

Studium interakcí iontů s hyaluronanem metodou molekulové dynamiky

Václav Buš

Bakalářská práce
2016



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav fyziky a mater. inženýrství

akademický rok: 2015/2016

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Václav Buš**
Osobní číslo: **T13673**
Studijní program: **B2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Materiálové inženýrství**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Studium interakcí iontů s hyaluronanem metodou molekulové dynamiky (virtuální experiment)**

Zásady pro vypracování:

1. **Prostudujte dostupnou literaturu a informační zdroje vztahující se k zadanému tématu.**
2. **Vypracujte literární rešerši na zadané téma.**
3. **Popište interakce hyaluronanu s různými ionty na základě simulací v programu NAMD.**



Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

1. Jungwirth P., Molekuly a ionty v pohybu: Počítačové simulace biochemických a biofyzikálních procesů. Chem. Listy 108, 278-284 (2014).
2. Ivanov D., Neamtu A., Molecular dynamics evaluation of hyaluronan interactions with dimethylsilanediol in aqueous solution. Rev. Roum. Chim. 58(2-3), 229-238 (2013).
3. Almond A., DeAngelis P. L., Blundell Ch. D., Hyaluronan: The Local Solution Conformation Determined by NMR and Computer Modeling is Close a Contracted Left-handed 4-Fold Helix. J. Mol. Biol. 358, 1256-1269 (2006).
4. Zhang Y., Cremer P. S., Interactions between macromolecules and ions: The Hofmeister series. Current Opinion in Chemical Biology 10, 658-663.

Vedoucí bakalářské práce:

RNDr. Eva Kutálková, Ph.D.

Ústav fyziky a mater. inženýrství

Datum zadání bakalářské práce:

15. ledna 2016

Termín odevzdání bakalářské práce:

20. května 2016

Ve Zlíně dne 22. února 2016



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
děkan



doc. Mgr. Aleš Mráček, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: Buš Václav

Obor: Materiálové inženýrství

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou 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 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou 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);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně16.5.2016.....

.....Václav Buš.....

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlášení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ 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, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

³⁾ 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, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Bakalářská práce fenomenologicky popisuje interakce hyaluronanu s různými ionty na základě simulací metodou molekulové dynamiky v programu NAMD. Výsledky simulací práce dává do souvislosti s dříve publikovanými teoriemi a hypotézami, jakou jsou Hofmeisterova řada iontů nebo párování iontů s podobnou afinitou k vodě.

Klíčová slova: molekulová dynamika, hyaluronan, vodíkový můstek, Hofmeisterova řada

ABSTRACT

The thesis phenomenologically describes the interaction of hyaluronan with various ions based on simulations using the method of molecular dynamics in NAMD program. The results of simulation the thesis puts into context with the previously published theories and hypotheses, such as the Hofmeister series of ions and the ions pairing with similar affinity to water.

Keywords: molecular dynamics, hyaluronan, hydrogen bond, Hofmeister series

Rád bych poděkoval vedoucí mé bakalářské práce RNDr. Evě Kutálkové, Ph.D. za cenné rady, poskytnuté podklady a čas, který mé práci věnovala. Dále bych chtěl poděkovat Národní Gridové Infrastruktuře Metacentrum, že mi dovolila přístup k výpočetním a úložným zařízením v rámci programu Velkých Infrastruktur LM2015042 E-infrastruktura CESNET a LM2015085 CERIT Scientific Cloud.

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

OBSAH

ÚVOD	9
I TEORETICKÁ ČÁST	10
1 KYSELINA HYALURONOVÁ.....	11
1.1 HISTORIE A VÝZKUM	11
1.2 VLASTNOSTI A STRUKTURA KYSELINY HYALURONOVÉ	11
2 HOFMEISTROVA ŘADA.....	14
2.1 HOFMEISTROVA ŘADA IONTŮ VZHLEDEM K PROTEINŮM.....	14
2.2 HOFMEISTROVA ŘADA IONTŮ VZHLEDEM K VODĚ	15
2.3 VLIV SOLÍ NA STABILITU MAKROMOLEKULY	15
3 MOLEKULOVÁ DYNAMIKA	17
3.1 MOLEKULOVÁ DYNAMIKA	17
3.2 PŘEDCHOZÍ PODOBNÉ STUDIE	20
3.2.1 Kyselina hyaluronová.....	20
3.2.2 Interakce látek jiných než kyselina hyaluronová s ionty.....	24
II PRAKTICKÁ ČÁST	26
4 PŘÍPRAVA SYSTÉMU	27
5 ZPRACOVÁNÍ DAT A MĚŘENÍ.....	29
6 VÝSLEDKY A DISKUZE	32
6.1 IONTY V BLÍZKOSTI KYSELINY HYALURONOVÉ	32
6.1.1 Celkové počty iontů.....	32
6.1.2 Procentuální zastoupení iontů na jednotlivých skupinách	38
Systém Na ⁺ s HA.....	38
Systém K ⁺ s HA.....	38
Systém Cs ⁺ s HA	39
Systém Ca ²⁺ s HA	40
Systém Zn ²⁺ s HA.....	40
Systém Mg ²⁺ s HA	41
6.2 VODÍKOVÉ MŮSTKY	42
6.3 DÉLKY ŠESTICE MONOSACHARIDOVÝCH JEDNOTEK HA	43
ZÁVĚR.....	46
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	48
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	50
SEZNAM OBRÁZKŮ.....	51
SEZNAM TABULEK.....	53
SEZNAM PŘÍLOH	54

ÚVOD

Kyselina hyaluronová je přírodní nevětvený polysacharid o velké molekulové hmotnosti, která má vysoký potenciál pro budoucnost vědy. Uplatňuje se ve vědě již od 30. letech 20. století a v její využití je stále ještě na začátku, jelikož stále ještě není plně probádanou látkou. A zatímco na začátku měla kyselina hyaluronová pouze sloužit jako náhrada vaječného bílku v pekařských produktech, dnes díky vědě a rozvíjejícím se technologiím víme, jak jí připravovat či modifikovat, aby se dala použít v nejrůznějších oblastech lidského života, např. ve tkáňovém inženýrství, výzkumu v oblasti hojení ran a popálenin, v kosmetice. Velké naděje jsou vkládány do výzkumu protirakovinné léčby pomocí kyseliny hyaluronové.

Díky rozvoji počítačových technologií je možné studovat hyaluronan za experimentálně nesených dostupných podmínek, jakými jsou např. extrémní teplota a tlak, a dozvědět se více o interakci hyaluronanu s jinými látkami, následné struktury a vlastnostech makromolekuly. Ke studiu hyaluronanu lze využít metodu molekulové dynamiky, která simuluje časový vývoj fyzikálně-chemických vlastností daného systému s velkým počtem stupňů volnosti na základě numerického řešení pohybových rovnic jednotlivých atomů. Metody molekulové dynamiky jsou oproti reálným experimentům méně finančně náročné, mohou proto být zajímavým doplňkem experimentů.

Bakalářské práce fenomenologicky popisuje interakce hyaluronanu s různými ionty na základě simulací pomocí molekulové dynamiky v softwaru NAMD. Získané výsledky jsou komentovány s ohledem na Hofmeisterovu řadu, která se zabývá vlivem solí na makromolekuly. Dále je sledována souvislost s „pravidlem odpovídajících si vodních afinit“, které říká, že by měly více interagovat stejně velké skupiny se stejně velkými ionty, než dvojice výrazně odlišné velikosti. Software NAMD je pro studenty a akademické pracovníky volně dostupný.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 KYSELINA HYALURONOVÁ

Kyselina hyaluronová je přírodní polymer o velké molekulové hmotnosti (až v řádech MDa). Nachází se především v mezibuněčných prostorech, povětšinou jako sodná nebo jiná sůl. Pro deriváty kyseliny hyaluronové se prosazuje označení hyaluronan či hyaluronát (dále pouze HA). [1] [2]

1.1 Historie a výzkum

HA poprvé izolovali v roce 1934 Karl Meyer a John Palmer ze sklivce skotu. V roce 1942 si nechal maďarský vědec Endre A. Balazs patentovat využití HA jako náhradu vaječného bílku v pekařských produktech. [2] Endre A. Balazs jako první charakterizoval její strukturu a odhalil velký potenciál HA a to jako látku na hojení ran. Podílel se na mnoho výzkumech ohledně HA, například v oblasti oftalmologie, kde zjistil, že HA se dá využít při transplantaci rohovky. [3]

V minulosti se HA extrahovala z kohoutích hřebínků, hovězího dobytka a očí tučňáků. V současné době se zamezilo nehumánním prostředkům a HA se získává z buněčných stěn streptokoků nebo z *Escherichia coli*. Už v 60. letech lékaři HA využili k léčbě popálenin. [4]

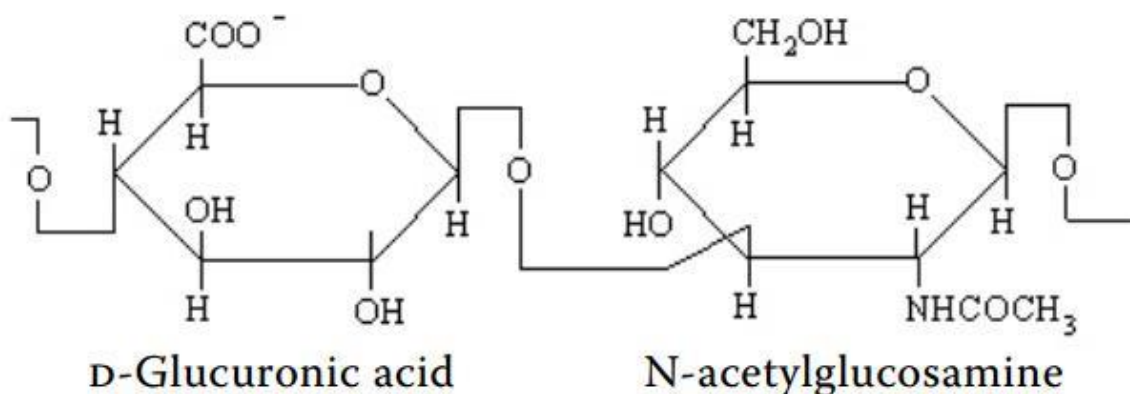
HA se vyznačuje vysokou biokompatibilitou a všudypřítomností v extracelulární matrix. Nachází tudíž velké uplatnění v oborech tkáňové inženýrství a regenerativní medicíně. Výzkum se posunul velmi dopředu díky zesílení HA na hydrogel, který umožňuje vytvoření požadovaného tvaru a lepší vstup terapeutických molekul do hostitele. Vzhledem ke své schopnosti regulovat angiogenezi může být HA použita jako hydrogel pro zkoumání cévní morfogeneze nebo pro vytváření nových cév v těle hostitele. [5]

1.2 Vlastnosti a struktura kyseliny hyaluronové

HA je syntetizována třídou integrálních membránových proteinů nazývaných hyaluronan synthasy, z nichž obratlovci mají tři typy: HAS1, HAS2, HAS3. Tyto enzymy prodlužují HA přidáním kyseliny glukuronové a N-acetylglukosaminu ke vznikajícímu polysacharidu. Poté je polysacharid vytlačován pomocí ABC-transportéru přes buněčnou membránu do extracelulární matrix. HA je degradována enzymy nazývanými hyaluronidázy. Produkty degradace HA jsou oligosacharidy a HA s velmi nízkou molekulovou hmotností, které mají pro-angiogenní vlastnosti (podporují růst cév). [6]

HA je důležitou složkou kloubní chrupavky, kde je přítomna jako nátěr chondrocytů. Zlepšuje metabolismus chondrocytů a inhibuje degradaci kloubní chrupavky. Je také hlavní složkou kůže, kde se podílí na opravě tkání (například při poškození pokožky kvůli nadměrnému vystavení kůže UV záření). Díky své vlastnosti vázat na sebe velké množství vody (až tisícinásobek své hmotnosti) se HA podílí na hydrataci tkání a udržuje vlhkost v mezitkáňových prostorech a zabraňuje tření. [5]

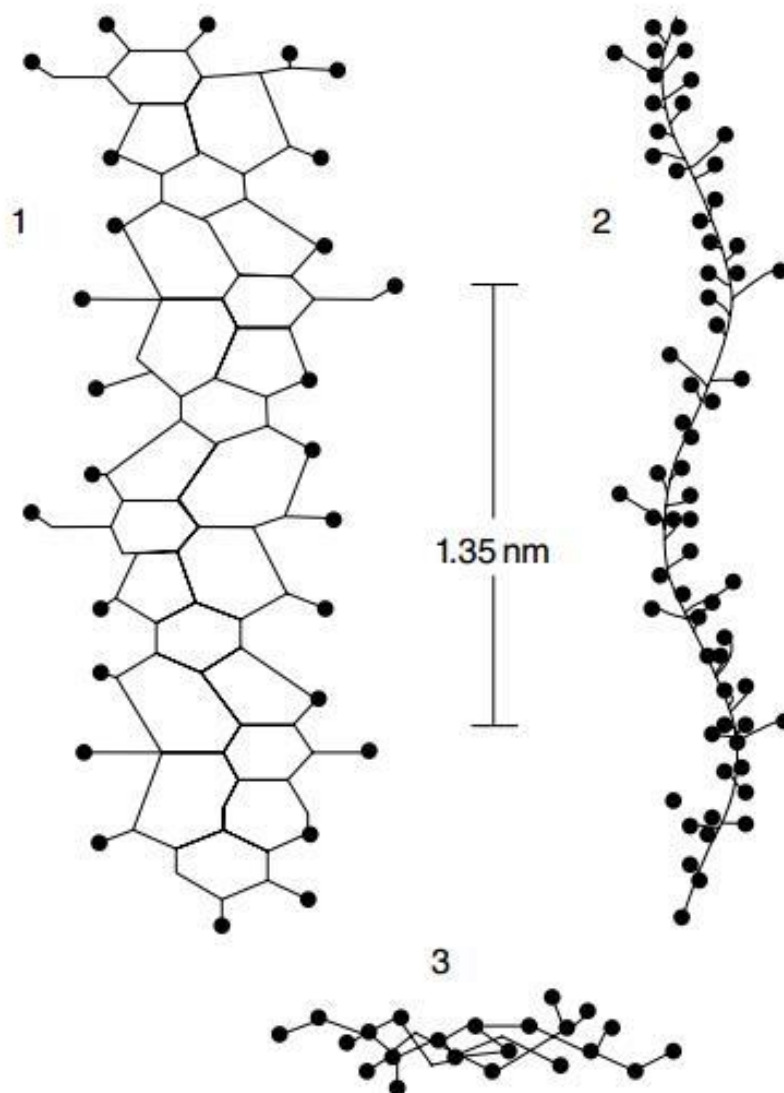
Z chemického hlediska se jedná o nevětvený polysacharid skládající se ze dvou monosacharidových jednotek a to z D-glukuronové kyseliny a N-acetylglukosaminu vázaných alternujícím spojením β 1 -> 3 a β 1 -> 4 – viz Obr. 1. [3]



Obr. 1 – Struktura HA [6]

V roztoku HA je polymerní řetězec ve formě rozvolněného náhodného klubka. Objemné skupiny na každé molekule cukru jsou ve stericky výhodných pozicích (tvoří hydrofilní část), kdežto vodík převezme méně příznivé axiální polohy (tvoří hydrofobní část). Při velmi nízkých koncentracích se tyto řetězce zamotávají mezi sebou a mají velkou smykovou viskozitu, kdežto při větších koncentracích má roztok nízkou smykovou viskozitu. Jednoprocentní roztok bývá ve formě želé. Při podtlaku se pohybuje snáz, může být podáván pomocí injekční jehly. [6]

Sekundární struktura HA ve vakuu je dvojitá šroubovice stabilizovaná vodíkovými můstky mezi sousedními cukernatými zbytky. Podle některých publikací je sekundární struktura HA podobná rovinnému pásu převedenému do šroubovice nebo složenému do listu. [7, 8] Experimentální studie na základě analýzy změn chemických posunů (NMR) a pomalé oxidace jodistanu ukazují, že tuhost (charakteristická pro HA) závisí především na intermolekulárních vodíkových vazbách. NMR studie HA potvrdila, že vodíkové vazby jsou zodpovědné za atypickou sekundární strukturu – viz Obr. 2. Dodatečné hydrodynamické studie, zejména měření viskozity prováděné na zředěných roztocích, ukazují, že ve vodních roztocích makromolekula přijímá strukturu statistického polotuhého klubka, které se skládá ze šroubovic. Jelikož HA na sebe váže velké množství vody, vytváří poměrně velké domény terciární struktury, na kterých jsou makromolekuly s vodou propojeny pomocí vodíkových můstků. [9, 10]



Obr. 2 – Sekundární struktura HA (1. Struktura skládaný list; 2. Rovinný pás převedený do šroubovice; 3. Dvoušroubovice) [10]

HA patří do skupiny polyelektrolytů. Polyelektrolyt je vysokomolekulární látka, která obsahuje postranní skupiny schopné elektrolytické disociace. Disociací vzniká makroion s velkým počtem elementárních nábojů a příslušný počet malých iontů opačného náboje (protiiontů). HA v roztoku tedy nese elektrický náboj, který vznikl disociací. [11]

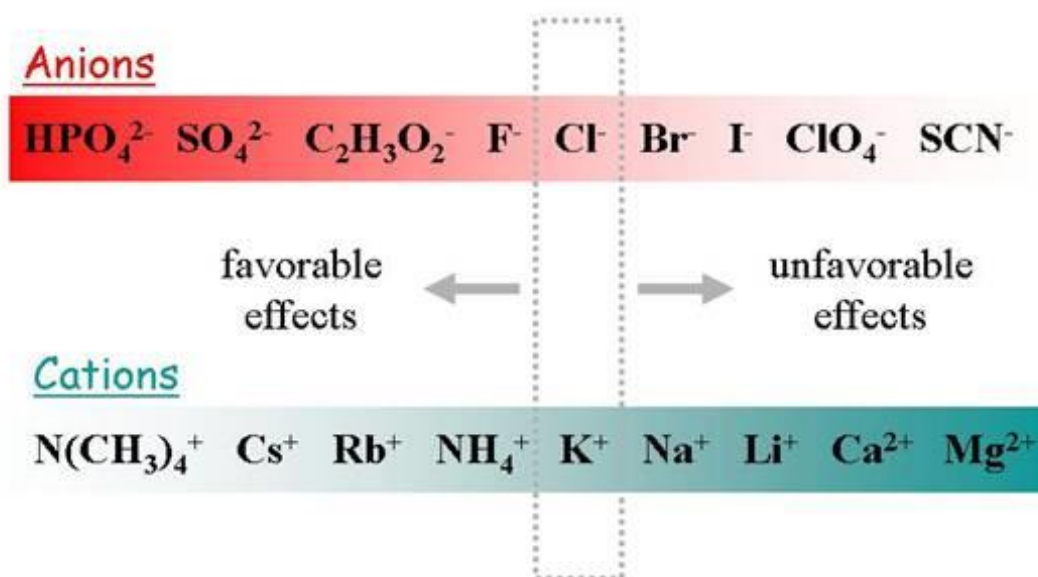
2 HOFMEISTROVA ŘADA

Němec Franz Hofmeister se jako první začal systematicky zabývat vlivem solí na bílkoviny. Jednalo se o celkem jednoduchý experiment, kdy do vaječného bílku přidával definované množství dané soli až do zakalení, což signalizovalo vysrážení bílkoviny. Na základě těchto pokusů zjistil, že například síranové soli dobře vysolují a dusičnany jsou naopak velmi neefektivní ve vysolování. NaCl se nachází uprostřed těchto dvou skupin.

