.

Nejednalo se o jedny ionty, zafixované zde po celou simulovanou dobu, naopak – velmi často bylo možné pozorovat, že jakmile se nějaký sodný iont přiblížil k jiné dvojici iontů, zprostředkovávající vazbu, jeden z dvojice se vzdálil a uvolnil tak místo nově příchozímu. I přes toto dynamické obměňování se mezi řetězci po celou dobu vyskytovalo iontů poměrně velké množství.

Mezi řetězci se vyskytovaly také molekuly rozpouštědla. Jak je ale vidět na obrázcích 27 a 28, přímo mezi řetězci se nacházely pouze molekuly vody (znázorněny červeno-bíle). Molekuly dioxanu se sice v blízkosti řetězců nacházejí, ale zásadně vně dvoušroubovice a až přibližně od vzdálenosti 2,5 Å. To odpovídá pozorování z kapitoly 5.1. Distribuce molekul rozpouštědla, kde bylo změřeno, že v blízkosti antiparalelních řetězců je větší podíl vody, než organických molekul.



Obr. 27 – Detail šroubované části u systému a_w_d_02M se znázorněním molekul vody a dioxanu (žlutě) do vzdálenosti 4 Å od řetězců (vlevo pohled z boku, vpravo pohled ve směru osy šroubovice)



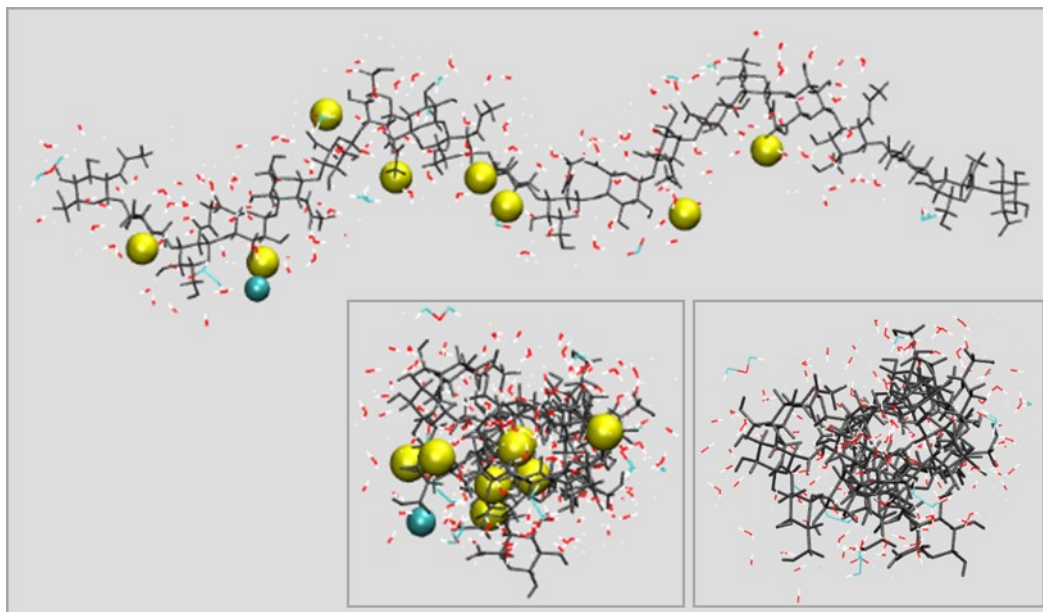
Obr. 28 – Blízké okolí šroubovice: molekuly vody (vlevo) a molekuly dioxanu (uprostřed) do vzdálenosti 4 Å od řetězců HA a ionty do vzdálenosti 6 Å od HA řetězců (vpravo).

Při detailním pohledu na prostor mezi řetězci (Obr. 28) je také vidět, že jsou řetězce od sebe poměrně dost vzdáleny. Právě tím, že mezi řetězci byly ionty a voda, byly řetězce už moc daleko na to, aby se mohly tvořit intermolekulární HB, a proto jich bylo v systému a_w_d_02M pozorováno tak málo. Naproti tomu v jeho paralelním protějšku se řetězce na několika místech vázaly i přes ionty a tyto dynamicky se obměňující vazby byly přítomny téměř po celou dobu simulace.

