

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální chemie

Konformační vlastnosti nukleových kyselin

Bakalářská práce

Autor:

Vendula Tichavská

Studijní program:

B1407 Chemie

Studijní obor:

Aplikovaná chemie

Forma studia:

Prezenční

Vedoucí práce:

doc. RNDr. Petr Jurečka, Ph.D.

Olomouc 2016

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora:

Vendula Tichavská

Název práce:

Konformační vlastnosti nukleových kyselin

Typ práce:

bakalářská

Pracoviště:

Katedra fyzikální chemie

Vedoucí práce:

doc. RNDr. Petr Jurečka, Ph.D.

Rok obhajoby:

2016

Abstrakt:

Cílem této práce bylo studium chování vybraných motivů nukleových kyselin, konkrétně motivu Loop E a RNA pseudouzlu. Struktury jsou popisovány pomocí molekulové dynamiky, která teoreticky popisuje chování biomolekul. U obou motivů jsme se zaměřili na celkovou stabilitu a dále zejména na α/γ stavy a jejich korelaci s přítomnými hořčnatými kationty a nekanonickými vodíkovými vazbami. Simulace byly realizovány v nejnovějších modifikacích silových polí, srovnání chování v jednotlivých polích je další cíl této práce.

Klíčová slova:

Nukleové kyseliny, RNA, Loop E, pseudouzel, molekulová dynamika

Počet stran:

52

Jazyk:

čeština

Bibliographical identification

Author's first name and surname:	Vendula Tichavská
Title:	Conformational properties of nucleic acids
Type of thesis:	bachleor
Department:	Department of Physical Chemistry
Supervisor:	doc. RNDr. Petr Jurečka, Ph.D.
The year of presentation:	2016
Abstract:	The aim of this study was to study behaviour of selected motifs of nucleic acids, specifically Loop E and an RNA pseudoknot. Structures were described by molecular dynamics, which in theory describes the behavior of biomolecules. For both motifs, we focused on the overall stability and in particular the α/γ backbone states and their correlation with present magnesium cations and noncanonical hydrogen bonds. Simulations were carried out in the most recent force fields modifications and comparison of the behavior of the individual fields is another goal of this work.
Keywords:	Nucleic acids, RNA, Loop E, pseudoknot, molecular dynamics
Number of pages:	52
Language:	czech

Tímto bych chtěla velice poděkovat doc. Petru Jurečkovi, Ph.D. za veškerou pomoc a odborné rady, které mi byly velkou pomocí a přínosem. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Marii Zgarbové, Ph.D. za skvělý přístup po celou dobu tvoření mé práce. Poděkování patří také rodině za podporu během celé doby studia.

Prohlašuji, že jsem svou bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením doc. Petra Jurečky, Ph.D. a výhradě s použitím svých vědomostí a citovaných zdrojů.

V Olomouci dne:

Podpis

OBSAH

1. ÚVOD.....	6
2. TEORETICKÁ ČÁST	7
2.1 RNA.....	7
2.1.1 Primární struktura RNA.....	9
2.1.2 Párování bází RNA.....	10
2.1.3 Sekundární a terciární struktura RNA	12
2.1.4 Ribozomy	12
2.1.5 Loop E	14
2.1.6. Pseudouzel.....	15
2.2 Teoretická chemie.....	17
2.2.1 Molekulová dynamika	17
2.2.2 Potenciální energie	17
2.2.2.1 Torzní úhly	18
2.2.3 Explicitní a implicitní rozpouštědlo	19
2.2.4 Silová pole	19
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	22
3.1 Cíle práce.....	22
3.2 Metody.....	22
3.3 Výsledky a diskuze.....	23
3.3.1 Loop E	23
3.3.2. Pseudouzel.....	37
4. ZÁVĚR.....	40
5. SUMMARY	42
6. LITERATURA	44
7. PŘÍLOHY	50
8. SEZNAM ZKRATEK	52

1. ÚVOD

Nukleové kyseliny jsou přítomny ve všech živých organismech a život bez nich by nebyl možný. Rozlišujeme DNA (deoxyribonukleová kyselina) a RNA (ribonukleová kyselina). DNA je nositelkou genetické informace, RNA má funkci přenosu genetické informace z DNA do struktury bílkovin a u některých virů je samotnou nositelkou genetické informace. Tyto funkce je činí pro organismus nepostradatelnými.