Podle všeho neexistuje Hofmeisterova řada, která by univerzálně platila pro všechny makromolekuly. Pomocí Hofmeisterovy řady nelze přesně určit specifického chování iontů a předpovídat jejich specifické iontové efekty. Neuniverzálnost je nejlépe vidět ve zvláštních případech, kdy se makromolekula ne zcela řídí podle Hofmeisterovy řady, dokonce může dojít k efektu, že se ionty solí řadí obráceně. V těchto případech se pak hovoří o nemonotónní nebo inverzní Hofmeisterově řadě. [12]

2.1 Hofmeisterova řada iontů vzhledem k proteinům

Na Obr. 3 je znázorněno pořadí aniontů a kationtů podle účinku vysolování k proteinům.



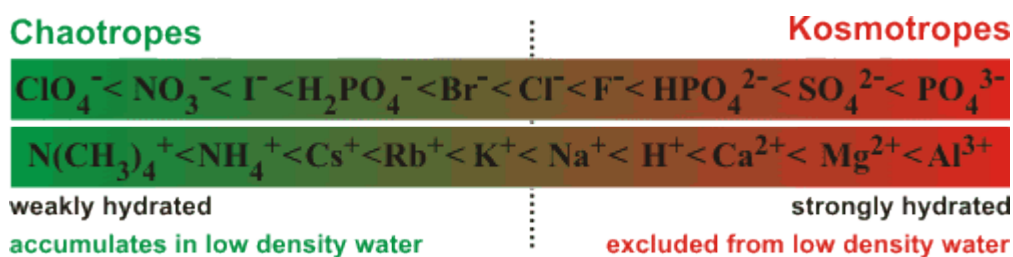
Obr. 3 – Hofmeisterova řada iontů vzhledem k proteinům [27]

Experimenty prokázaly, že vliv iontů solí se řídí Hofmeisterovou řadou pro velké spektrum procesů, jako je například denaturace, aktivita enzymů, krystalizace, iontová výměna, povrchové napětí roztoků. [12]

Členy vlevo na Obr. 3 zvyšují povrchové napětí rozpouštědla a snižují rozpustnost nepolárních molekul („vysolování“); posilují tedy hydrofobní interakce. Naproti tomu členy vpravo zvyšují rozpustnost nepolárních molekul („solení“) a snižují povrchové napětí vody; oslabují tedy hydrofobní účinek. [13]

2.2 Hofmeisterova řada iontů vzhledem k vodě

Pořadí aniontů a kationtů podle účinku vysolování se určuje také vzhledem k vodě a rozděluje anionty a kationty na chaotropní a kosmotropní – viz Obr. 4. Velké jedenkrát nabité ionty s nízkou hustotou náboje (například SCN^- , H_2PO_4^- , HSO_4^- , HCO_3^- , I^- , Cl^- , NO_3^- , NH_4^+ , Cs^+ , K^+), které vykazují slabší interakce s vodou než voda se sebou a tím jen málo ovlivňují vodíkové vazby v okolní vodě, se nazývají chaotropní. Zatímco malé nebo vícekrát nabité ionty s vysokou hustotou náboje se nazývají kosmotropní (např. SO_4^{2-} , HPO_4^{2-} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Li^+ , H^+ , OH^- , Na^+), protože vykazují silnější interakce s vodou a tím umožňují porušení vodíkových vazeb ve vodě. Kosmotropní ionty orientují molekuly vody ve svém okolí (mají ve své blízkosti tzv. koordinační sféru vody, ve které se molekuly obměňují jen velmi málo). [13]



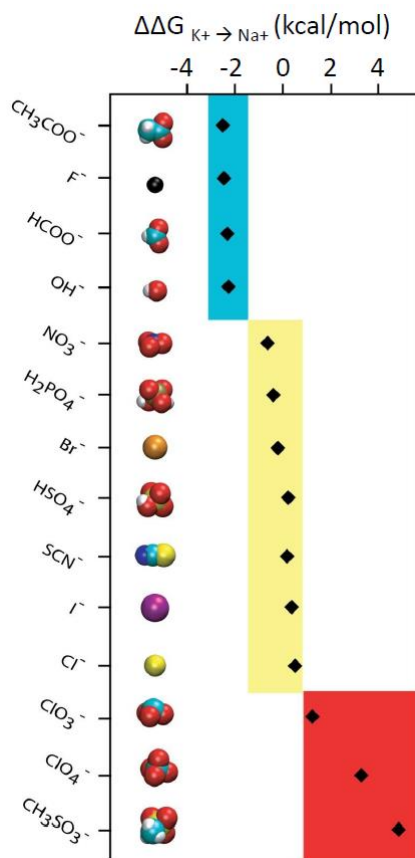
Obr. 4 – Hofmeisterova řada iontů vzhledem k vodě [13]

2.3 Vliv solí na stabilitu makromolekuly

Zatím neexistuje molekulový model, který by plně vysvětlil Hofmeisterovu řadu, ale předpokládá se, že Hofmeisterova řada úzce souvisí s rozpouštěním iontů ve vodě a s jejich přímou interakcí s makromolekulami a s iontovým párováním v roztoku. [12]

HA je v čistém stavu velmi nestabilní, a proto je nutná stabilizace HA pomocí iontů. Ionty obecně stabilizují především sekundární a terciární strukturu. [14]

Hofmeisterova řada byla použita k vysvětlení celé řady efektů (vysolování, vsolování, denaturace bílkovin, enzymatická aktivita). Dnes je zřejmé, že Hofmeisterova řada úzce souvisí s hydratací iontů v homogenním a nehomogenním prostředí a s iontovým párováním. P. Jungwirth pomocí MD ověřil „pravidlo odpovídajících si vodních afinit“, které říká, že daný ion nebo nabitá skupina se bude dobře párovat s protiontem se srovnatelnou hydratační volnou energií (tedy energií, která se uvolní, když přechází ion do roztoku a je obklopen hydratačním obalem) – viz Obr. 5. Zjednodušeně řečeno by měly spolu interagovat stejně velké skupiny se stejně velkými ionty. Iontové párování výrazně nesterjné velkých iontů vykazuje energetickou nevýhodnost překryvu hydratačních obalů. [15]



Obr. 5 – Změny volné energie související s nahrazením draslíku sodíkem v kontaktním iontovém páru s Hofmeisterovou řadou aniontů. Horní čtyři anionty preferují sodík, dolní tři anionty preferují draslík, uprostřed jsou anionty bez výraznější preference [15]

3 MOLEKULOVÁ DYNAMIKA

3.1 Molekulová dynamika

Molekulová dynamika (dále pouze MD) studuje vlastnosti souborů molekul na základě znalosti vzájemných interakčních potenciálů jednotlivých atomů a simuluje časový vývoj fyzikálně-chemických vlastností těchto systémů.

Výpočty jsou založeny na simulacích velkého počtu mikrostavů studovaného souboru a následném výpočtu středních hodnot fyzikálních veličin. Teoretickým základem je ergodická hypotéza, podle níž jsou časové střední hodnoty veličin rovny jejich statistickým středním hodnotám.

U biologických systémů se zpravidla pomocí MD studuje jedna makromolekula nebo nadmolekulární komplex (v našem případě dvojřetízek HA) ve vodném roztoku.

Základem klasické MD je řešení Newtonových pohybových rovnic pro každý jednotlivý atom systému:

$$F_i = m_i \cdot \frac{d^2 r_i}{dt^2}, \quad 1)$$

kde F_i je síla působící na i -tý atom, r_i je poloha i -tého atomu a m_i je hmotnost i -tého atomu.

Jelikož síla F_i souvisí s potenciální energií V podle vztahu

$$F_i = -\frac{dV}{dr_i}, \quad 2)$$

zrychlení i -tého atomu je dáno výrazem

$$\frac{d^2 r_i}{dt^2} = -\frac{1}{m_i} \cdot \frac{dV}{dr_i}, \quad 3)$$

Základem MD je tedy znalost potenciálních energií jednotlivých atomů v systému v závislosti na konfiguraci atomů. Potenciální energie v klasické MD je dána součtem potenciálních energií vazebných a nevazebných interakcí

$$V(R) = E_{bonded} + E_{non-bonded}. \quad 4)$$

Vazebné interakce zahrnují jednak vzájemné působení mezi atomy spojenými chemickou vazbou (harmonická aproximace)

$$E_{bond-stretch} = \sum_{1,2 \text{ pairs}} K_b \cdot (b - b_0)^2, \quad 5)$$

kde K_b je silová konstanta a b je aktuální a b_0 je střední rovnovážná délka vazby mezi atomy.

Další vazebnou interakcí je interakce dané valenčním úhlem mezi 3 atomy (harmonická aproximace)

$$E_{bond-bend} = \sum_{angles} K_\theta \cdot (\theta - \theta_0)^2, \quad 6)$$

kde K_θ je silová konstanta a θ je aktuální a θ_0 je střední rovnovážný valenční úhel mezi třemi atomy.

Předposlední vazebnou interakcí je interakce daná dihedrálním úhlem mezi 4 atomy

$$E_{rotate-along-bond} = \sum_{1,4 \text{ pairs}} K_\varphi \cdot (1 - \cos(n\varphi)), \quad 7)$$

kde K_φ je silová konstanta a φ je dihedrální úhel pro danou čtveřici atomů.

Poslední vazebnou interakcí jsou tzv. „impropers“, které hlídají planaritu planárních struktur

$$E_{imp} = \sum_{angles} K_\psi \cdot (\psi - \psi_0)^2. \quad (8) \quad 8)$$

Z nevazebných interakcí je zahrnut Lennard-Jonesův potenciál

$$E_{VDW} = \sum \left(\frac{A_{ik}}{r_{ik}^{12}} - \frac{C_{ik}}{r_{ik}^6} \right), \quad 9)$$

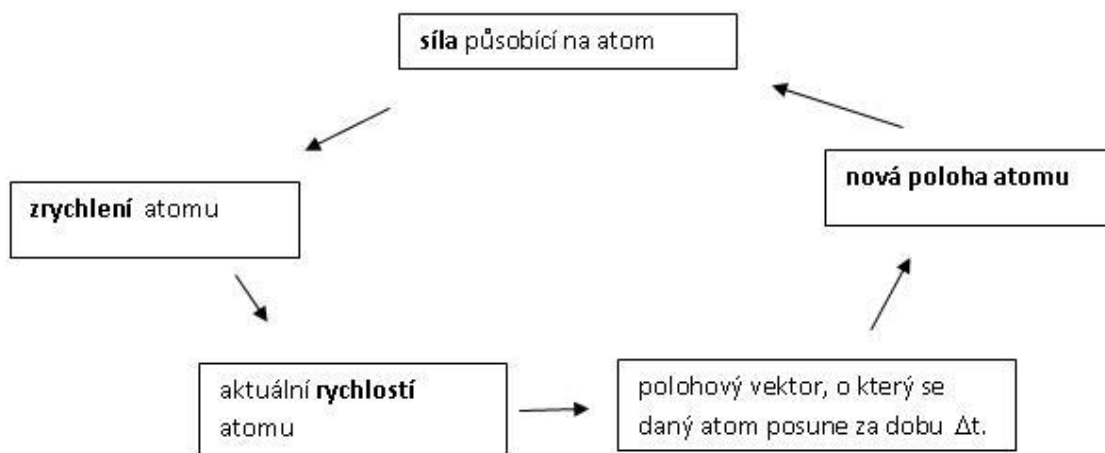
kde A_{ik} a C_{ik} jsou silové konstanty a r_{ik} je vzdálenost mezi dvěma atomy, a coulombický potenciál

$$E_{electrostatic} = \sum \frac{q_i \cdot q_k}{D \cdot r_{ik}}, \quad 10)$$

kde q_i, q_k jsou parciální náboje na atomech a r_{ik} je vzdálenost mezi atomy a D je konstanta v Coulombově zákoně. [16, 17]

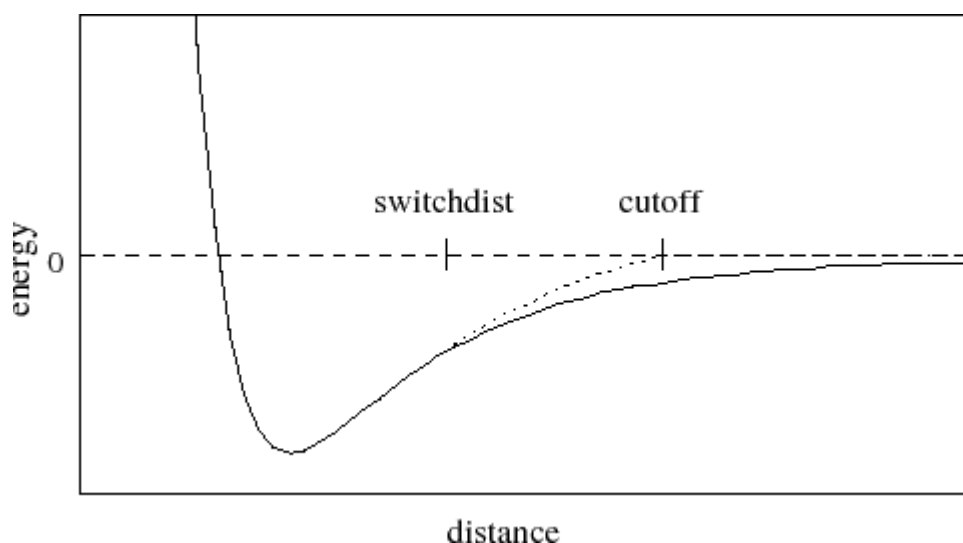
Všechny silové konstanty, střední rovnovážné vzdálenosti atomů a střední rovnovážné valenční úhly mezi atomy jsou uloženy v parametrickém souboru a byly získány buď z experimentů nebo z kvantově-mechanických výpočtů.

Základní princip výpočtů je na Obr. 6.