6.3 Paralelní dvoušroubovice

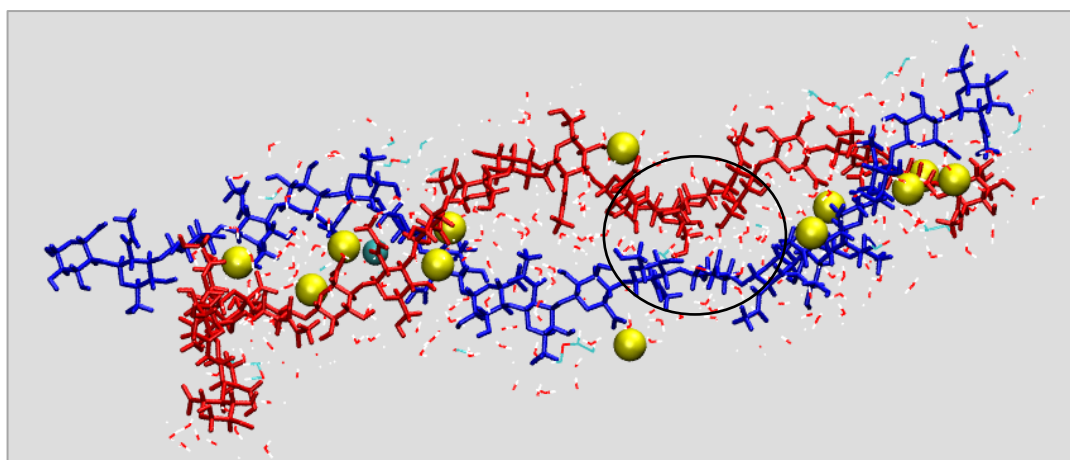
U systému p_w_d_02M vznikla dvoušroubovice odlišným způsobem, než u jeho antiparalelního protějšku. Zde se nejdříve vytvořila poměrně pravidelná šroubovice zvláště na každém řetězci (Obr. 29, kde řetězce HA jsou šedé a všechno ostatní je zbarvené dle

obvyklého značení) a teprve poté se k sobě přiblížily. Ve vnitřním prostoru šroubovice se nacházely ionty a opět i karboxylové skupiny (přesto že z obrázku to není moc vidět), ale ne dioxan, jak je vidět z pohledu ve směru osy šroubovice.



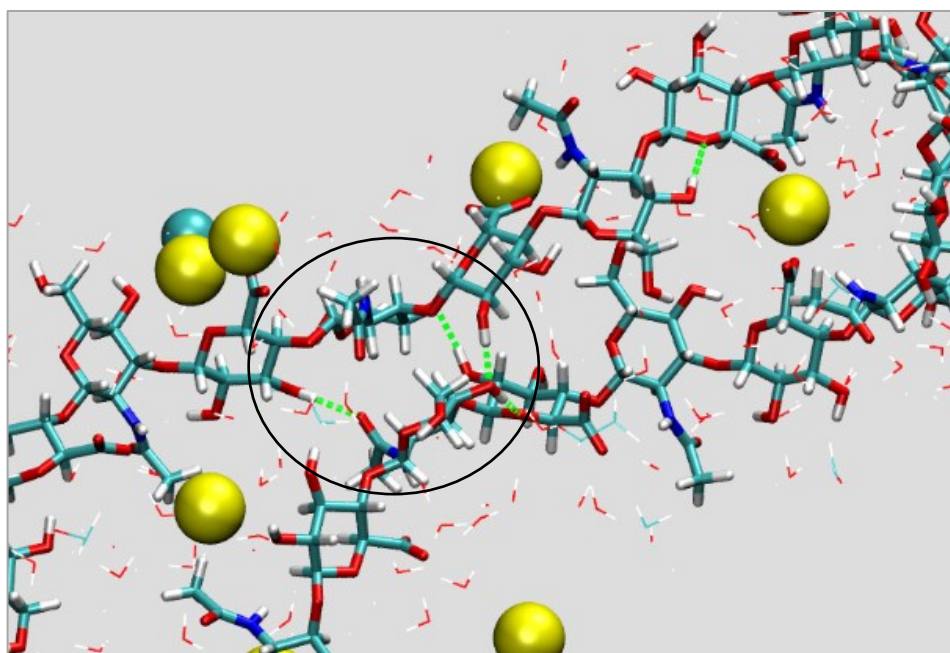
Obr. 29 – Dioxanová paralelní jednošroubovice s ionty a rozpouštědlem ve vzdálenosti do 3 Å od řetězců s detailním bočním pohledem do vnitřního prostoru šroubovice s ionty (vlevo) a bez nich (vpravo)