RNA je oproti DNA mnohem méně prozkoumaná struktura a je stále větším terčem zájmu teoretických vědců. V posledních letech dochází k obrovskému vývoji v oblasti počítačové techniky, což umožňuje podrobněji zkoumat strukturu molekul a jejich dynamiku. Dochází k dalším modifikacím určitých parametrů silových polí a tak i ke zkvalitňování výsledků teoretických studií molekul. Většina nově vyvinutých silových polí pro nukleové kyseliny je určena a otestována hlavně pro molekulu DNA. V naší práci tato silová pole používáme i pro RNA s cílem zjistit, zda jsou vhodná a je-li potřeba nějaké parametry opravit.

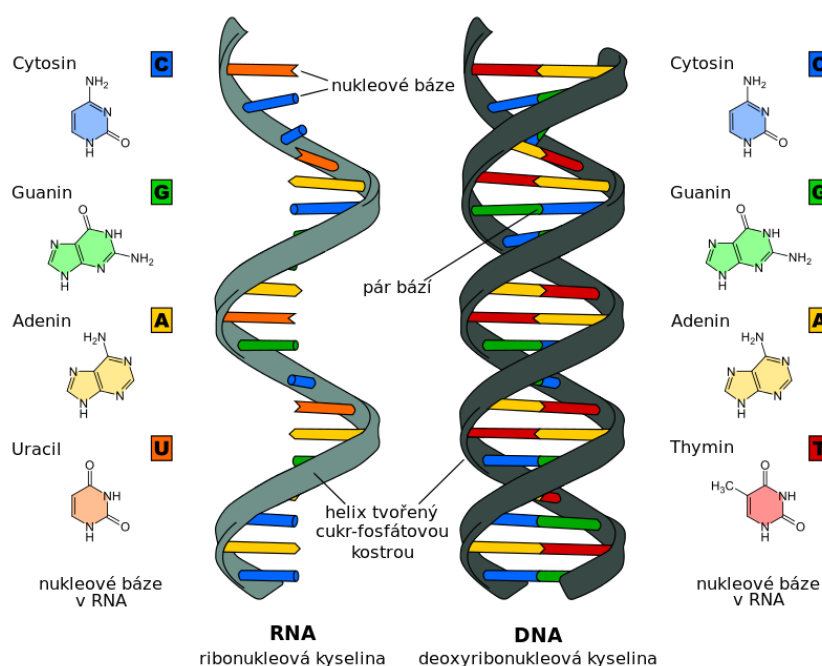
Hlavním cílem této práce je popis dynamického chování vybraných motivů RNA, konkrétně Loopu E a virálního pseudouzlu. Loop E je součástí 5S podjednotky, která tvoří spolu s dalšími molekulami RNA a proteiny velkou podjednotku ribozomu. 5S RNA podjednotka usnadňuje syntézu proteinů na velké ribozomální podjednotce a plní v ní zřejmě i další pomocné role. Všechny její funkce a s nimi spojené mechanismy ale zatím nejsou známy. Pseudouzly mají velký biologický význam a v naší práci se zajímáme o virální RNA pseudouzly BWYV, který má za úkol posun čtecího rámce. Konkrétně je v této práci řešena problematika celkové stability zmíněných molekul a jejich chování, jako jsou schopnost udržet hořčnaté ionty ve své krystalografické struktuře nebo konformace páteřních úhlů a jejich korelace s nekanonickými vodíkovými vazbami. Všechny zkoumané parametry byly zároveň srovnávány v různých silových polích. Použita byla pole $ff99parmbsc0\chi_{OL3}$, $ff99parmbsc0\chi_{OL3}\epsilon\zeta_{OL1}$, $ff99parmbsc0\chi_{OL3}\epsilon\zeta_{OL1}\beta_{OL1}$ a $ff99parmbsc1$, která se od sebe liší torzními parametry. Hlavním předmětem předložené práce je, zda některé ze silových polí umí daný systém popsat lépe, než jiné.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 RNA