Obr. 6 – Základní princip výpočtu simulací [16]

Molekulová dynamika pomocí systému NAMD má řadu možností jak kontrolovat způsob, kterým jsou počítány dalekodosahové ne vazebné interakce. Van der Waalsovy interakce jsou v NAMD započítávány jen do určité mezní vzdálenosti – tzv. „cutoff“, přičemž od vzdálenosti „switchdist“ klesá potenciál lineárně k nule – viz Obr. 7. Páry, pro které se budou interakce počítat, se vyhledávají do vzdálenosti označené „pairlistdist“. Časový krok simulace („timestep“) je omezen rychlostí vibrací nejlehčích atomů a bývá zpravidla 1fs výjimečně 2fs. Coulombický potenciál se počítá do mezní vzdálenosti „cutoff“ pro každý n-tý („nonbondedFreq“) časový krok. Mimo tuto vzdálenost se coulombické interakce počítají metodou Particle Mesh Ewald (PME), která kvůli snížení výpočetní náročnosti počítá coulombické interakce jen v určitých místech a na základě toho potenciál v ostatních bodech odhaduje. Každý několikátý krok („fullElectFrequency“) dochází k výpočtu plné elektrostatiky. S hodnotou „excluded scaled 1-4“ jsou všechny 1-3 páry vyloučeny z výpočtu elektrostatiky (tj, pokud A je atom vázaný k atomu B a B je atom vázaný k atomu uhlíku a atom C je navázán na atom D, potom se dvojice AD vyloučí, protože vazebné interakce mezi atomy jsou mnohem silnější než elektrostatika). Tato interakce je nahrazena korekcí „1-4scaling“. [24, 29]



Obr. 7 – Graf VDW potenciálu s a bez aplikace funkce cutoff [29]

Mezi výhody počítačových simulací patří možnost studovat systémy za experimentálně neschopných podmínek (např. extrémní teploty, tlaky). [18] Jednou z praktických aplikací MD v současnosti je racionální návrh léčiv, při nichž se simuluje interakce léčiva s biomolekulami hrajícími roli v patologii dané choroby (např. inhibitor a enzym). [16]

Simulace pomocí MD jsou nejčastěji v řádech desítek nanosekund (viz časový krok 1 fs - 2 fs), tudíž nevýhodou MD je skutečnost, že umožňuje studovat děje maximálně v řádech μ s. Nevýhodou MD je taktéž velká hardwarová a časová náročnost. [19]

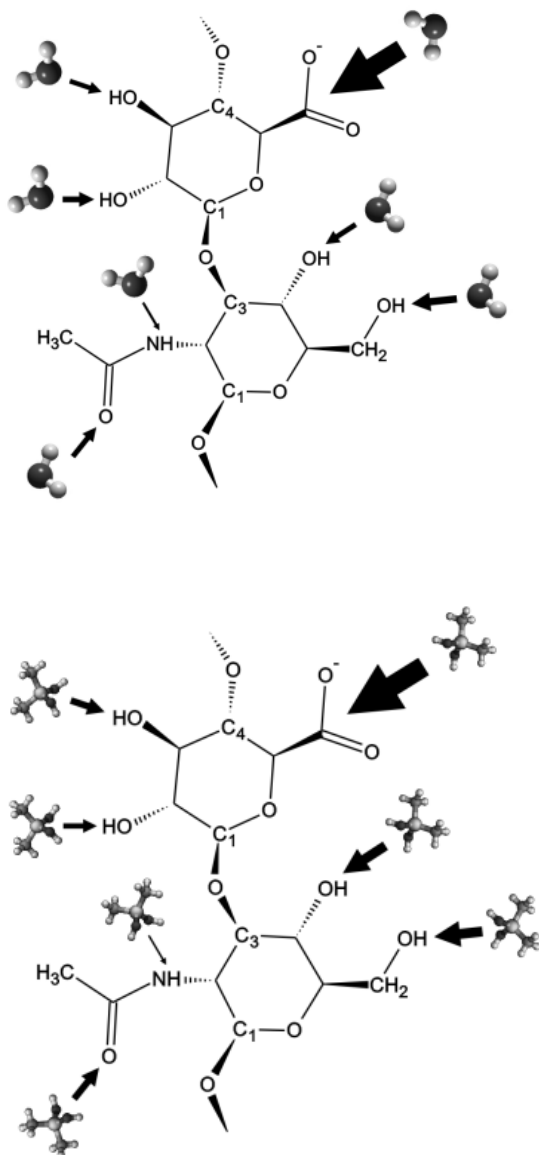
3.2 Předchozí podobné studie

Jen velmi málo studií pomocí MD se týká HA. Žádná předchozí studie neřeší interakce HA s ionty a jen velmi málo MD studií řeší interakce iontů s látkami jinými než HA.

3.2.1 Kyselina hyaluronová

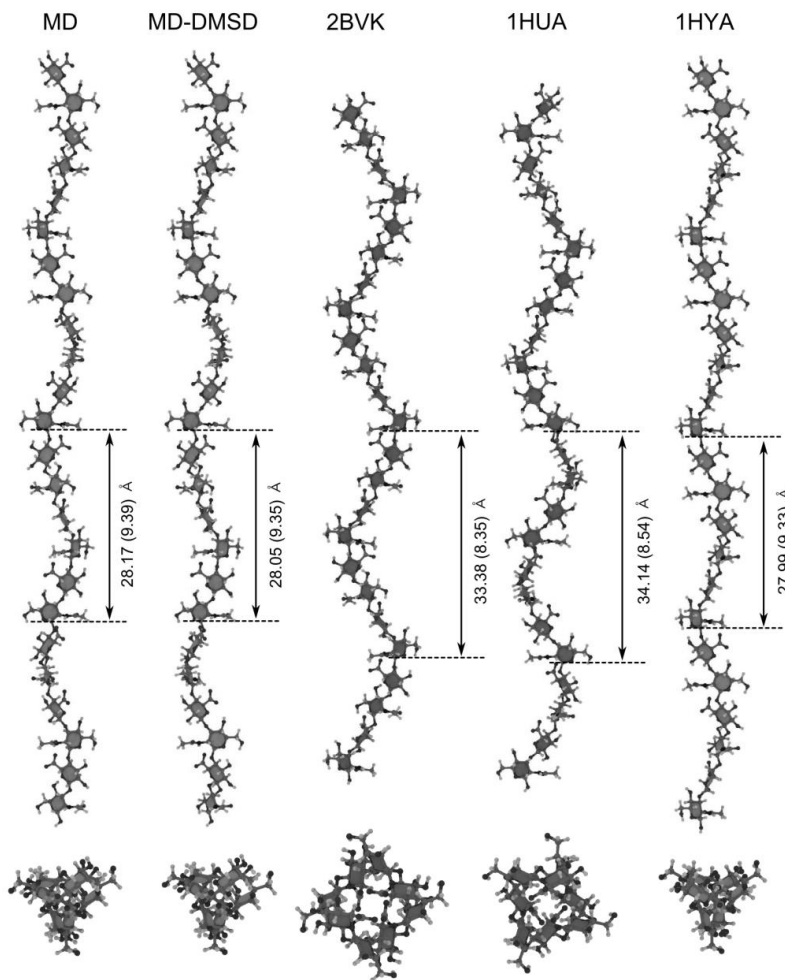
Daniel Ivanov a Andrei Neamtu zkoumali v roce 2013 HA pomocí MD s explicitním modelem vody a s ionty sodíku v koncentraci, jakou má fyziologický roztok. Jejich studie se zaměřovala na porovnání simulací HA ve vodném prostředí a HA ve vodném prostředí se sloučeninou dimethylsilandiol (dále pouze DMSD), struktura HA byla převzata z RCSB Protein Data Bank (RCSB PDB) pod kódem 1HYA (získáno z rentgenové difrakce). [20] Simulace byly prováděny v systému HA/voda obsahující 3 hexasacharidové molekuly HA náhodně vložené uvnitř kubického vodního boxu s 6727 molekulami H_2O a 36 molekulami DMSD za konstantního teploty 300 K a za konstantního tlaku. Hlavní myšlenkou bylo identifikovat vazebná místa, určit četnost jejich obsazení a porovnat afinitu molekul DMSD a vody – viz Obr. 8. Neaktivnějším místem byla $-COO$ skupina na kyselině D-glukoronové. Bylo zjištěno,

že DMSD se váže s mírně vyšší afinitou než voda na exocyklické skupiny HA pomocí vodíkových můstků, což vede ke zmenšení dihedrálních úhlů a tedy ke zkrácení řetězků HA – viz Obr. 9. V závěru autoři konstatují, že sloučenina HA s tak nízkou koncentrací DMSD, s jakou se využívá v farmacii, změní konformaci HA velmi nepatrně. [21]



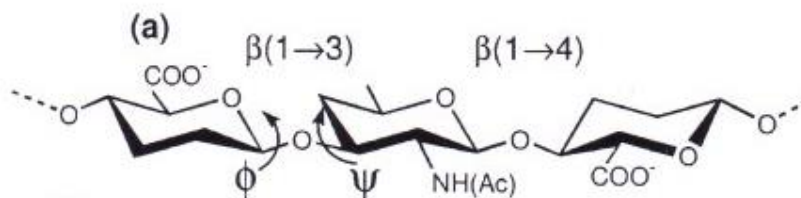
Obr. 8 – Interakce DMSD (horní obrázek) a vody (dolní obrázek) s HA

Tloušťka šipky je úměrná četnosti interakce DMSD a vody s HA [21]

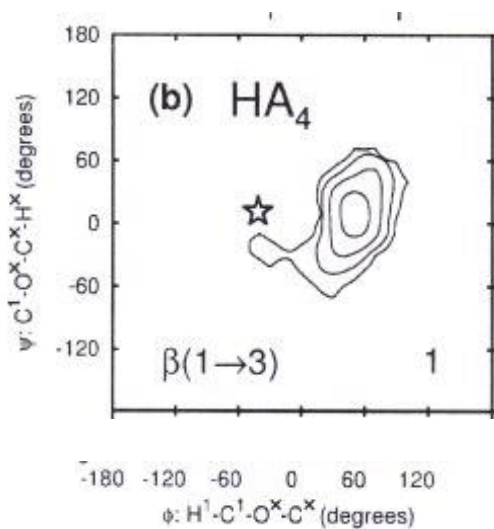


Obr. 9 – Konformace řetězků HA ze simulací a experimentů [21]

Andrew Almond, Paul L. DeAngelis a Charles D. Blundell využili MD simulace ke studiu konformací a zjištění valenčních a dihedrálních úhlů HA oproti experimentálním datům. Simulace byly prováděny na HA₄ (tetrasacharid) a HA₆ s explicitním vodním rozpuštědlem a přidavkem sodných iontů k dosažení neutrality. U systému HA₄ a HA₈ byly studovány jak α tak β anomery – viz Obr. 10.

Obr. 10 – β anomer [1]

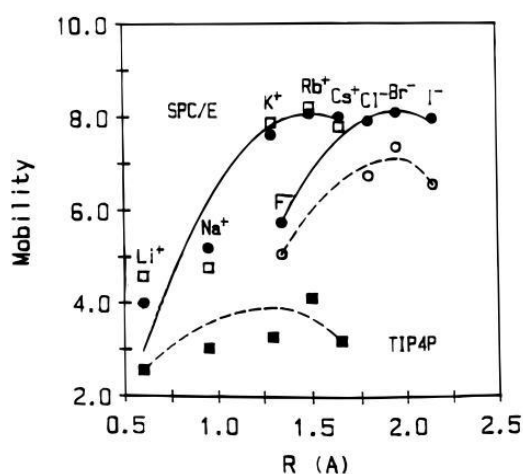
Výsledné hodnoty valenčního ϕ a dihedrálních úhlů ψ z těchto simulací byly pro β -anomer následující: 1- \rightarrow 3 vazba ($\phi=50,7^\circ$, $\psi=9,7^\circ$), 1- \rightarrow 4 vazba ($\phi=47,9^\circ$, $\psi=8,0^\circ$). Tyto hodnoty se výrazně nelišily od hodnot získaných z experimentu, až na anomálii valenčního úhlu u koncových skupin anomeru β 1- \rightarrow 3 ($\phi= -30^\circ$) – viz Obr. 11. Tato anomálie pravděpodobně vzniká na konečných residuích tak, že v místech, kde by se tvořila vodíková vazba na další cukernou jednotku, se vytvoří vodíkový můstek na vodu. [1]



Obr. 11 – Závislost ψ na ϕ u anomeru β
[1]

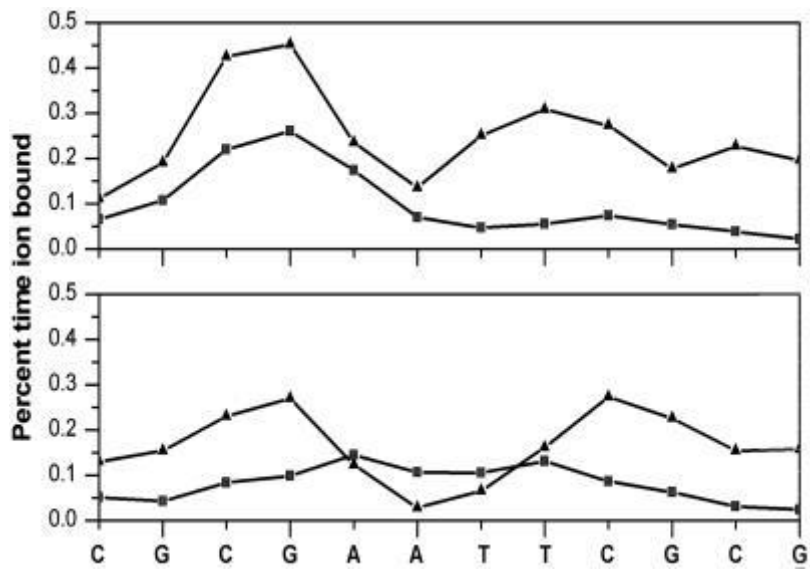
3.2.2 Interakce látek jiných než kyselina hyaluronová s ionty

V roce 1996 Song Hi Lee a Jayendran C. Rasaiah využili simulace MD na zjištění mobility iontů ve vodě, konkrétně iontů alkalických kovů (Li^+ , Na^+ , K^+ , Rb^+ a Cs^+) a halogenidů (F^- , Cl^- , Br^- a I^-). V této studii se simulovalo devět systémů, které zahrnovaly každý z devíti iontů (fluorid, chlorid, bromid, jodid, lithium, sodík, draslík, rubidium, cesium). Každý systém byl solvatován 215 molekulami vody a hustota byla stanovena na $0,997 \text{ g/cm}^3$, což odpovídá krychli o délce $18,64 \text{ \AA}$. Simulace probíhaly za konstantní teploty $298,15 \text{ K}$. Výsledkem simulací byl graf závislosti mobility ($10^{-4} \frac{\text{cm}^2}{\text{V}\cdot\text{s}}$) na krystalových iontových poloměrech (\AA) – viz Obr. 12. [22]



Obr. 12 – Závislost mobility na krystalových iontových poloměrech [22]

Sergei Y. Ponomarev, Kelly M. Thayer a David L. Beveridge využili simulace MD ke studiu DNA s protiionty Na^+ za účelem zjištění relaxačních časů interakcí DNA a iontů Na^+ . Systém pro simulace byl složený z DNA a 3949 molekul vody spolu s 22 Na^+ kationty v krychlovém vodním boxu. Simulace na dvojřetízku $(\text{CGCGAATTCGCG})_2$ se prováděla až do dosažení konvergence. Vysoký korelační koeficient 0,94 byl dosažen až za 60 ns (korelace byla počítána mezi obsazením iontů dvou řetízků DNA jako funkce času). Byly vypočteny relaxační časy interakcí pro všechny vnitřní strukturální proměnné DNA. Výsledky ukázaly, že relaxační časy vnitřních strukturálních parametrů DNA jsou mnohem kratší než u iontových pohybů. Bylo zjištěno, že maximální frakční obsazení iontů v DNA bylo 15% - 30%. Výsledkem této studie bylo též zjištění nejčastějších míst uchycení – viz Obr. 13. [23]

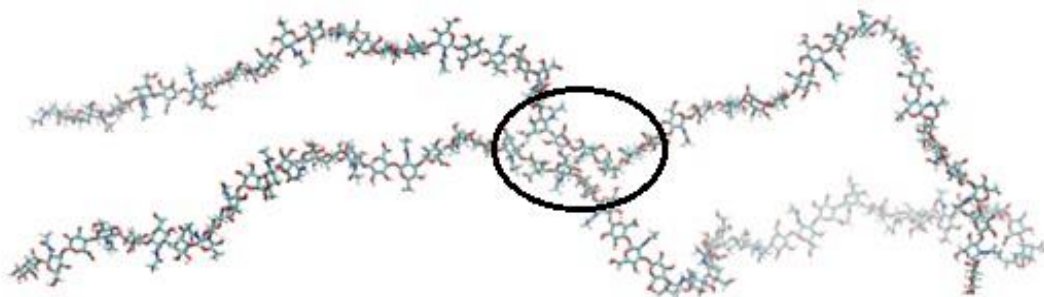


Obr. 13 – Závislost průměrné doby interakce sodných iontů s jednotlivými bázemi DNA (trojúhelníčky pro jeden řetízek DNA, čtverečky pro druhý řetízek). Horní obrázek pro 14 ns a spodní pro 60 ns simulace (z obrázku je patrné, že interakce iontů s DNA se ustálila až po delší době) [23]

II. PRAKTICKÁ ČÁST

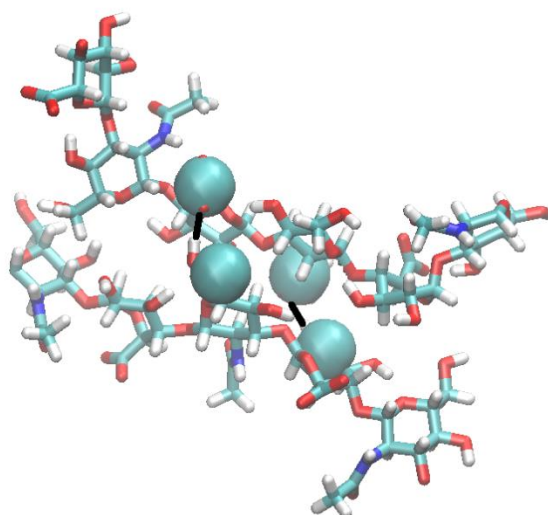
4 PŘÍPRAVA SYSTÉMU

Studovaným systémem byly dva antiparalerní řetízky HA, z nichž každý obsahoval 24 dvojic monosacharidových jednotek – viz Obr. 14. Tento systém byl solvatován vodním boxem o velikosti 161,8 x 110,9 x 187,2 Å s explicitním modelem molekul vody TIP3P. Konkrétní počty molekul vody byly v systémech s jednomocnými kationty 310689; u dvoumocných 304722. Následně byl systém neutralizován a nasolen 6 různými chloridy (NaCl, KCl, CsCl, MgCl₂, CaCl₂, ZnCl₂) na výslednou koncentraci 1 mol·l⁻¹. Konkrétní počty iontů u jednomocných solí byly 2061 kationtů a 2013 aniontů; u dvoumocných solí 2037 kationtů a 4026 aniontů.