Dvě takovéto šroubovice se v průběhu simulací přiblížily natolik, že bylo možné, aby se do sebe částečně zamotaly (Obr. 30) a vytvořily tak paralelní dvoušroubovici se dvěma místy, kde se řetězce skutečně křížily. Střed obou šroubovic ale zůstal v původním tvaru a vzniklá dvoušroubovice tak není úplně pravidelná.



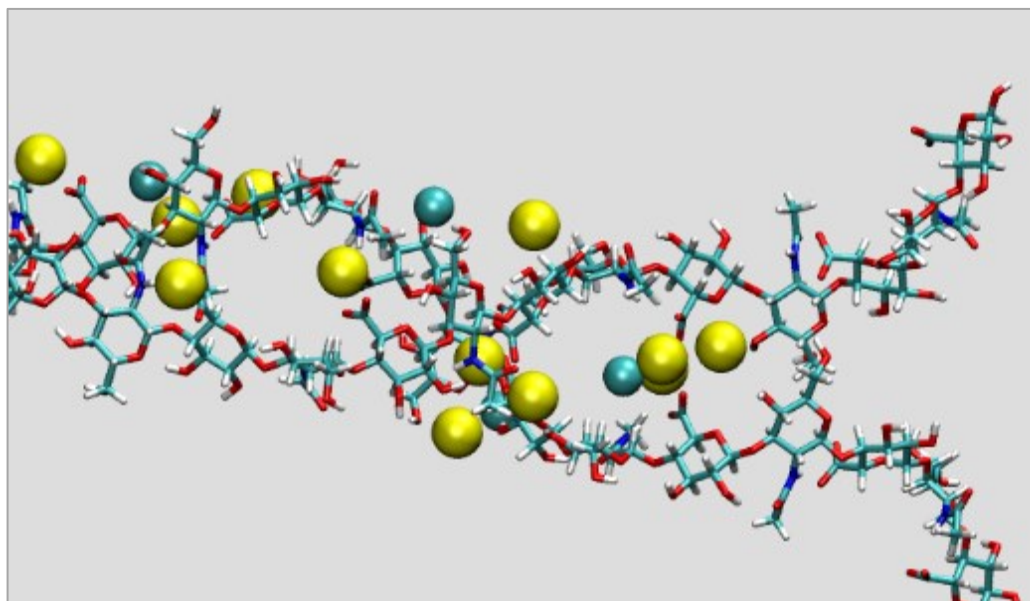
Obr. 30 – Paralelní dvoušroubovice s molekulami rozpouštědla do vzdálenosti 3 Å

Při podrobnějším zaměření na jednotlivé části šroubovice lze vidět, že ve středu obou řetězců, v místě, kde by se řetězce měly křížit, ale nedělají to, jsou opravdu blízko u sebe. Jsou tak blízko, že se mezi nimi mohou tvořit HB, jak lze vidět i na Obr. 31. Interakce by se dala označit jako hydrofobní, protože mezi řetězci se v tomto místě nenachází dioxan, ani ionty a dokonce ani voda.



Obr. 31 – Detail nepravidelného místa šroubovice s HB (zeleně) a molekulami iontů a rozpouštědla ve vzdálenosti do 3 Å od řetězců.

Ve zbývajících částech šroubovice, kde je její tvar pravidelnější, je možné pozorovat stejné chování, jako při antiparalelní orientaci. V prostoru mezi řetězci se opět nachází velké množství iontů a tvoří opět jakési „můstky“ mezi řetězci (Obr. 32). Zajímavé je, že se nejedná jen o ionty Na^+ , ale stejně jako u antiparalelní šroubovice, i zde se občas mezi řetězci vyskytne i Cl^- .



Obr. 32 – Detail okrajové části paralelní dvoušroubovice, kde je mezi řetězci dost prostoru na to, aby se zde mohly vyskytovat ionty (zobrazeny jsou jen ty ve vzdálenosti do 4 Å).