Nukleové kyseliny jsou makromolekulární látky tvořené polynukleotidovými řetězci, jejichž základní funkcí je uchovávání genetické informace. Schopnost replikace je jejich nejdůležitější vlastností a díky svému složení se řadí mezi biopolymery. Vyskytují se ve všech buňkách a virech. Rozlišujeme dva typy nukleových kyselin. Prvním typem je deoxyribonukleová kyselina, označována zkratkou DNA. Je obsažena především v jádře a mitochondriích, u rostlin v chloroplastech. Druhým typem je ribonukleová kyselina, tedy RNA, která zajišťuje realizaci genetické informace a vyskytuje se především v ribozomech a cytoplazmě. Nukleové kyseliny jsou složeny ze tří základních částí - z nukleových bází, cukerné složky a ze zbytku kyseliny fosforečné. Rozdíl u těchto dvou nukleových kyselin je v cukerné složce a v jedné ze čtyř bází (viz Obrázek 1). [1]

Obrázek 1. Rozdíl mezi RNA (vlevo) a DNA (vpravo). (Převzato z [2])



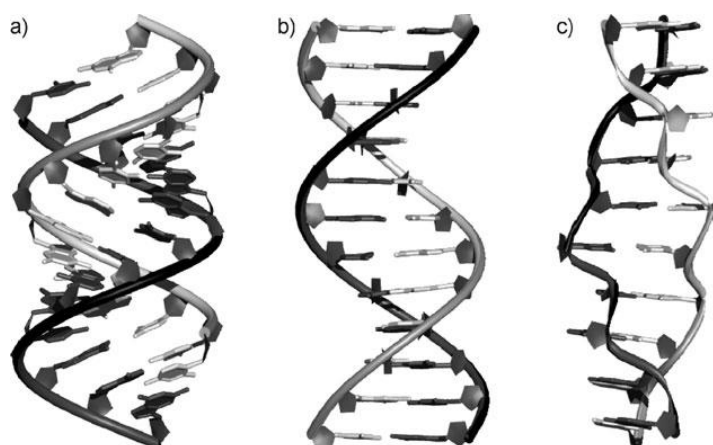
První zmínka o RNA se datuje již k roku 1868, kdy švýcarský lékař a přírodovědec J. F. Miescherem poprvé izoloval nukleon, což byla směs DNA a RNA. Avšak podrobněji popsána byla RNA až začátkem 20. století. [3]

Rozeznáváme tři základní typy RNA. První z nich je mRNA (messenger), zvaná také jako informační, což je molekula vytvořená transkripcí. Má za úkol přenos informace o pořadí

jednotlivých aminokyselin z jádra do cytosolu, kde probíhá proteosyntéza. [4] Informační RNA tvoří pouze 4% z celkové buněčné RNA. Dalším typem je tRNA (transferová RNA), která je složena ze 70-90 nukleotidů a její funkcí je přenos aminokyseliny na proteosyntetický aparát buňky. Tento typ obsahuje trojici nukleotidů (antikodon) umožňující navázání tRNA na trojici bází (kodon) na molekule mRNA. Třetí typ je ribozomální rRNA, kterou je tvořena složka ribozomálních podjednotek, na kterých probíhá proteosyntéza.[5][6]