Obr. 14 – Dvojřetítek HA

Simulovány byly dva různé systémy. V prvním byly oba řetízky ve vodě zcela volné, u druhého systému byla hned na začátku provedena fixace 2 atomů uprostřed každého z řetízků v místech, kde se spontánně vytvořily vodíkové můstky – viz Obr. 15. Fixované systémy měly sloužit jako pojistka, kdyby u nefixovaných systémů docházelo k vyplavávání řetízků z vodního boxu. Výpočty u systému, kde vyleze část řetízku HA z vodního boxu, jsou velmi složité, protože je potřeba přepočítávat polohy obrovského počtu molekul vody přes periodické okrajové podmínky. Dalším důvodem fixace byla snaha zjistit, zda budou spolu řetízky interagovat. Bylo sledováno taktéž, zdali dojde k zaplétání konců řetězců, které by mohly vytvořit strukturu dvoušroubovice.



Obr. 15 – (detail Obr. 14) Propojení dvojřetízku HA pomocí vodíkových vazeb (černé úsečky); 4 fixované atomy uhlíku jsou znázorněny pomocí VDW poloměrů

Všechny simulace byly prováděny použitím programového balíčku NAMD verze 2.10 [24] s CHARMM topologiemi a parametry silových polí. [25] Pomocí „automatic PSF builder“ v programu NAMD byl vytvořen tzv. PSF soubor pomocí topologického souboru, který určuje párové interakce jednotlivých atomů s dalšími možnými atomy. Timestep byl nastaven na 1 fs, cutoff 10 Å a switching 8 Å. Elektrostatické působení bylo počítáno pomocí PME, které je součástí programového balíčku NAMD. Nevazebné interakce byly počítány v každém druhém kroku („nonbondedFreq“) a plná elektrostatika v každém šestém kroku („fullElectFrequency“). Energie systému byla minimalizovaná po dobu 180 fs, následně simulace byly prováděny při konstantní teplotě 310 K a za atmosferického tlaku s periodickými okrajovými podmínkami. Teplota byla regulována pomocí Langevinovy dynamiky. Souřadnice všech atomů pro následné zobrazení a zpracování dat ve VMD byly ukládány každých 1800 fs. Délka simulací se pohybovala mezi 16 až 28 ns. Všechny parametry byly nastaveny pomocí konfiguračního souboru – viz Příloha P III.

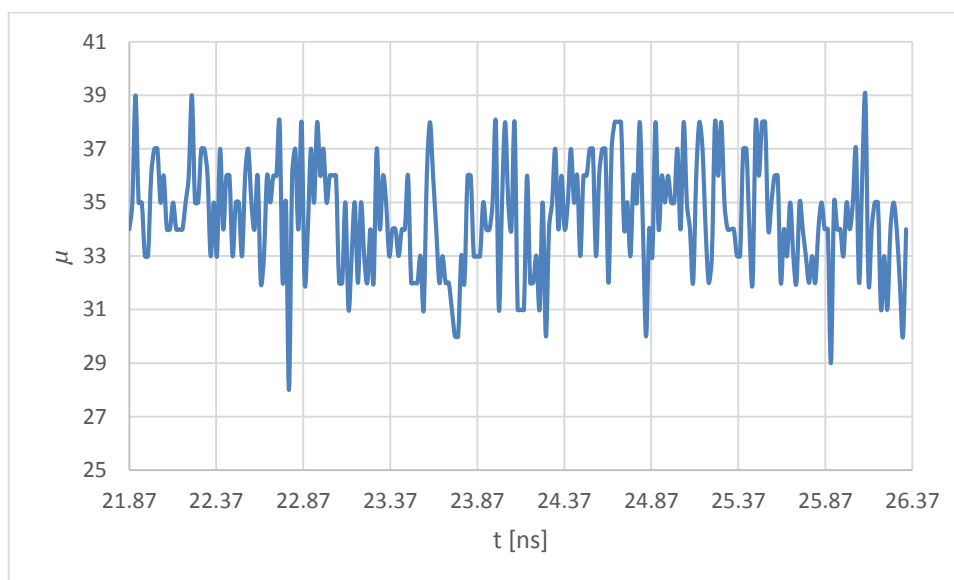
Meziatomové vzdálenosti a další geometrické vlastnosti byly vyhodnoceny za použití programu VMD 1.9.2. [26]

Protože výpočty MD jsou velmi časově a hardwarově náročné, bylo využito služeb Národní Gridové Infrastruktury MetaCentra vlastníciho mnoho superpočítačů, které lze využít k paralelním výpočtům na mnoha procesorech. [19]

5 ZPRACOVÁNÍ DAT A MĚŘENÍ

Vliv iontů na tvar HA byl zkoumán prostřednictvím tří základních charakteristik: středních počtů iontů v těsné blízkosti HA, středních počtů vodíkových můstků (v rámci molekuly HA a z molekuly HA na vodu) a délek šestice monosacharidových jednotek, které byly následně porovnány s literaturou.

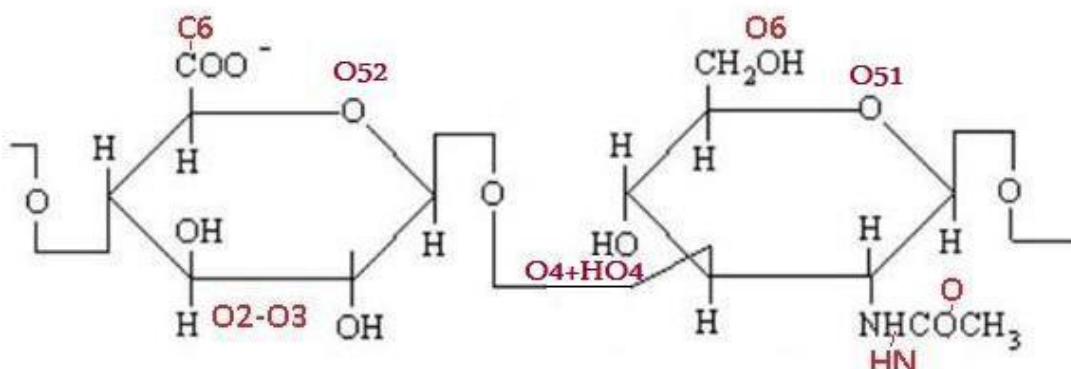
Zpracování dat bylo možné až po ustálení celého systému, tedy až když nastala rovnováha interakcí iontů s HA. Bylo napočítáno kolem 30 ns simulací pro jednotlivé systémy, ale rovnováha nastala už za cca 20 ns, kdy závislost počtu iontů na čase kolísala kolem ustálené střední hodnoty. Byl měřen pouze jeden řetízek HA, který zůstal po celou dobu simulace ve vodním boxu, aby výsledek byl relevantní. Ustálenou závislost počtu iontů na čase můžeme sledovat například na systému HA s vápenatými kationty, kdy celkový počet iontů byl výsledkem sečtení počtu iontů na jednotlivých vytipovaných skupinách – viz Obr. 16.



Obr. 16 – Závislost součtů Ca^{2+} iontů v těsné blízkosti jednotlivých vytipovaných skupin HA na čase

Bylo vytipováno 8 míst nejvýraznější interakce iontů s molekulou HA. Každý řetízek HA nese záporný náboj -24 e. Monosacharid N-acetylglukosamin je elektricky neutrální a kyselina glukuronová nese parciální náboje v celkové hodnotě -1e. Kationty se mohou uchycovat jen na skupinách, jejichž parciální náboj je záporný. Pomocí PSF (Protein Structure File) souborů, které byly vytvořeny pomocí softwaru VMD, byly zjištěny skupiny, které mají parciální náboj záporný, a je u nich možná interakce s ionty. Výběr skupin byl taktéž inspirován předchozími studiemi – viz např. studie interakce HA s DMSD [21]. Ve vizualizačním programu VMD byly ověřeny tyto vytipované skupiny a zpřesněna skutečná místa uchycení – viz Obr. 17. U některých určených skupin, které se nachází v těsné blízkosti od sebe,

docházelo k dvojímu započítání některých iontů. Částečným řešením bylo spojení takových skupin – viz např. spojení O4 a HO4 do jedné (O4+HO4).



Obr. 17 – Místa nejčastější interakce iontů s molekulou HA

Pomocí vytvořených tcl skriptů (Tool Command Language, jednoduchý skriptovací jazyk používající se k vytváření nástrojů pro testování software či k programování vestavěných systémů) byly počítány počty iontů v jednotlivých framech (1 frame = 18 ps) v těsné blízkosti HA. U jednomocných solí byly počítány ionty do 3Å od řetízku HA. U dvojmocných solí do 4Å, jelikož některé dvoumocné ionty se navazovaly na řetízek HA přes vodu, tudíž do 3Å od některých skupin HA se nenacházely žádné ionty. Ze souboru čísel získaných z tcl skriptů (viz Příloha P II) byl určen aritmetický průměr

$$\hat{\mu} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad 11)$$

a jeho směrodatná odchylka

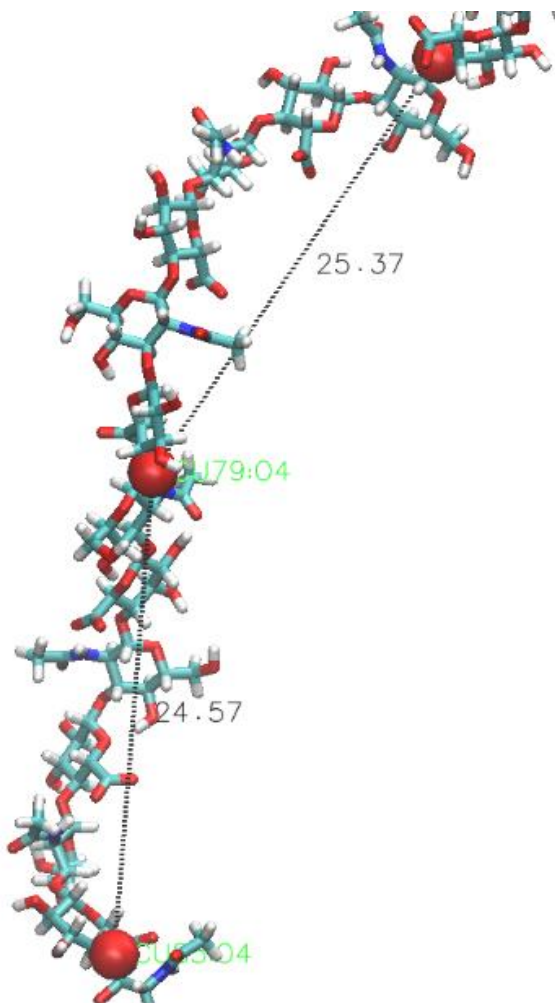
$$\hat{\sigma}_{\mu} = \sqrt{\frac{1}{n(n-1)} \sum_{i=1}^n (x_i - \hat{\mu})^2}. \quad 12)$$

Všechny charakteristiky byly středovány přes 250 framů. Tudíž délka simulace, na které se počítaly 3 základní charakteristiky, odpovídala 4,5 ns.

Ze středních počtů iontů na jednotlivých skupinách měřeného úseku HA bylo určeno procentuální zastoupení na jednotlivých skupinách pomocí koláčových grafů.

V programu VMD byly taktéž měřeny střední počty vodíkových můstků v rámci samotného řetízku HA a počty vodíkových můstků mezi řetízkiem HA a vodou, protože právě vodíkové můstky by měly být zodpovědné za sekundární, resp. terciální strukturu makromolekuly. Parametry pro výpočet vodíkových můstků byly nastaveny tak, že započítávány byly pouze vodíkové můstky, jejichž donor-akceptorová vzdálenost byla 3 Å a maximální úhel mezi donorem a akceptorem nebyl větší než 20°.

Pomocí programu VMD byly taktéž měřeny délky šestice monosacharidových jednotek. Aby výsledek nebyl ovlivněn konkrétní volbou jedné šestice monosacharidů, byly na řetízku HA vytipovány 2 různé šestice – viz Obr. 18. Aritmetické průměry délek byly porovnány s literaturou – viz Obr. 9. Bylo zkoumáno, zda dochází k odlišnostem délek na jednotlivých systémech.



Obr. 18 – Znáznornění šestic monosacharidových jednotek na dvou různých místech HA

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

6.1 Ionty v blízkosti kyseliny hyaluronové

6.1.1 Celkové počty iontů

U jednomocných kationtů byly mezi ionty v těsné blízkosti HA počítány ionty do 3Å od HA. U dvoumocných kationtů mezi byly mezi ionty v těsné blízkosti HA počítány ionty do 4Å, protože některé kationty interagovaly s HA přes vodu.

V Tab. 1 jsou zaznamenány aritmetické průměry celkových počtů iontů v těsné blízkosti HA a jejich směrodatné odchylky pro jednotlivé kationty. Z jednomocných solí nejvíce interagovaly sodné kationty – viz Obr. 19. Celkový nevykompenzovaný náboj na jednom řetízku HA -24e je sodnými kationty v průměru obsazen ze 42%. Z dvoumocných solí nejvíce interagovaly s HA vápenaté kationty – viz Obr. 19, u nichž byl náboj řetízku HA v průměru obsazen z 56%.

HA	Cs	K	Na	Mg	Zn	Ca
$\hat{\mu}$	3,26	11,52	20,15	13,71	16,26	26,80
$\hat{\sigma}_{\mu}$	0,12	0,19	0,15	0,20	0,18	0,11

Tab. 1 – Aritmetické průměry celkových počtů iontů v těsné blízkosti HA ($\hat{\mu}$) a jejich směrodatné odchylky ($\hat{\sigma}_{\mu}$)

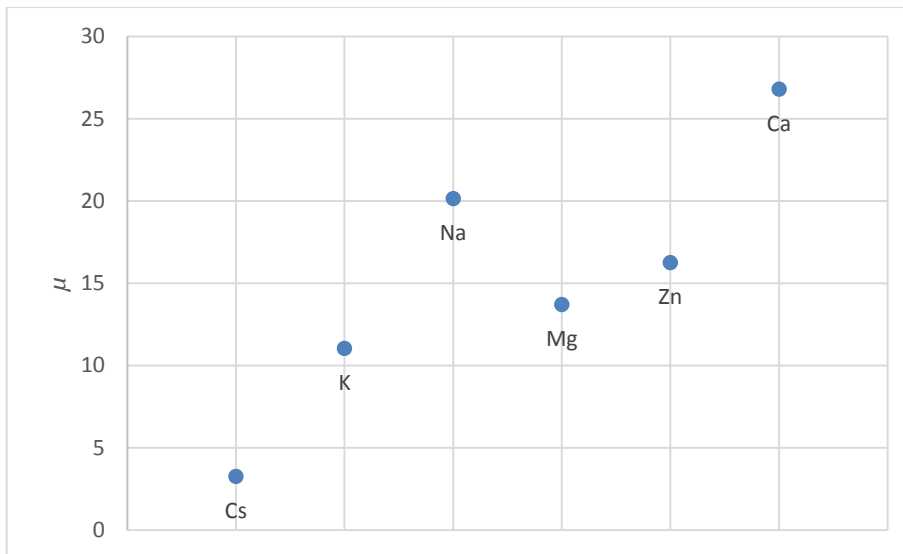
V Tab. 2 jsou zaznamenány aritmetické průměry součtu iontů v těsné blízkosti 8 vytipovaných skupin na HA a jejich směrodatné odchylky pro jednotlivé kationty. Zde můžeme vidět velký pokles hořečnatých kationtů oproti Tab. 1. Nejvíce s HA interagují Na⁺ a Ca²⁺ – viz Obr. 20, 23 a 25. U nich jsou výrazně větší součty iontů u jednotlivých skupin než celkové počty iontů v blízkosti HA. Důvodem je pravděpodobně, že některé ionty splňovaly stanovené podmínky pro více skupin. U K⁺ a Zn²⁺ nebyl zaznamenán výrazný rozdíl mezi celkovým počtem iontů a součtem iontů u jednotlivých skupin. Nejméně s HA interagují Cs⁺ a Mg²⁺ – viz Obr. 20, 24 a 26. U Cs⁺ jsou počty iontů tak výrazně malé, že lze jen konstatovat, že Cs⁺ s HA téměř neinteraguje. U Mg²⁺ jsou výrazně nižší součty iontů u jednotlivých skupin, než celkové počty iontů v těsné blízkosti HA. Důvodem je, že ionty interagovaly zásadně přes vodu, bylo tedy nutné počítat ionty do vzdálenosti 4Å od HA, v nichž jsou ale potom započítány i ionty vyskytující se blízko HA zcela náhodně, aniž by skutečně byly u záporně nabitých skupin.