Na základě provedených simulací se zdá, že při antiparalelní orientaci řetězců se tvoří pravidelná šroubovice, kde vzniká minimum HB a v jejím vnitřním prostoru se nachází voda a ionty, zatímco při paralelním uspořádání dochází ke kombinaci obtáčení řetězců za pomoci iontů a hydrofobní interakce při které jsou mezi řetězci pouze HB. Důvodem by mohlo být to, že každá šroubovice vznikala jinak – antiparalelní z křížení, paralelní ze dvou samostatných šroubovic. Kdyby měly řetězce na začátku stejné podmínky, nebyly by HB možná ani v paralelním systému. Je ale možné i to, že k hydrofobní interakci u paralelního systému nedošlo náhodou, a proto i pokud by řetězce měly na počátku stejné podmínky, stejně by se výsledné šroubovice lišily, např. stoupáním. Pro potvrzení nebo vyvrácení kterékoliv z těchto hypotéz by však bylo potřeba provést více simulací různě orientovaných řetězců v systémech s dioxanem.

Hlavním závěrem tohoto pozorování však je, že nepřítomnost HB nemusí nutně znamenat nepřítomnost vzájemné interakce. Nejlepší interakci bylo možné pozorovat právě tam, kde žádné HB nebyly.

ZÁVĚR

Cílem práce byl popis toho, jak se liší interakce hyaluronanů ve vodě oproti interakcím ve směsích vody a organických látek se zvláštním zaměřením na analýzu vodíkových vazeb mezi řetězci. Proto byly simulovány dva dvacetisacharidové řetězce hyaluronanu sodného, v polovině systémů orientovány antiparalelně, v polovině paralelně, při dvou různých koncentracích NaCl (0M a 0,2M) a ve třech různých rozpouštědlech – v čisté vodě, ve směsi vody a dioxanu a ve směsi vody a terc-butanolu v objemovém poměru 1:1.

Bylo prokázáno, že volba rozpouštědla a množství soli, disociované v roztoku značně ovlivňovaly míru interakce i počet vodíkových vazeb. Velký význam měla i orientace řetězců – paralelní řetězce více reagovaly v přítomnosti dioxanu, antiparalelní řetězce v přítomnosti terc-butanolu. Jelikož řetězce měly v některých systémech tendenci se od sebe vzdalovat, resp. se vůči sobě přetáčet, bylo v některých případech nutné je manuálně přiblížit, resp. otočit, a to někdy i opakovaně. Toto chování bylo častější u systémů s řetězci orientovanými paralelně.

Vodíkové můstky nejčastěji vznikaly mezi karboxylovou skupinou na kyselině glukoronové a některou z OH skupin druhého řetězce (nejčastěji O6 na N-acetylglukosaminu). Místa vazeb se u jednotlivých rozpouštědel příliš nelišila, ale u antiparalelně orientovaných řetězců byly preferovány vazby mezi stejnými sacharidovými residui, zatímco paralelní řetězce dávaly přednost vazbě mezi odlišnými sacharidy ve všech částech řetězců.

Při studiu distribuce molekul rozpouštědla bylo zjištěno, že víc atomů se nacházelo v okolí řetězců paralelních, přičemž v systémech s terc-butanolem bylo v okolí řetězců výrazně víc vody. Distribuce dioxanu a vody byla rovnoměrná již ve vzdálenosti 10 Å od řetězců, zatímco v systémech s terc-butanolem se poměr vody a organické složky nevyrovnal ani ve vzdálenosti 22 Å. U systémů s terc-butanolem a 0,2M koncentrací soli se víc terc-butanolu nacházelo v blízkosti interagujících řetězců, než v blízkosti řetězců, které od sebe byly vzdáleny.

Zajímavých výsledků bylo dosaženo u systémů s dioxanem, kde řetězce vykazovaly nezvyklou míru ohebnosti a při přidání 0,2 M NaCl se stáčely do tvaru dvojité šroubovice. Antiparalelní řetězce tvořily pravidelnou šroubovici, spojenou iontovými vazbami mezi karboxylovými skupinami. Ionty se zde v blízkosti řetězců zdržovaly výrazně více, než v ostatních rozpouštědlech. U antiparalelní dvoušroubovice zpravidla nevznikaly vodíkové vazby, a když ano, jednalo se o vazby mezi OH skupinami N-acetylglukosaminů.