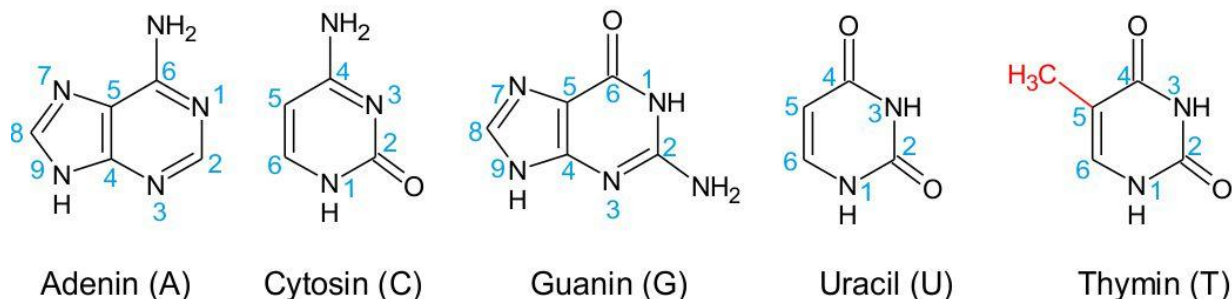
Nukleové kyseliny se vyskytují v různých konformacích. Na rozdíl od DNA, které se mohou vyskytovat hlavně v A-DNA, B-DNA a Z-DNA formách (viz Obrázek 2), se dvoušroubovicová RNA může vyskytovat pouze v A-RNA formě. A-forma a B-forma jsou pravotočivé formy dvoušroubovice ovšem s rozdílem tvaru, kdy A-forma má užší velký žlábek a širší malý žlábek, zatímco B konformace má širší velký žlábek a užší malý žlábek. Levotočivá forma je označována písmenem Z. Z-DNA je, stejně jako B-DNA, antiparalelní a spojena Watson-Crickovským (viz kapitola Primární struktura) párováním. Rozdíl je v tom, že u levotočivé formy se báze střídají v anti a syn konformaci, zatímco u pravotočivé je pouze konformace anti.[4][7]

Obrázek 2. Konformace nukleových kyselin. Zleva: A-forma (jediná RNA-konformace), B-forma, Z-forma. (Převzato z [8])



Ribonukleová kyselina se od deoxyribonukleové liší cukernou složkou, kterou obsahuje. Další rozdíl je v nukleových bázích. Obecně rozdělujeme tyto aromatické heterocyklické sloučeniny na purinové, mezi které patří adenin (A) a guanin (G) a pyrimidinové, ke kterým přiřazujeme uracil (U), cytosin (C) a thymin (T) (viz Obrázek 3). V RNA molekulách se vyskytují pouze báze A, U, C, G, zatímco u DNA báze A, T, C, G.

Obrázek 3. Strukturní vzorce, názvy a zkratky jednotlivých nukleových bází. Modře je vyznačeno číslování jednotlivých atomů. Thymin, na rozdíl od uracilu, má v poloze 5 navázanou methylovou skupinu, která je vyznačena červeně. (Vytvořeno programem Chemscketch)