Zajímavé jsou i časové závislosti součtu jednomocných a dvoumocných iontů v těsné blízkosti jednotlivých vytipovaných skupin HA. Na Obr. 21 má nejstálější časovou závislost Cs⁺, což bylo způsobeno tím, že Cs⁺ s HA téměř neinteragovalo. Naopak Na⁺ a K⁺ více kolísají. Tento jev byl pravděpodobně způsoben tím, že tyto kationty interagovaly s více než jednou skupinou na HA. Na Obr. 22 má nejstálější časovou závislost Mg²⁺, ale i Ca²⁺. Ustálenost Mg²⁺ je způsobena malými počty iontů v těsné blízkosti HA. Ustálenost Ca²⁺ je

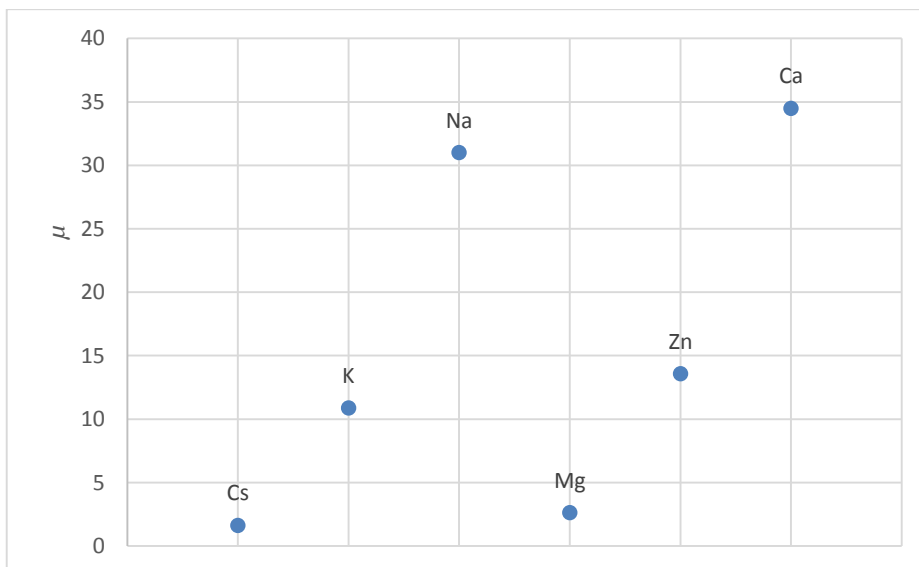
způsobena tím, že tyto kationty interagovaly převážně s jednou z osmi vytipovaných skupin HA.

suma	Cs	K	Na	Mg	Zn	Ca
$\hat{\mu}$	1,59	10,52	27,18	2,99	15,70	34,51
$\widehat{\sigma}_{\mu}$	0,08	0,30	0,30	0,11	0,30	0,08

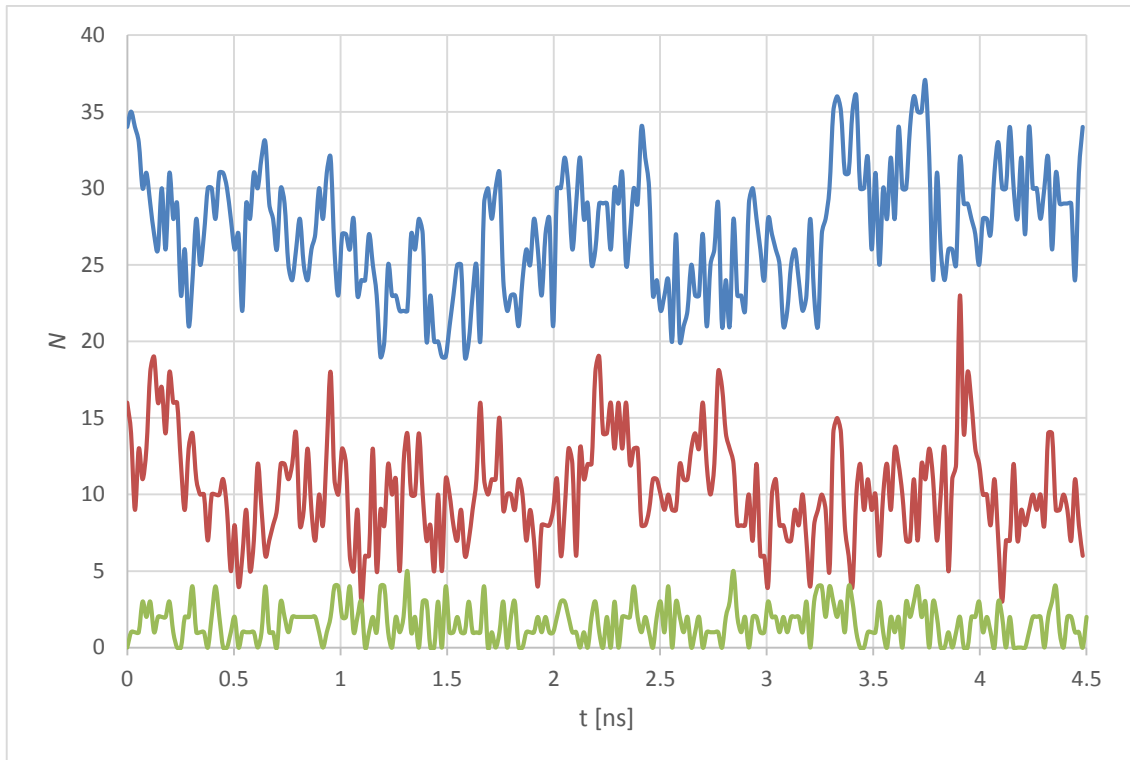
Tab. 2 – Aritmetické průměry součtu iontů v těsné blízkosti jednotlivých vytipovaných skupin na HA ($\hat{\mu}$) a jejich směrodatné odchylky ($\widehat{\sigma}_{\mu}$)



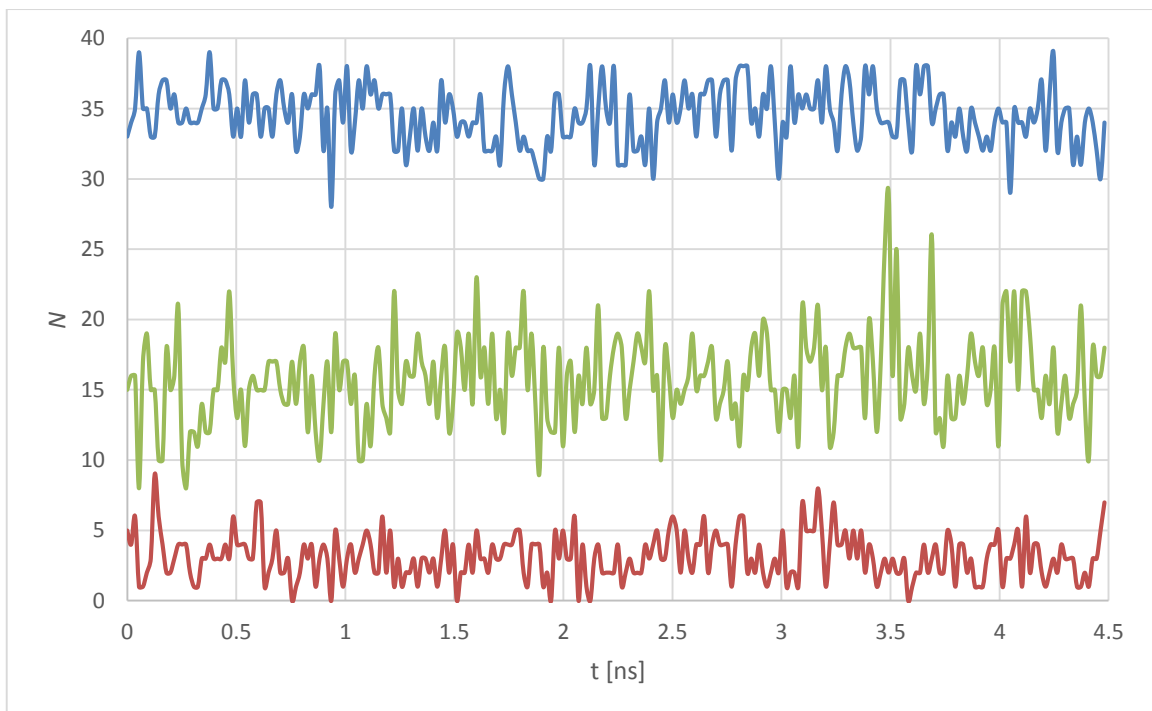
Obr. 19 – Aritmetické průměry celkových počtů iontů v těsné blízkosti HA



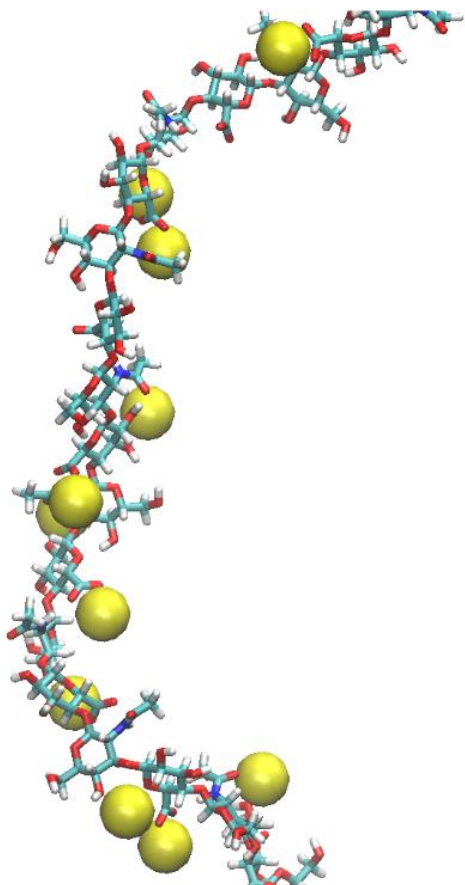
Obr. 20 – Aritmetické průměry součtu iontů v těsné blízkosti jednotlivých vytipovaných skupin na HA



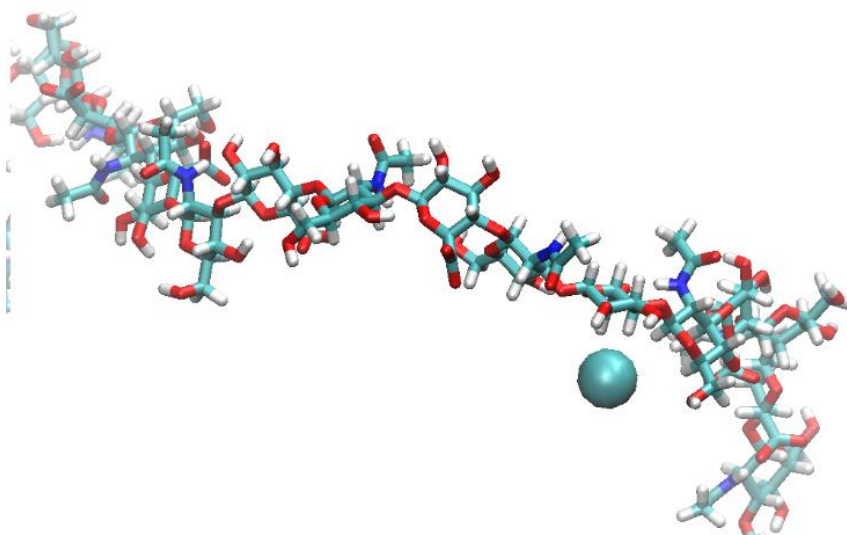
Obr. 21 – Závislost součtu jednomocných iontů v těsné blízkosti jednotlivých vytipovaných skupin HA na čase (od shora Na⁺, K⁺, Cs⁺)



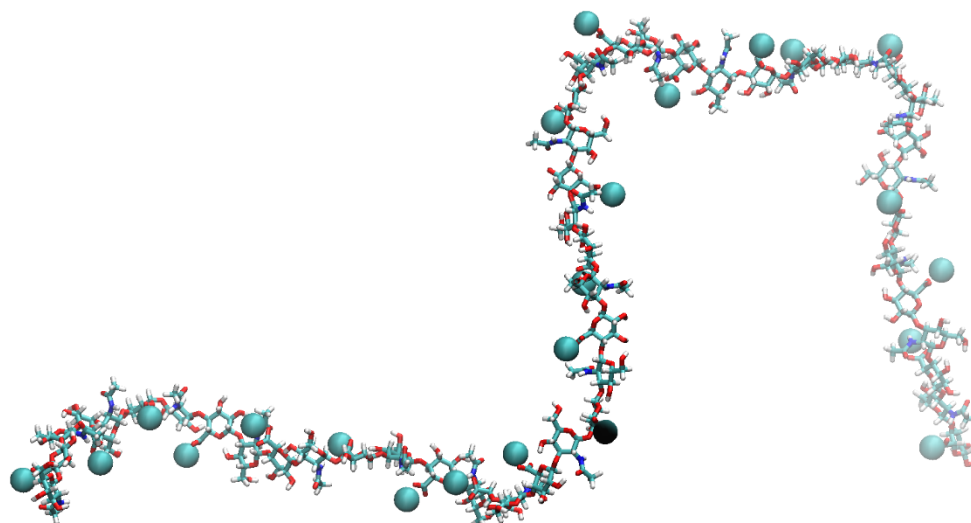
Obr. 22 – Závislost součtu dvoumocných iontů v těsné blízkosti jednotlivých vytipovaných skupin HA na čase (od shora Ca²⁺, Zn²⁺, Mg²⁺)



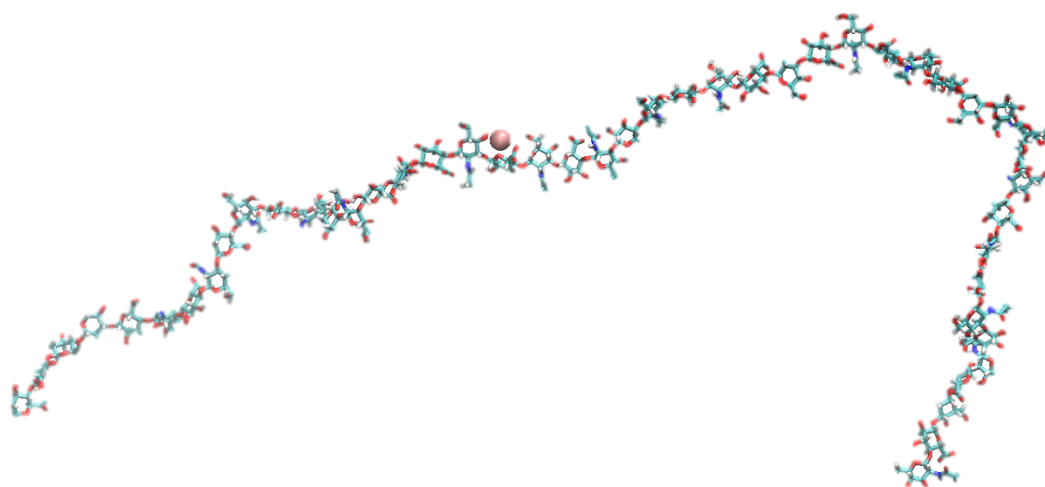
Obr. 23 – Interakce sodných kationtů (žlutě) s HA do vzdálenosti 3Å od 12 monosacharidových jednotek HA



Obr. 24 – Interakce cesných kationtů (modře) s HA do vzdálenosti 3Å od 12 monosacharidových jednotek HA



Obr. 25 – Interakce vápenatých kationtů (modře) s celým řetízkem HA na vytipované skupině C6 do 3Å



Obr. 26 – Interakce hořečnatých kationtů (červeně) s celým řetízkem HA na vytipované skupině C6 do 3Å

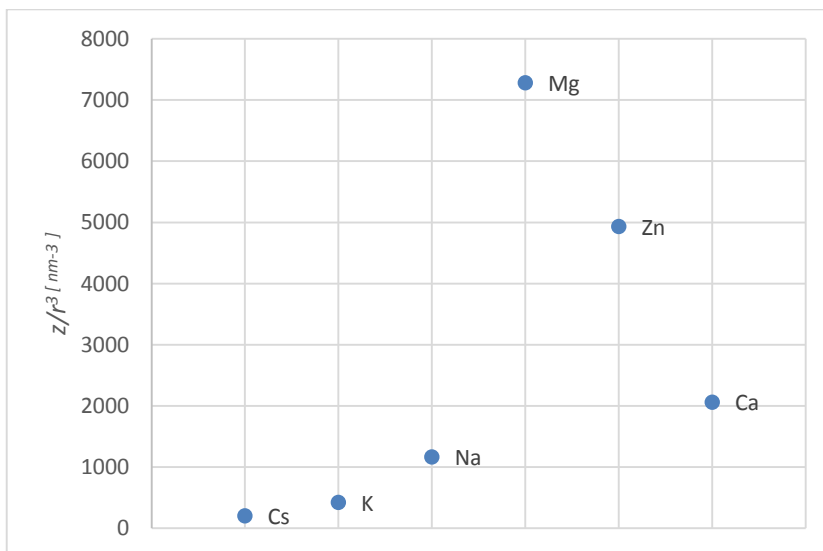
Aby počty iontů v těsné blízkosti HA bylo možné srovnat s Hofmeisterovou řadou vzhledem k vodě, byla pro všechny kationty vypočtena nábojová z/r^3 , kde z je mocenství a r je iontový poloměr daného kationtu – viz Tab. 3 a 4. Iontové poloměry byly získány z tabulky iontových poloměrů – viz Příloha P I. Hodnoty z/r^3 přesně odpovídají Hofmeisterově řadě vzhledem k vodě – viz Obr. 4, do které byl doplněn chybějící kationt Zn^{2+} – viz Obr. 28.