Paralelní systémy v přítomnosti dioxanu také vytvořily dvoušroubovici, ale méně pravidelnou a vázanou nejen iontovými mosty, ale také vodíkovými vazbami a zřejmě i hydrofobní interakcí. Důvody tohoto odlišného chování mohly být sterické, ale mohlo se jednat také pouze o náhodu, zapříčiněnou odlišným způsobem vzniku – antiparalelní šroubovice vznikala z natažených řetězců, zatímco na tvorbě té paralelní se podílely řetězce, které už před tím samy zaujímaly tvar šroubovice. V obou případech se v blízkosti řetězců nacházel dioxan, ale pouze vně šroubovice – ve vnitřním prostoru byla jen voda a ionty.

Nejdůležitějším závěrem této práce bylo zjištění, že použité rozpouštědlo má značný vliv na míru interakce, protože v dioxanu interagovaly řetězce prokazatelně nejvíce. A v terc-butanolu sice nevznikly dvou-šroubovice, ale řetězce zde tvořily poměrně velké množství vodíkových vazeb. Přidání organických molekul do rozpouštědla tedy míru interakce mezi řetězci podstatně zvýšilo. Pro popis míry vzájemné interakce však není nejvhodnějším ukazatelem počet vodíkových můstků mezi řetězci. Nejvýznamnější pozorovaná interakce – tvorba dvou-šroubovice v roztoku dioxanu, byla zprostředkovávána vazbami iontovými.

Pro další studie by jistě bylo zajímavé nechat v roztoku dioxanu s 0,2M koncentrací soli interagovat delší řetězce a pozorovat, zda by vytvořily šroubovici, nebo ne, resp. jak by taková šroubovice vypadala. Také by bylo možné pokračovat ve zkoumání vlivu vzájemné orientace řetězců na typ takto vznikající šroubovice. Zajímavé by mohlo být i studium interakce dvou řetězců hyaluronanu při stejné teplotě, ale vyšších koncentracích solí.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Bathe M., Rutledge G. C., Grodzinsky A. J., Tidor B., A coarse-grained molecular model for glycosaminoglycans: application to chondroitin, chondroitin sulfate, and hyaluronic acid. *Biophysical Journal*, 88, 2005, str. 3870-3887. DOI: <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.058800>
- [2] Necas, J., Bartosikova, L., Brauner, P., Kolar, J., Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinarni Medicina*, 53, 2008 (8), str. 397-411. DOI: <https://doi.org/10.17221/1930-VETMED>
- [3] Almond A.: Hyaluronan. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64, 2007, str. 1591-1596. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7032-z>
- [4] Giubertoni G., Koenderink G. H., Bakker H. J., Direct observation of intrachain hydrogen bonds in aqueous hyaluronan. *The Journal of Physical Chemistry A*, 123, 2019, str. 8220-8225. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jpca.9b06462>
- [5] Kogan G., Šoltés L., Stern R., Gemeiner P., Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnology Letters*, 29, 2007, str. 17-25. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9219-z>
- [6] Scott J. E., Heatley F., Biological properties of hyaluronan in aqueous solution are controlled and sequestered by reversible tertiary structures, defined by NMR spectroscopy. *Biomacromolecules*, 3, 2002, str. 547-553. DOI: <https://doi.org/10.1021/bm010170j>
- [7] Pogany P., Kovacs A.: Theoretical study of hyaluronan oligosaccharides. *Structural Chemistry*, 21, 2010, str. 1185-1194. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11224-010-9658-y>
- [8] Almond A., Sheehen J. K., Brass A., Molecular dynamics simulations of the two disaccharides of hyaluronan in aqueous solution. *Glycobiology*, 7, 1997, str. 597-604. DOI: <https://doi.org/10.1093/glycob/7.5.597>
- [9] Almond A., DeAngelis P. L., Blundell C. D., Hyaluronan: the local solution conformation determined by NMR and computer modeling is close to a contracted left-handed 4-fold helix. *Journal of Molecular Biology*, 358, 2006, str. 1256-1269. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.02.077>