1mocné	z	r [nm]	z/r^3
Cs^+	1	0,169	207,1762
K^+	1	0,133	425,0549
Na^+	1	0,095	1166,3510

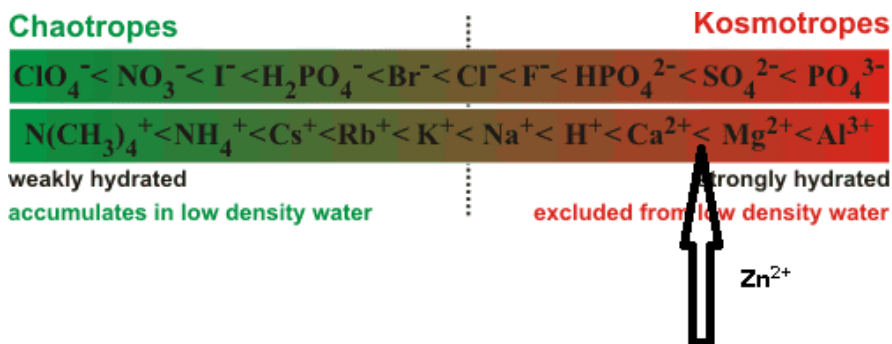
Tab. 3 – Výpočet z/r^3 pro jednomocné ionty

2mocné	z	r [nm]	z/r^3
Mg^{2+}	2	0,065	7282,658
Zn^{2+}	2	0,074	4935,542
Ca^{2+}	2	0,099	2061,220

Tab. 4 – Výpočet z/r^3 pro dvoumocné ionty



Obr. 27 – Hodnoty z/r^3 pro jednotlivé kationty



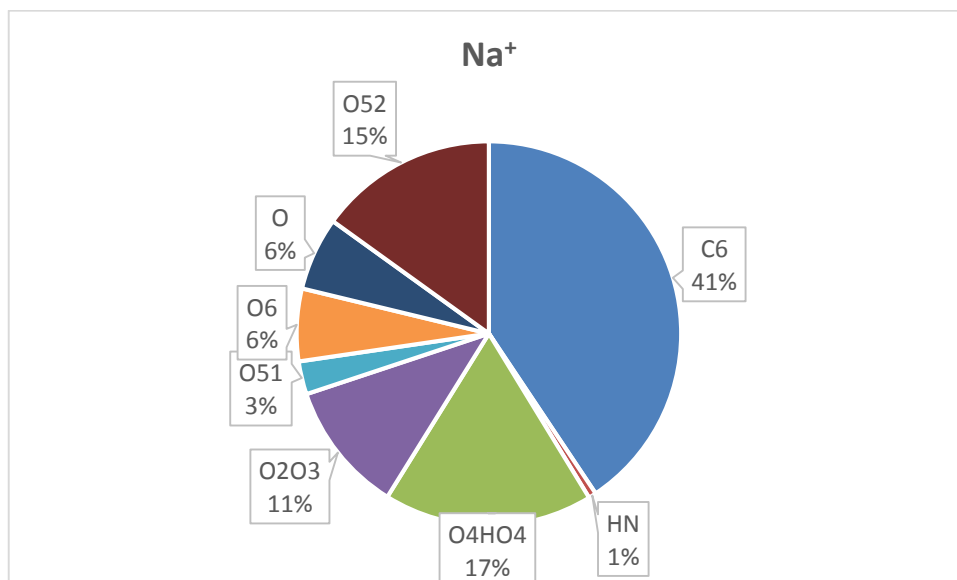
Obr. 28 – Hofmeisterova řada iontů vzhledem k vodě (Zn^{2+} se řadí mezi Ca^{2+} a Mg^{2+}) [13]

6.1.2 Procentuální zastoupení iontů na jednotlivých skupinách

Pomocí softwaru VMD bylo zjištěno, že největší skupinou na molekule HA je skupina COO^- (námi vytipovaná skupina C6), která je přibližně srovnatelná s velikostí sodného kationtu. Naopak nejmenší skupinou je námi označená skupina HN. Ostatní skupiny jsou co do velikosti zhruba stejně velké a řadí se svou velikostí mezi skupiny C6 a HN.

System Na^+ s HA

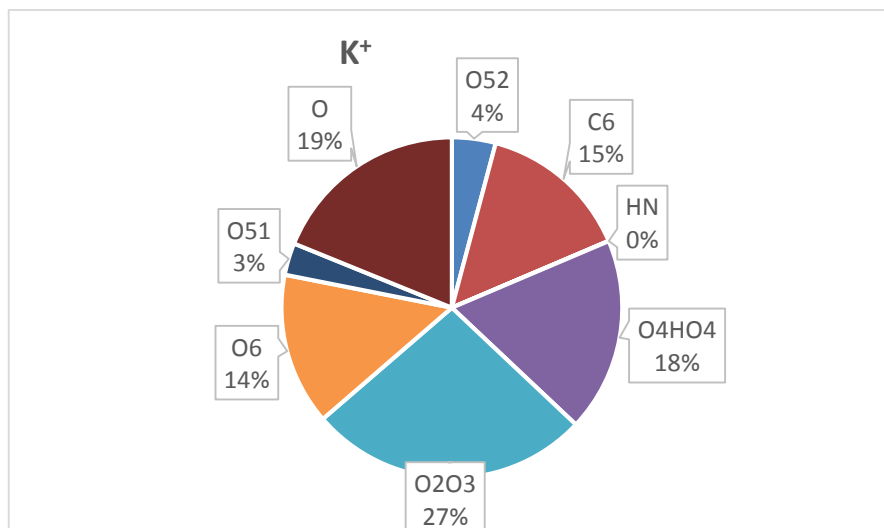
U tohoto systému by mělo platit pravidlo odpovídajících vodních afinit, tudíž by se měl sodný kationt nejvíce párovat se skupinou COO^- – viz iontové párování [15]. Nejvíce sodných kationtů interagovalo s HA v těsné blízkosti skupiny C6 (jedná se o skupinu COO^- na D-glukuronové kyselině – viz Obr. 17). Procentuální zastoupení na skupině C6 bylo 41%.



Obr. 29 – Procentuální zastoupení sodných kationtů na 8 vytipovaných skupinách HA

System K^+ s HA

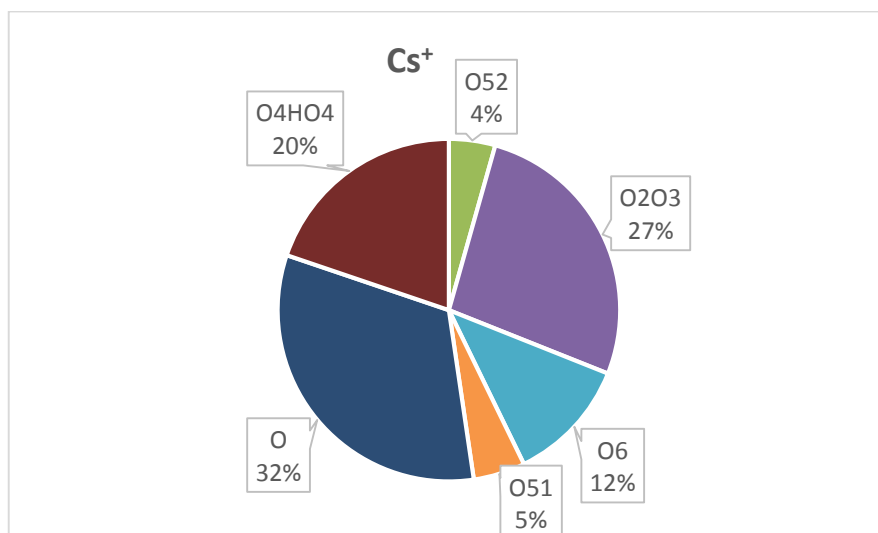
Nejvíce draselných kationtů interagovalo s HA na skupině O2O3 a to s procentuálním zastoupením 27%. Na rozdíl od systému HA s Na^+ nepřevažovala interakce pouze s jednou skupinou, ale zastoupení na jednotlivých skupinách bylo kromě skupiny O51, O52 a HN téměř rovnoměrné. Prokázala se skutečnost, že skupina COO^- preferuje více sodík jak draslík – viz Obr. 5.



Obr. 30 – Procentuální zastoupení draselných kationtů na 8 vytipovaných skupinách HA

System Cs⁺ s HA

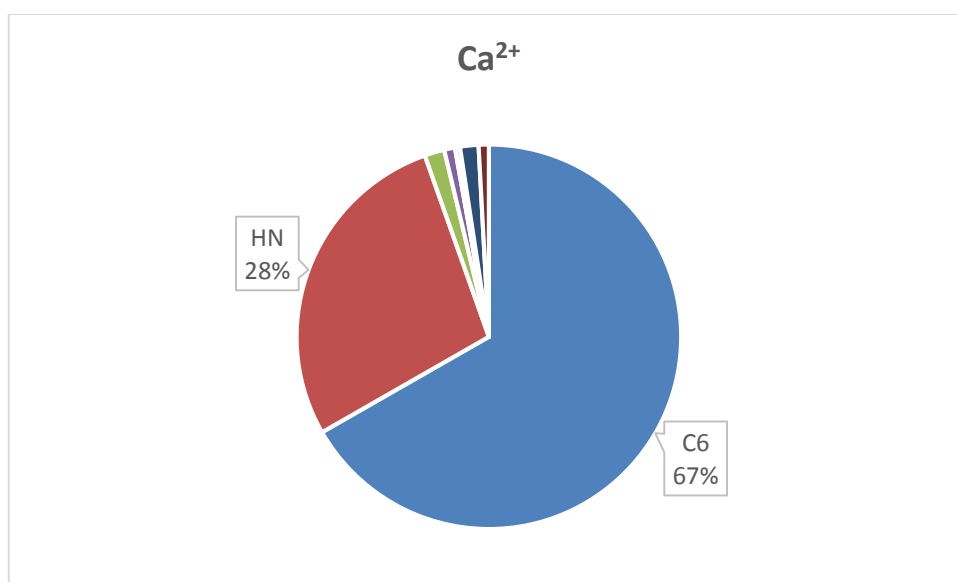
Jelikož u systému s cesnými kationty byl aritmetický průměr počtu kationtů v těsné blízkosti HA pouze $1,60 \pm 0,08$, koláčový graf procentuálního zastoupení iontů na jednotlivých skupinách má pouze orientační charakter. Nízký počet je způsoben špatnou afinitou cesných kationtů k vytipovaným skupinám HA. Žádná skupina HA není tak velká jak cesný kationt, jehož iontový poloměr je 0,169 nm.



Obr. 31 – Procentuální zastoupení cesných kationtů na 8 vytipovaných skupinách HA

System Ca^{2+} s HA

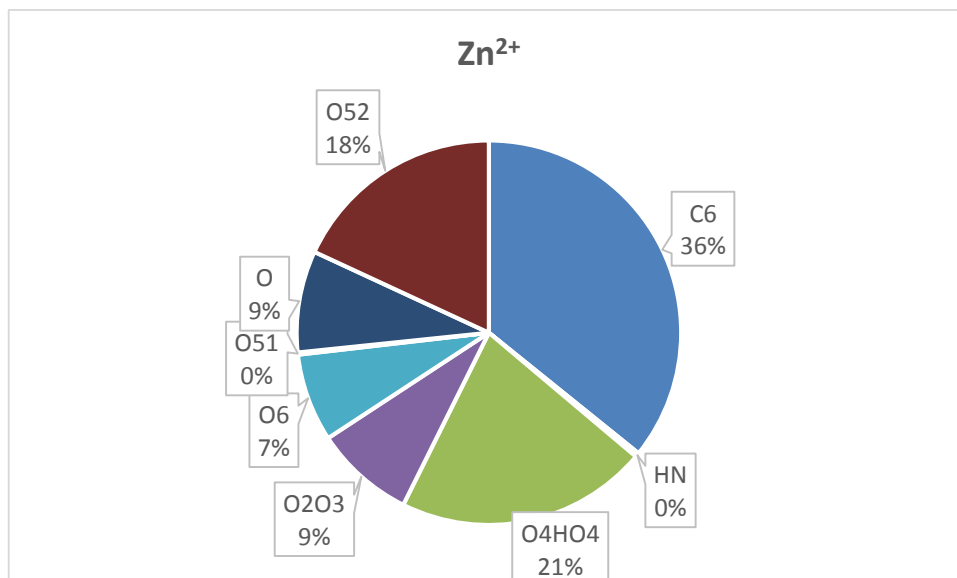
U tohoto systému se taktéž předpokládalo, že bude platit pravidlo odpovídajících vodních afinit, tudíž že největší procentuální zastoupení by mělo být na skupině označené jako C6. Iontový poloměr sodných a vápenatých kationtů je přibližně stejný. Vápenaté kationty interagovaly s HA pouze na dvou z osmi vytipovaných skupin. Nejvíce vápenatých kationtů interagovalo s HA na skupině C6 a to s procentuálním zastoupením 67%. Podle grafu vápenaté kationty taktéž interagovaly s HA na skupině HN, která je mnohem menší než skupina C6 a to s procentuálním zastoupením 28%. Ve skutečnosti tyto ionty pravděpodobně přitahovala skupina C6, která je v těsné blízkosti skupiny HN. Vápenaté kationty interagují s těmito skupinami přímo, tzn. mezi iontem a skupinou na HA se nevyskytují molekuly vody – viz Obr. 25.



Obr. 32 – Procentuální zastoupení vápenatých kationtů na 8 vytipovaných skupinách HA

System Zn^{2+} s HA

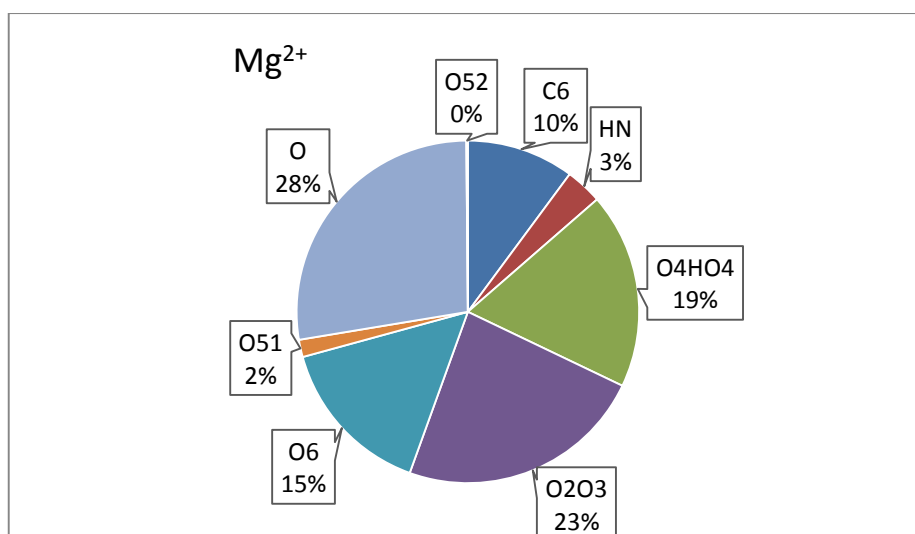
U systému HA se zinečnatými kationty nedocházelo především k interakci na jedné či na dvou vytipovaných skupinách HA. Afinita skupina C6 už nebyla dostatečně velká, aby docházelo pouze k interakci na této skupině, jako v případě interakce vápenatých kationtů s HA. Procentuální zastoupení na skupině C6 bylo 36%. Interakce tedy probíhala i na jiných vytipovaných skupinách. Druhé největší procentuální zastoupení měla skupina O4HO4. Zinečnaté kationty interagují s HA jak přes molekuly vody tak i přímo.



Obr. 33 – Procentuální zastoupení zinečnatých kationtů na 8 vytipovaných skupinách HA

System Mg^{2+} s HA

Aritmetický průměr počtů hořečnatých kationtů v těsné blízkosti HA byl pouze $2,99 \pm 0,11$. Koláčový graf procentuální zastoupení iontů na jednotlivých skupinách má tedy pouze orientační charakter, jak tomu je i u systému HA s cesnými kationty. Hořečnaté kationy interagují s HA vždy přes molekulu vody – viz Obr. 26. Malý počet iontů v těsné blízkosti HA byl způsoben špatnou afinitou hořečnatých kationtů s HA, jelikož na HA se nenachází žádná skupina srovnatelně malá jako hořečnatý kationt, jehož iontový poloměr je 0,065 nm.



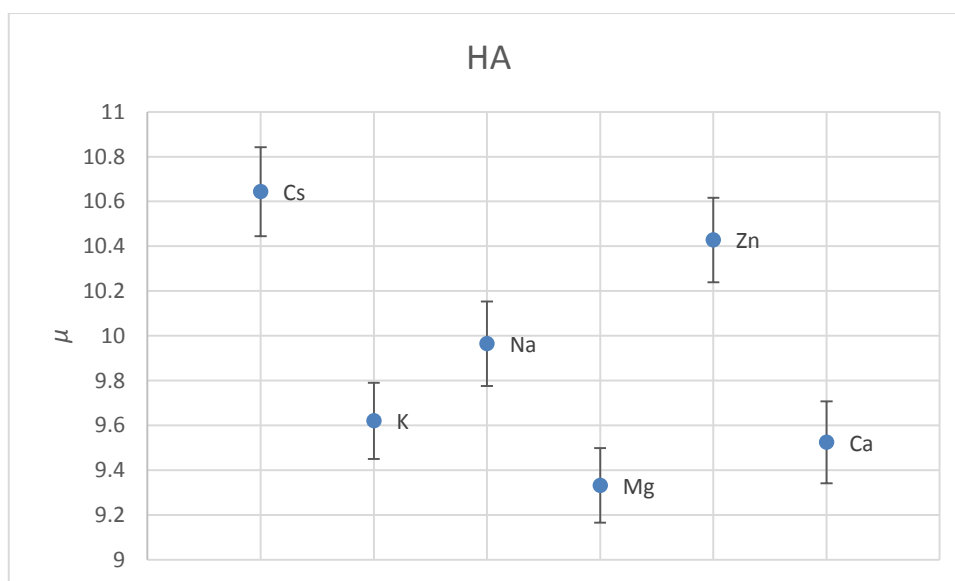
Obr. 34 – Procentuální zastoupení hořečnatých kationtů na 8 vytipovaných skupinách HA

6.2 Vodíkové můstky

V Tab. 5 jsou zaznamenány aritmetické průměry počtu vodíkových můstků na samotné HA. Vzhledem k malému počtu vodíkových můstků na samotné HA a poměrně velkým chybám aritmetický průměrů (viz Obr. 35) nelze tato data srovnávat s Hofmeisterovou řadou ani s předchozími daty.

HA	Cs	K	Na	Mg	Zn	Ca
$\hat{\mu}$	10,64	9,62	9,96	9,33	10,43	9,52
$\hat{\sigma}_{\mu}$	0,19	0,17	0,20	0,19	0,19	0,17

Tab. 5 – Aritmetické průměry počtů vodíkových můstků mezi samotnou HA ($\hat{\mu}$) a jejich směrodatné odchylky ($\hat{\sigma}_{\mu}$)



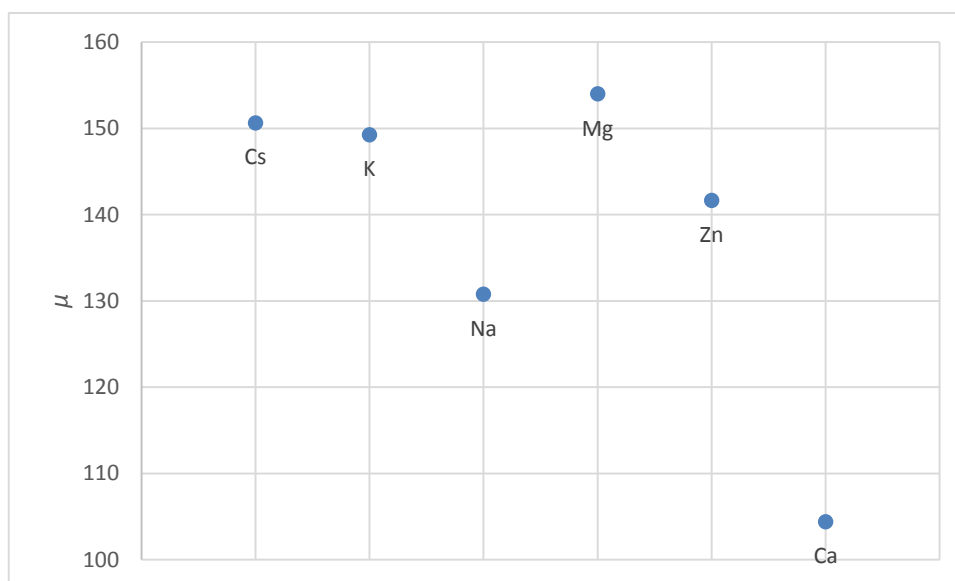
Obr. 35 – Aritmetické průměry počtu vodíkových můstků na samotné HA a jejich směrodatné odchylky

V Tab. 6 jsou zaznamenány aritmetické průměry počtu vodíkových můstků mezi HA a vodou. Zde můžeme vidět u jednomocných iontů souvislost s Hofmeisterovou řadou vzhledem k vodě – viz Obr. 4. Cesné kationty jsou vysoce chaotropní, tedy velice málo ovlivňují vodíkové vazby v okolní vodě, a proto by počet vodíkových můstků mezi HA a vodou měl být u cesných kationtů největší. Naopak sodné kationty jsou spíše kosmotropní, tedy umožňují porušení vodíkových vazeb ve vodě, a počet vodíkových můstků mezi HA a vodou je menší. Dvoumocné kationty ale vykazují inverzní charakter. Zdá se, že čím více je iontů v těsné blízkosti HA, tím méně se tvoří vodíkových můstků mezi HA a vodou. Důležitějším faktorem, než je soupeření iontů a makromolekuly o vodu, tedy asi bude skutečnost, že velký počet iontů v těsné blízkosti neumožní tvorbu vodíkových můstků z HA

na vodu v místech, kde jsou ionty. Korespondence počtu iontů v těsné blízkosti HA s tvorbou vodíkových můstku mezi HA a vodou je dobře patrná z Obr. 36 a Obr. 19 a 20.

HA - voda	Cs	K	Na	Mg	Zn	Ca
$\hat{\mu}$	150,6	149,3	130,8	154,0	141,6	104,4
$\hat{\sigma}_{\mu}$	0,6	0,6	0,7	0,7	0,6	0,6

Tab. 6 – Aritmetické průměry počtů vodíkových můstků mezi HA a vodou ($\hat{\mu}$) a jejich směrodatné odchylky ($\hat{\sigma}_{\mu}$)



Obr. 36 – Aritmetické průměry počtů vodíkových můstků mezi HA a vodou

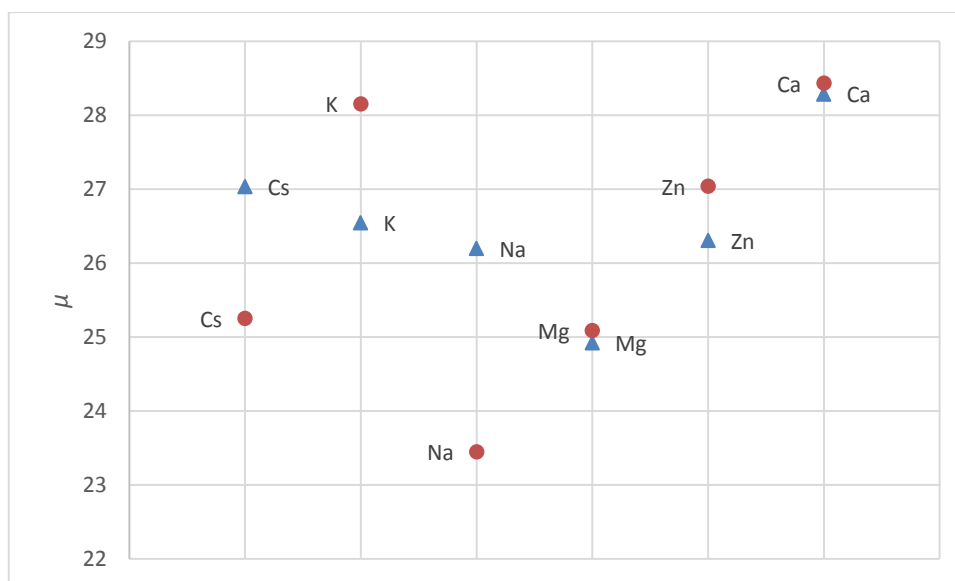
6.3 Délky šestice monosacharidových jednotek HA

V Tab. 7 jsou zaznamenány aritmetické průměry délek šestice monosacharidových jednotek, které byly měřeny na dvou různých místech HA pro každý jednotlivý systém – viz Obr. 18. Zajímavá je souvislost s Hofmeisterovou řadou iontů vzhledem k vodě, která by odpovídala následující hypotéze. Chaotropní ionty mají velice slabé interakce s vodou a výsledný celkový systém nedokáže zaujmout co nejmenší objem. Tudíž největší délku šestice monosacharidových jednotek očekáváme u velice chaotropních iontů. Z jednomocných kationtů byla největší délka šestice u systému HA s Cs^+ , které jsou právě velice chaotropní. Naopak sodné kationty jsou oproti Cs^+ více kosmotropní a silněji interagují s vodou a celý systém dokáže zaujmout co nejmenší objem. Tudíž menší délka šestice u systému HA s Na^+ se zdá být v souladu s Hofmeisterovou řadou. Podle této hypotézy by u dvoumocných solí měla být nejmenší délka šestice u systému HA s Mg^{2+} , jelikož hořečnaté kationty jsou nejvíce kosmotropní. U jedné šestice monosacharidových jednotek (trojúhelníky v Obr. 37) jsou délky v souladu s touto hypotézou, u druhé šestice monosacharidových jednotek (kolečka v Obr. 37) se od této hypotézy odchyluje pouze HA

s draselnými ionty. Třetí kontrolní měření (Tab. 8) však výše formulované hypotéze zcela odporovalo. Délka různých šestic monosacharidových jednotek se velmi liší v závislosti na výběru konkrétního úseku HA, a proto není vhodnou charakteristikou pro popis vlivu iontů na HA. Délka u systému HA se sodnými kationty byla u předchozí studie zjištěna 28Å – viz Obr. 9, kdežto u našeho systému HA se sodnými kationty byla naměřena délka v rozmezí od 26 do 23Å, což poukazuje na velkou variabilitu délek monosacharidových jednotek. Důvodem velké odlišnosti může také být skutečnost, že autoři [21] simulovali jen hexasacharidové molekuly HA. Na délku šestic monosacharidových jednotek bude mít taktéž vliv počty iontů v těsné blízkosti HA, podobně jak u tvorby vodíkových můstků.

	Cs	K	Na	Mg	Zn	Ca
$\hat{\mu}$	27,04	26,54	26,20	24,92	26,30	28,28
$\hat{\sigma}_{\mu}$	0,10	0,10	0,11	0,10	0,11	0,10
$\hat{\mu}$	25,25	28,15	23,45	25,09	27,04	28,43
$\hat{\sigma}_{\mu}$	0,11	0,10	0,12	0,13	0,10	0,10

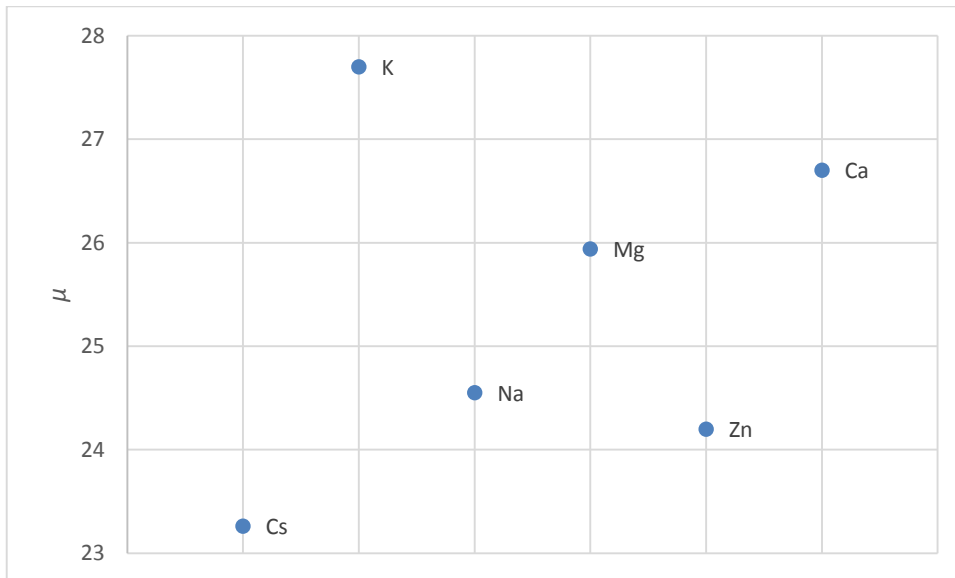
Tab. 7 – Aritmetické průměry délek šestic monosacharidových jednotek (v Å) na dvou různých úsecích HA ($\hat{\mu}$) a jejich směrodatné odchylky ($\hat{\sigma}_{\mu}$)



Obr. 37 – Aritmetické průměry délek šestic monosacharidových jednotek na dvou různých úsecích HA

	Cs	K	Na	Mg	Zn	Ca
$\hat{\mu}$	23,26	27,7	24,55	25,94	24,2	26,7
$\hat{\sigma}_{\mu}$	0,11	0,1	0,16	0,12	0,1	0,1

Tab. 8 – Aritmetické průměry délek šestice monosacharidových jednotek na HA ($\hat{\mu}$) a jejich směrodatné odchylky ($\hat{\sigma}_{\mu}$) pro třetí kontrolní měření



Obr. 38 – Aritmetické průměry délek šestice monosacharidových jednotek na HA pro třetí kontrolní měření

ZÁVĚR

Cílem práce bylo popsat vliv iontů na makromolekulu HA. Zkoumány byly dva různé systémy HA. V prvním byly zkoumány dva antiparalerní řetízky ve vodě zcela volné, u druhého systému byla hned na začátku provedena fixace 2 atomů uprostřed každého z řetízků v místech, kde se spontánně vytvořily vodíkové můstky. Důvodem fixace byla snaha zjistit, zda řetízky, které jsou donuceny být v těsné blízkosti, budou spolu interagovat a vytvoří např. strukturu dvoušroubovice. Každý řetízek systému obsahoval 24 dvojic monosacharidových jednotek. Po obklopení vodou byl systém tak velký, že byl pro MD na hraně únosnosti, takže o moc delší provázky molekulovou dynamikou není možné zkoumat.

Vliv solí na makromolekulu HA byl vyhodnocován zvlášť pro jednomocné kationty a zvlášť pro dvoumocné kationty kvůli různé iontové síle. U jednomocných kationtů byly mezi ionty v těsné blízkosti HA počítány ionty do 3Å od HA. U dvoumocných kationtů byly mezi ionty v těsné blízkosti HA počítány ionty do 4Å, protože některé kationty interagovali s HA přes vodu.

Za nejzajímavější zjištění považuji okolnost, že důležitějším faktorem pro interakci různých iontů s HA je „pravidlo odpovídajících si vodních afinit“ než Hofmeisterova řada iontů. Z výsledků totiž vyplývá, že neexistuje žádná univerzální Hofmeisterova řada iontů. Vždy je třeba uvést, vliv iontů na jaký konkrétní systém zkoumáme. Interakce makromolekuly s ionty je nejméně výraznější, pokud mají postranní skupiny makromolekuly srovnatelně velkou velikost jako ionty účastníci se interakce. Z jednomocných solí nejvíce interagoval sodný kationt s molekulou HA, jelikož sodný kationt má srovnatelnou velikost jako postranní řetězce HA. Naopak z jednomocných solí nejméně interagoval cesný kationt, jehož velikost je daleko větší než postranní skupiny HA. Z dvoumocných nejvíce interagoval vápenatý kationt, jehož velikost je srovnatelná se sodným kationtem. Naopak nejméně interagoval hořečnatý kationt, jehož velikost je daleko menší než postranní skupiny HA. Vzhledem k HA se jednomocné ionty tedy seřadily stejně jako v Hofmeisterově řadě vzhledem k vodě (Cs^+ - K^+ - Na^+), ale dvoumocné ionty se seřadily přesně v opačném pořadí (Mg^{2+} - Zn^{2+} - Ca^{2+}).

Zklamáním bylo, že při počítání vodíkových můstků na samotné HA nebyla zaznamenána žádná souvislost s Hofmeisterovou řadou či s velikostí iontů, jelikož aritmetické průměry počtu vodíkových můstků v rámci HA byly malé a jejich směrodatné odchylky průměrů velké. U počítání vodíkových můstků mezi HA a vodou bylo zaznamenáno opět zajímavé zjištění, že důležitějším faktorem, než je Hofmeisterova řada iontů vzhledem k vodě, tedy soupeření iontů a makromolekuly o vodu, bude spíše skutečnost, že velký počet iontů v těsné blízkosti neumožní tvorbu vodíkových můstků z HA na vodu v místech, kde už jsou ionty. U jednomocných solí odpovídaly počty vodíkových můstků mezi HA a vodou Hofmeisterově řadě iontů vzhledem k vodě. Překvapení nastalo u dvoumocných solí, kde se

počty vodíkových můstků mezi HA a vodou seřadily opačně než v Hofmeisterově řadě iontů vzhledem k vodě. Tento závěr odpovídá tvrzení v předchozím odstavci.

Mírným zklamáním byla poslední zjišťovaná charakteristika interakcí solí s HA, jejichž výběr byl inspirován dříve publikovanými daty. Touto charakteristikou bylo měření délek šestice monosacharidových jednotek molekuly HA. Bylo zjištěno, že tato charakteristika není vhodná pro popis vlivu iontů na HA, jelikož délky různých šestic monosacharidových jednotek se velmi liší v závislosti na výběru konkrétního úseku HA.

U speciálních fixovaných systémů nebyla bohužel pozorována významná interakce obou řetízků HA. Důvodem mohly být krátké časy simulací. Bylo by zajímavé ověřit, zdali při delších časech simulací fixovaného systému by k interakci řetízků docházelo.

Bakalářská práce se zabývala pouze interakcemi kationtů s molekulou HA. Zajímavé by mohlo být zkoumat také vliv různých aniontů na molekulu HA, popřípadě koncentrační závislost všech charakteristik (respektive vliv iontové síly).