- [10] Zhang M., Qing G., Sun T., Chiral biointerface materials. *Chemical Society Reviews*, 41, 2012, str. 1972-1984. DOI: <https://doi.org/10.1039/c1cs15209b>
- [11] Sheehan J. K., Gardner K.H., Atkins E. D. T., Hyaluronic acid: a double-helical structure in the presence of potassium at low pH and found also with the cations ammonium, rubidium and caesium. *Journal of Molecular Biology*, 117, 1977, str. 113-135. DOI: [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(77\)90027-4](https://doi.org/10.1016/0022-2836(77)90027-4)
- [12] Gribbon P., Heng B. C., Hardingham T. E., The Analysis of Intermolecular Interactions in Concentrated Hyaluronan Solutions Suggest No Evidence for Chain-chain Association. *Biochemical Journal*, 350, 2000, str. 329-335. DOI: <https://doi.org/10.1042/bj3500329>
- [13] Bhattacharya S., Dubey D. K., Effect of aggrecan degradation on the nanomechanics of hyaluronan in extra-fibrillar matrix of annulus fibrosus: A molecular dynamics investigation. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 107, 2020, 103752. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2020.103752>
- [14] Giubertoni G., Burla F., Martinez-Torres C., Dutta B., Pletikapic G., Pelan E. G., Rezus Y. L. A., Koenderink G. H., Bakker H. J., Molecular Origin of the Elastic State of Aqueous Hyaluronic Acid. *The Journal of Physical Chemistry B*, 123, 2019, str. 3043-3049. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.9b00982>
- [15] Kolaříková A., Studium interakcí hyaluronan-hyaluronan metodou molekulové dynamiky [bakalářská práce]. *Univerzita Tomáše Bati, Zlín*, 2019.
- [16] Bicudo R. C. S., Santana M. H. A., Effects of organic solvents on hyaluronic acid nanoparticles obtained by precipitation and chemical crosslinking. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 12, 2021, str. 1-9. DOI: <https://doi.org/10.1166/jnn.2012.5814>
- [17] Staskus P. W., Johnson W. C., Conformational Transition of Hyaluronic Acid in Aqueous-Organic Solvent Monitored by Vacuum Ultraviolet Circular Dichroism. *Biochemistry*, 27, 1988, str. 1522-1527. DOI: <https://doi.org/10.1021/bi00405a019>
- [18] Tian X., Azpurua J., Hine C., Vaidya A., Myakishev-Rempel M., Ablueva J., Mao Z., Nevo E., Gorbunova V., Seluanov A., High-Molecular-Mass Hyaluronan Mediates the Cancer Resistance of the Naked Mole Rat. *Nature* 499, 2013, str. 346-349. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature12234>

- [19] Payne W. M., Svechkarev D., Kyrychenko A., Mohs A. M., The role of hydrophobic modification on hyaluronic acid dynamics and self-assembly. *Carbohydrate Polymers*, 182, 2018, str. 132-141. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.10.054>
- [20] Pelikán, V., Hora, P., *Paralelní výpočty v molekulární dynamice* [prezentace]. Ústav termomechaniky AV ČR, v.v.i., 2011.
- [21] *Výukové materiály pro předmět Počítačová chemie, 7. přednáška* [online prezentace]. Národní centrum pro biomolekulární výzkum, Masarykova univerzita v Brně, [cit. 7.4.2021] Dostupné z: <https://slideplayer.cz/slide/3148608/> nebo z: http://www.ncbr.muni.cz/~n19n/vyuka/pocitacova_chemie/#syt
- [22] Almond A., Multiscale modeling of glycosaminoglycan structure and dynamics: current methods and challenges. *Current Opinion in Structural Biology*, 50, 2018, str. 58-64. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2017.11.008>
- [23] Nagarajan B., Sankaranarayanan N. V., Desai U. R., Perspective on computational simulations of glycosaminoglycans. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, 9 (2), 2019. DOI: <https://doi.org/10.1002/wcms.1388>
- [24] Sklenovský, P., *Úvod do molekulárního modelování: Molekulová mechanika* [online prezentace]. Univerzita Palackého v Olomouci, [cit. 7.4.2021]. Dostupné z: http://fch.upol.cz/skripta/momo/molekulova_mechanika.pdf
- [25] Otyepka, M., *Molecular Dynamics: classical MD of biomolecules* [online prezentace]. Univerzita Palackého v Olomouci, 2012 [cit. 7.4.2021]. Dostupné z: http://fch.upol.cz/wp-content/uploads/2015/11/MOM_MD.pdf
- [26] Humphrey, W., Dalke, A., Schulten, K., VMD – Visual Molecular Dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, 14, 1996, str. 33-38. DOI: [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5)
- [27] NAMD User's Guide Version 2.14 [online]. University of Illinois at Urbana-Champaign. Poslední aktualizace: 13.2.2021 [cit. 7.4.2021]. Dostupné z: <http://www.ks.uiuc.edu/Research/namd/>
- [28] Bowron D. T., Finney J. L., Soper A. K., Structural investigation of solute-solute interactions in aqueous solutions of tertiary butanol. *The Journal of*

- Physical Chemistry B*, 102 (18), 1998, str. 3551-3563. DOI: <https://doi.org/10.1021/jp972780c>
- [29] Hovorka F., Schaefer R. A., Dreisbach D., The system dioxane and water. *Journal of the American Chemical Society*, 58 (11), 1936, str. 2264-2267. DOI: <https://doi.org/10.1021/ja01302a051>
- [30] Dalton Research Group, Dielectric constant of common solvents. University of Washington, Department of Chemistry, 2007. Dostupné z: https://depts.washington.edu/eoopic/linkfiles/dielectric_chart%5B1%5D.pdf
- [31] Whim, B. P., Johnson P. G., Directory of Solvents. Springer Science & Business Media, 2012, str. 193. ISBN: 9400915497. Dostupné z: https://books.google.cz/books?id=s_jrCAAAQBAJ&hl=cs&source=gbs_navlinks_s
- [32] Onufriev A. V., Izadi S., Water models for biomolecular simulations. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, 8 (2), 2018. DOI: <https://doi.org/10.1002/wcms.1347>
- [33] Darden T., York D., Pedersen L., Particle mesh Ewald: An N·log(N) method for Ewald sums in large systems. *The Journal of Chemical Physics*, 98 (12), 1993, 10089. DOI: <https://doi.org/10.1063/1.464397>

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

HA	kyselina hyaluronová
HB	vodíkové vazby
Da	dalton (atomová hmotnostní konstanta)
MD	molekulová dynamika
NMR	nukleární magnetická resonance
VdW	van der Waalsovy (např. síly)
E_{LJ}	Lennard-Jonesův potenciál
RTG	rentgenové (např. záření)
VMD	Visual Molecular Dynamics software
NAMD	NANoscale Molecular Dynamics software
NaCl	chlorid sodný
M	molarita (jednotka koncentrace $\rightarrow 1 \text{ M} = 1 \text{ mol/dm}^3$)
Å	angström (jednotka délky $\rightarrow 1 \text{ Å} = 10^{-10}$ metrů)
c_{NaCl}	koncentrace NaCl
NAG	N-acetyl- α -D-glukosamin
GCU	kyselina β -D-glukoronová

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 – Struktura jedné jednotky hyaluronanu [2]	10
Obr. 2 – Ilustrace levotočivé šroubovice s periodou identity čtyři [10]	11
Obr. 3 - Struktura dvoušroubovic – na obrázku nejsou pro zajištění přehlednosti ukázány N-acetylové skupiny [11].....	12
Obr. 4 – Příklad struktury vodních mostů [8]	13
Obr. 5 – Jednotlivé složky potenciálové funkce molekul [24]	18
Obr. 6 – Grafické znázornění molekul terc-butanolu a dioxanu.....	21
Obr. 7 – Model vody TIP3P.....	22
Obr. 8 – Počáteční konfigurace paralelních systémů.....	23
Obr. 9 – Datový soubor s výstupy	25
Obr. 10 – Počet HB v jednotlivých systémech pro paralelní („p“) i antiparalelní („a“) řetězce	27
Obr. 11 – Počet HB za 1 ns v závislosti na koncentraci iontů, hodnoty normovány pro řetězce s dvaceti sacharidy	28
Obr. 12 – Řetězce, interagující do kříže a do tvaru písmene T.....	29
Obr. 13 – Řetězce v 0M dioxanu, zde „paralelní“	30
Obr. 14 – Označení jednotlivých atomů	30
Obr. 15 – Nejčastější typy HB: O6-NAG (vlevo) a O3-GCU (vpravo) na karboxylovou skupinu (GCU).....	31
Obr. 16 – Detail vazby O6-O6 na dvou různých místech (a_w_d_02M).....	31
Obr. 17 – Výskyt HB na různých místech řetězce u systémů s terc-butanolem a dioxanem	32
Obr. 18 – Podíl počtu atomů rozpouštědla a celkové počtu těchto atomů v různých vzdálenostech od řetězců HA	33
Obr. 19 – Distribuce molekul rozpouštědla v okolí řetězců	34
Obr. 20 – Distribuce terc-butanolu v okolí interagujících (nr) a vzdálených (r) řetězců	35