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Almond, A., DeAngelis, P.L., Blundell, Ch. D. Hyaluronan: The Local Solution Conformation Determined by NMR and Computer Modeling is Close to a Contracted Left-handed 4-Fold Helix. *J. Mol. Biol.*, 2006, p. 358,359
- [2] https://cs.wikipedia.org/wiki/Kyselina_hyaluronov%C3%A1
- [3] <http://www.helenkellerfoundation.org/index.php?cid=158>
- [4] Něco málo z historie. [online]. Dostupné z <http://www.molekula-mladi.cz/neco-malo-z-historie>
- [5] Hyaluronan [online]. Dostupné z <https://en.wikipedia.org/wiki/Hyaluronan>
- [6] Necas, J., Bartosikova, L., Brauner, P., Kolar, J. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinarni Medicina*, 53, 2008 (8), str. 397–411
- [7] Khabarov, V.N., Selyanin M.A., Zelenetskii A.N. Solid-state modification of hyaluronic acid for applications in esthetic medicine (in Russian), *Vestnik Estetichskoi Mediciny*, 2009. 7 (3), 18–24.
- [8] Jha, A.K., Hule, R.A., Jiao, T., et al. (2009) Structural analysis and mechanical characterization of hyaluronic acid-based doubly cross-linked networks. *Macromolecules*, 42 (2), 537–546.
- [9] Scott, J.E., Cummings, Ch., Brass, A., Chen, Y. Secondary and tertiary structures of hyaluronan in aqueous solution, investigated by rotary shadowing-electron microscopy and computer simulation. *Biochem. J.*, 1991, str. 703
- [10] Selyanin, M.A., Boykov, P.Y., Khabarov, V.N. Hyaluronic Acid: preparation, properties, application in biology and medicine. Chichester, West Sussex: John Wiley & Sons, Inc., 2015, p 198, ISBN: 978-1-118-63379-3
- [11] http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-001/hesla/polyelektrolyt.html
- [12] Jungwirth, P. Slaná voda, bílkoviny a pražský rodák Franz Hofmeister. *Vesmír*. 2010, č. 4, str. 224
- [13] Chaplin, M. „Hofmeister Series“. Water Structure and Science. *London South Bank University*, 2014.
- [14] Baldwin, R. L., How Hofmeister ion Interaction Affect Protein Stability. *Biophys. J.*, 1996 71:2056-2063.
- [15] Jungwirth, P. Molekuly a ionty v pohybu: Počítačové simulace biochemických a biofyzikálních procesů. *Chem.Listy*, 2014, 108, 278-284

- [16] Ingr, M. *Základy biofyziky* [přednáška]. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Fakulta technologická
- [17] http://www.ch.embnet.org/MD_tutorial/pages/MD.Part2.html
- [18] Jungwirth, P. *Klasická a kvantová molekulová dynamiky* [online prezentace]. 2006. Dostupné z http://www.molecular.cz/files/iocb_course_2006/md_pj.pdf
- [19] <https://www.metacentrum.cz/cs/>
- [20] Winter, W.T., Smith, P.J., Arnott S. Hyaluronic acid: structure of a fully extended 3-fold helical sodium salt and comparison with the less extended 4-fold helical forms. *J Mol Biol.* 1975 Dec 5;99(2):219-35.
- [21] Ivanov, D., Neamtu, A. Molecular dynamics evaluation of Hyaluronan interactions with dimethylsilanediol in aqueous solution. *Rev.Roum.Chim*, 2013, str. 229-238
- [22] Lee, S.H., Rasaiah, J.C. Molecular Dynamics Simulation of Ion Mobility. 2. Alkali Metal and Halide Ions Using the SPC/E Model for Water at 25 °C. *J. Phys. Chem.* 1996, 100, 1420-1425
- [23] Ponomarev, S.Y., Thayer, K.M., Beveridge, D.L. Ion motions in molecular dynamics simulations on DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101(41): 14771–14775.
- [24] Phillips, J.C., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., Chipot, Ch., Skeel, R.D., Kale, L., Schulten, K. Scalable molecular dynamics with NAMD. *J. Comput. Chem.*, 2005, 26:1781-1802.
- [25] Brooks, B.R., Brucoleri, R.E., Olafson, B. D., States, D. J., Swaminathan, S., Karplus, M. CHARMM: A Program for Macromolecular Energy, Minimization, and Dynamics Calculations, *J. Comp. Chem.* 4, 187-217 (1983)
- [26] Humphrey, W., Dalke, A. and Schulten, K., „VMD - Visual Molecular Dynamics“, *J. Molec. Graphics*, 1996, vol. 14, pp. 33-38.
- [27] <http://www.chemistry.sjsu.edu/deggers/Hofmeister.htm>
- [28] <http://boomeria.org/chemlectures/textass2/table10-9.jpg>
- [29] NAMD User's Guide Version 2.10. [online]. Dostupné z <http://www.ks.uiuc.edu/Research/namd/>

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

HA	Hyaluronan
MD	Molekulová dynamika
NMR	Nukleární magnetická resonance
Å	ångström(jednotka délky)
Da	dalton (jednotka molekulové hmotnosti)
$\hat{\mu}$	Aritmetický průměr
$\widehat{\sigma}_{\mu}$	Směrodatná odchylka průměru
ϕ	Valenční úhel
ψ	Dihedrální úhel
DMSD	Dimyethylsilandiol

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 – Struktura HA [6]	12
Obr. 2 – Sekundární struktura HA (1. Struktura skládaný list; 2. Rovinný pás převedený do šroubovice; 3. Dvoušroubovice) [10]	13
Obr. 3 – Hofmeisterova řada iontů vzhledem k proteinům [27].....	14
Obr. 4 – Hofmeisterova řada iontů vzhledem k vodě [13].....	15
Obr. 5 – Změny volné energie související s nahrazením draslíku sodíkem v kontaktním iontovém páru s Hofmeisterovou řadou aniontů. Horní čtyři anionty preferují sodík, dolní tři anionty preferují draslík, uprostřed jsou anionty bez výraznější preference [15].....	16
Obr. 6 – Základní princip výpočtu simulací [16]	19
Obr. 7 – Graf VDW potenciálu s a bez aplikace funkce cutoff [24]	20
Obr. 8 – Interakce DMSD (horní obrázek) a vody (dolní obrázek) s HA	21
Obr. 9 – Konformace řetězků HA ze simulací a experimentů [21]	22
Obr. 10 – β anomer [1]	22
Obr. 11 – Závislost ψ na ϕ u anomeru β [1]	23
Obr. 12 – Závislost mobility na krysi.iontových poloměrech [22].....	24
Obr. 13 – Závislost průměrné doby interakce sodných iontů s jednotlivými bázemi DNA (trojúhelníčky pro jeden řetízek DNA, čtverečky pro druhý řetízek). Horní obrázek pro 14 ns a spodní pro 60 ns simulace (z obrázku je patrné, že interakce iontů s DNA se ustálila až po delší době) [23]	25
Obr. 14 – Dvojřetítek HA.....	27
Obr. 15 – (detail Obr. 14) Propojení dvojřetězku HA pomocí vodíkových vazeb (černé úsečky); 4 fixované atomy uhlíku jsou znázorněny pomocí VDW poloměrů....	28
Obr. 16 – Závislost součtů Ca^{2+} iontů v těsné blízkosti jednotlivých vytipovaných skupin HA na čase.....	29
Obr. 17 – Místa nejčastější interakce iontů s molekulou HA.....	30
Obr. 18 – Znázornění šestic monosacharidových jednotek na dvou různých místech HA	31
Obr. 19 – Aritmetické průměry celkových počtů iontů v těsné blízkosti HA.....	33
Obr. 20 – Aritmetické průměry součtu iontů v těsné blízkosti jednotlivých vytipovaných skupin na HA	33
Obr. 21 – Závislost součtu jednomocných iontů v těsné blízkosti jednotlivých vytipovaných skupin HA na čase (od shora Na^+ , K^+ , Cs^+).....	34
Obr. 22 – Závislost součtu dvoumocných iontů v těsné blízkosti jednotlivých vytipovaných skupin HA na čase (od shora Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+}).....	34
Obr. 23 – Interakce sodných kationtů (žlutě) s HA do vzdálenosti 3Å od 12 monosacharidových jednotek HA	35
Obr. 24 – Interakce cesných kationtů (modře) s HA do vzdálenosti 3Å od 12 monosacharidových jednotek HA	35

Obr. 25 – Interakce vápenatých kationtů (modře) s celým řetízkem HA na vytipované skupině C6 do 3Å	36
Obr. 26 – Interakce hořečnatých kationtů (červeně) s celým řetízkem HA na vytipované skupině C6 do 3Å	36
Obr. 27 – Hodnoty z/r^3 pro jednotlivé kationty	37
Obr. 28 – Hofmeisterova řada iontů vzhledem k vodě (Zn^{2+} se řadí mezi Ca^{2+} a Mg^{2+}) [13]	37
Obr. 29 – Procentuální zastoupení sodných kationtů na 8 vytipovaných skupinách HA	38
Obr. 30 – Procentuální zastoupení draselných kationtů na 8 vytipovaných skupinách HA	39
Obr. 31 – Procentuální zastoupení cesných kationtů na 8 vytipovaných skupinách HA	39
Obr. 32 – Procentuální zastoupení vápenatých kationtů na 8 vytipovaných skupinách HA	40
Obr. 33 – Procentuální zastoupení zinečnatých kationtů na 8 vytipovaných skupinách HA	41
Obr. 34 – Procentuální zastoupení hořečnatých kationtů na 8 vytipovaných skupinách HA	41
Obr. 35 – Aritmetické průměry počtu vodíkových můstků na samotné HA a jejich směrodatné odchylky	42
Obr. 36 – Aritmetické průměry počtů vodíkových můstků mezi HA a vodou	43
Obr. 37 – Aritmetické průměry délek šestice monosacharidových jednotek na dvou různých úsecích HA.....	44
Obr. 38 – Aritmetické průměry délek šestice monosacharidových jednotek na HA pro třetí kontrolní měření.....	45

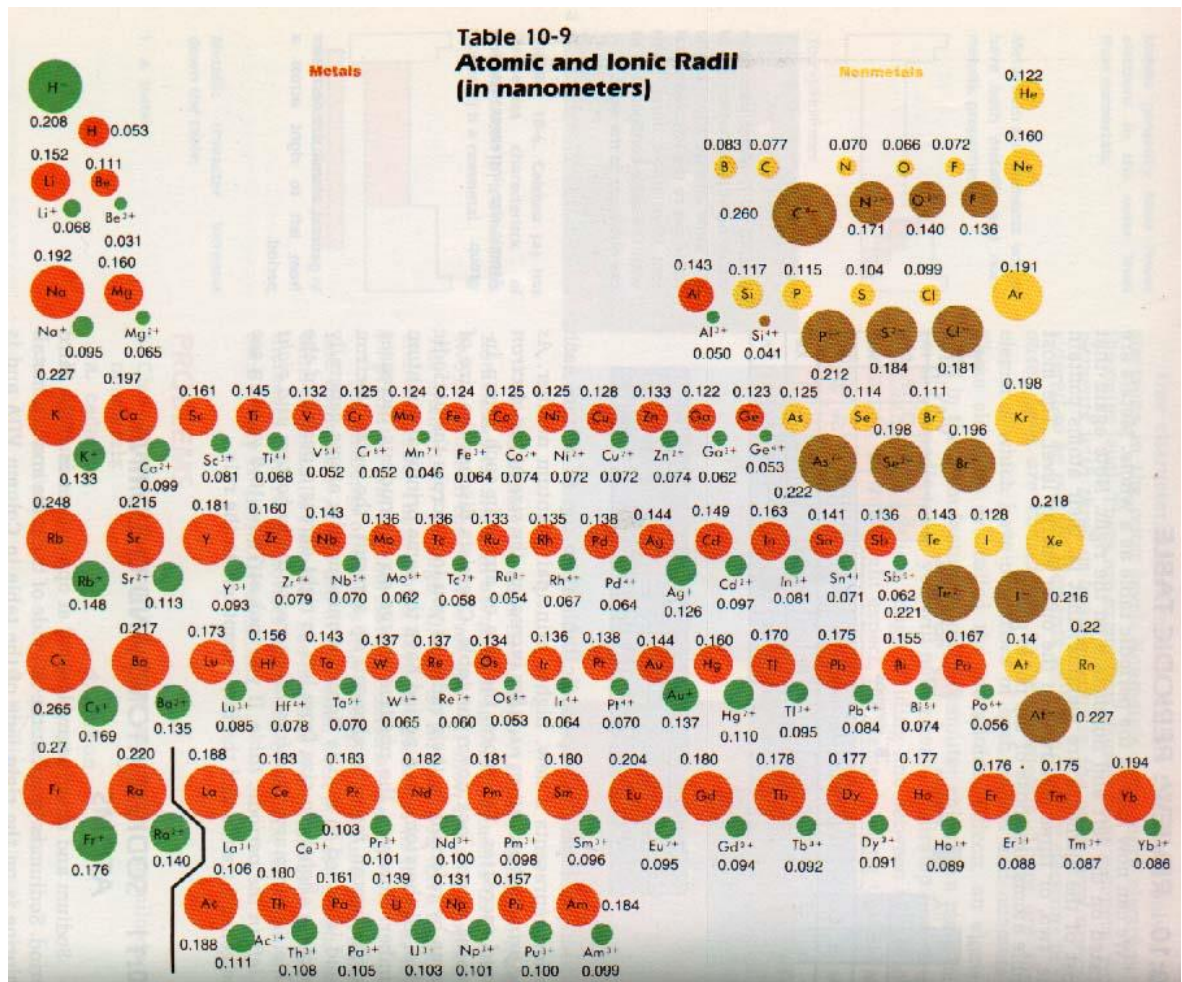
SEZNAM TABULEK

Tab. 1 – Aritmetické průměry celkových počtů iontů v těsné blízkosti HA (μ) a jejich směrodatné odchyly ($\sigma\mu$)	32
Tab. 2 – Aritmetické průměry součtu iontů v těsné blízkosti jednotlivých vytipovaných skupin na HA (μ) a jejich směrodatné odchyly ($\sigma\mu$)	33
Tab. 3 – Výpočet z/r^3 pro jednomocné ionty.....	37
Tab. 4 – Výpočet z/r^3 pro dvoumocné ionty.....	37
Tab. 5 – Aritmetické průměry počtů vodíkových můstků mezi samotnou HA (μ) a jejich směrodatné odchyly ($\sigma\mu$).....	42
Tab. 6 – Aritmetické průměry počtů vodíkových můstků mezi HA a vodou (μ) a jejich směrodatné odchyly ($\sigma\mu$)	43
Tab. 7 – Aritmetické průměry délek šestice monosacharidových jednotek na dvou různých úsecích HA (μ) a jejich směrodatné odchyly ($\sigma\mu$)	44
Tab. 8 – Aritmetické průměry délek šestice monosacharidových jednotek na HA (μ) a jejich směrodatné odchyly ($\sigma\mu$) pro třetí kontrolní měření	45

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha P I: Tabulka atomových a iontových poloměrů	55
Příloha P II: TCL SCRIPT	55
Příloha P III: Konfigurační soubor .NAMD	56

Příloha P I: Tabulka atomových a iontových poloměrů [28]



Příloha P II: TCL SCRIPT

```

set outfile [open K_3AO2.dat w];
set nf [molinfo top get numframes]
set sel [atomselect top "ion name POT and (within 3 of segname
O2)"]
# loop
for {set i 0} {$i < $nf} {incr i} {
    $sel frame $i
    $sel update
    puts $outfile "[$sel num]"
}
close $outfile

```

Příloha P III: Konfigurační soubor .NAMD

```
structure          /storage/brno6/home/v_bus/K/2wild_K_1M.psf
coordinates        /storage/brno6/home/v_bus/K/2wild_K_1M.pdb

set temperature    310
set outputname    /storage/brno6/home/v_bus/K/2wild_K_1M

firsttimestep      0

# Input
paraTypeCharmm    on
parameters        /storage/brno6/home/v_bus/par_top.inp
temperature        $temperature

# Force-Field Parameters
exclude           scaled1-4
1-4scaling        1.0
cutoff            10.0
switching         on
switchdist        8.0
pairlistdist      12.0

# Integrator Parameters
timestep          1.0 ;# 1fs/step
rigidBonds        water
molly             on
nonbondedFreq     2
fullElectFrequency 6
stepspercycle     30

# Constant Temperature Control
langevin          on ;# do langevin dynamics
langevinDamping   1 ;# damping coefficient (gamma) of 1/ps
langevinTemp      $temperature
langevinHydrogen off ;# don't couple langevin bath to hydrogens

# Periodic Boundary Conditions
cellBasisVector1  161.8  0.0  0.0
cellBasisVector2  0.0  110.9  0.0
cellBasisVector3  0.0  0.0  187.2
cellOrigin         75.4  39.7  -50.5

wrapWater         on
wrapAll           on

# PME (for full-system periodic electrostatics)
PME               yes
PMEGridSpacing    1.0

# Constant Pressure Control (variable volume)
useGroupPressure  yes ;# needed for rigidBonds
useFlexibleCell   no
useConstantArea   no
```



```
langevinPiston      on
langevinPistonTarget 1.01325 ;# in bar -> 1 atm
langevinPistonPeriod 100.0
langevinPistonDecay 50.0
langevinPistonTemp  $temperature

# Output
outputName          $outputname

restartfreq         900000
dcdfreq            1800
xstFreq            1800
outputEnergies     1800
outputPressure     1800

# Minimization
minimize            180
reinitvels         $temperature

run 9000000 ;#9ns
```