Obr. 21 – Molekuly terc-butanolu (červeně) v různých vzdálenostech od interagujících řetězců (p_w_t_02M), HB znázorněny zelenou přerušovanou čarou.....	35
Obr. 22 – Časový vývoj počtu HB (zelená) a iontů do vzdálenosti 4 Å (žlutá) a 10 Å (oranžová) pro systém a_w_02M	36
Obr. 23 – Řetězec v 0M dioxanu, původně paralelní, s HB (zeleně)	38
Obr. 24 – Antiparalelní dvoušroubovice s ionty (sodnými žlutě, chloridovými zelenomodře) do vzdálenosti 4 Å	39
Obr. 25 – Karboxylové skupiny (oranžově), orientované ke středu šroubovice, u systému a_w_d_02M s detailním pohledem ze strany	39
Obr. 26 – Iontové mosty (červeně) při tvorbě šroubovice v a_w_d_02M, kdy menšími kuličkami jsou znázorněny ostatní ionty	40
Obr. 27 – Detail šroubované části u systému a_w_d_02M se znázorněním molekul vody a dioxanu (žlutě) do vzdálenosti 4 Å od řetězců (vlevo pohled z boku, vpravo pohled ve směru osy šroubovice)	41
Obr. 28 – Blízké okolí šroubovice: molekuly vody (vlevo) a molekuly dioxanu (uprostřed) do vzdálenosti 4 Å od řetězců HA a ionty do vzdálenosti 6 Å od HA řetězců (vpravo).....	41
Obr. 29 – Dioxanová paralelní jednošroubovice s ionty a rozpouštědlem ve vzdálenosti do 3 Å od řetězců s detailním bočním pohledem do vnitřního prostoru šroubovice s ionty (vlevo) a bez nich (vpravo)	42
Obr. 30 – Paralelní dvoušroubovice s molekulami rozpouštědla do vzdálenosti 3 Å	42
Obr. 31 – Detail nepravidelného místa šroubovice s HB (zeleně) a molekulami iontů a rozpouštědla ve vzdálenosti do 3 Å od řetězců.....	43
Obr. 32 – Detail okrajové části paralelní dvoušroubovice, kde je mezi řetězci dost prostoru na to, aby se zde mohly vyskytovat ionty (zobrazeny jsou jen ty ve vzdálenosti do 4 Å). .	44

SEZNAM TABULEK

Tab. 1 – Přehled simulovaných systémů a zavedení jejich značení	21
Tab. 2 – Počet atomů a molekul v jednotlivých systémech (přepočet počtu atomů na počet molekul byl prováděn dělením – v případě vody třemi, u dioxanu čtrnácti a u terc-butanolu patnácti)	22
Tab. 3 – Doba simulací jednotlivých systémů [ns].....	24
Tab. 4 – Počet přibližování u jednotlivých systémů	28
Tab. 5 – Počet přetáčení u jednotlivých systémů.....	29
Tab. 6 – Průměrný počet iontů do vzdálenosti 4 a 10 Å od řetězců, poslední cifra každé hodnoty je zasažena chybou	36
Tab. 7 – Průměrný počet iontů v prostoru mezi 4 a 10 Å od řetězců, poslední cifra každé hodnoty je zasažena chybou	37

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha P I: Vstupní konfigurační soubor

Příloha P II: Ukázky TCL skriptů

Příloha P III: Časový vývoj počtu HB u všech systémů

Příloha P IV: Detail tvorby šroubovice