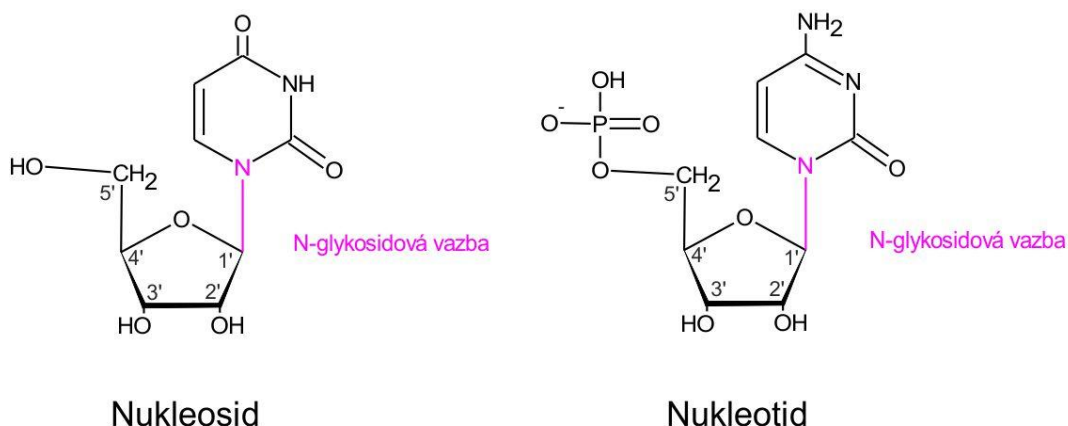
2.1.1 Primární struktura RNA

Základním kamenem RNA jsou nukleotidy a jejich sekvence, které tvoří primární strukturu nukleových kyselin. Nukleotidy jsou složeny z cukru, fosfátu a heterocyklické báze. Je-li molekula tvořena pouze cukrem a bází, hovoříme o nukleosidu (viz Obrázek 5). [9] Spojení jednotlivých nukleotidů je zprostředkováno pomocí 3',5'-fosfodiesterových vazeb, pomocí kterých dochází ke spojení mezi 3' uhlíkem jednoho sacharidu a 5' uhlíkem sacharidu následujícího.

Sacharid, který je obsažen v RNA, se nazývá ribóza, neboli β -D-ribofuranosa. Ta ve své molekule obsahuje, na rozdíl od DNA, 2'-OH skupinu, což způsobuje, že je RNA méně stabilní, než DNA. Zbytek kyseliny fosforečné (H_3PO_4) se nazývá fosfát a tvoří kyselou část molekuly. Zásaditou část tvoří pyrimidinová či purinová báze (A, U, C, G). Vazba mezi bází a ribózou se nazývá N-glykosidová vazba (viz Obrázek 4). [4]

U DNA platí Chargaffovo pravidlo, které nám říká, že počet purinových bází v molekule odpovídá počtu bází pyrimidinových ($\text{A}=\text{T}$, $\text{C}=\text{G}$). Jelikož RNA netvoří vždy dvoušroubovici, nemusí tak obsahovat stejné počty $\text{A}=\text{T}$ a $\text{C}=\text{G}$ a Chargaffovo pravidlo tak pro RNA molekuly neplatí.[1]

Obrázek 4. Fialově vyznačeny N-glykosidové vazby v nukleosidu (vlevo) a v nukleotidu (vpravo). (Vytvořeno programem Chemscketch)

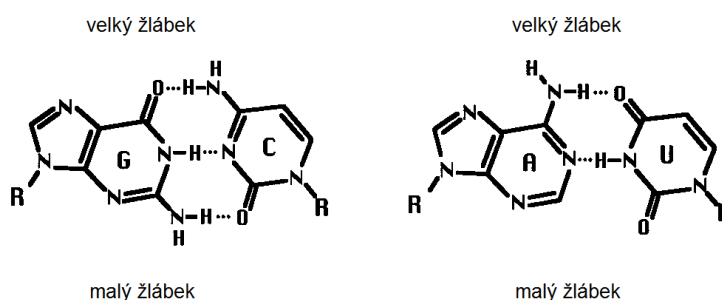


2.1.2 Párování bází RNA

RNA je většinou jednovláknová struktura, ale za určitých podmínek se může vyskytovat jako A-RNA, čímž je označovaná dvoušroubovice této nukleové kyseliny. Koncový nukleotidový zbytek, jehož C5' není dále již vázán se nazývá 5'konec. Analogicky 3'konec. Sekvence nukleotidů v nukleové kyselině se píše zleva doprava od 5'konce ke 3'konci. Rozlišujeme dvojí párování a to kanonické a nekanonické.

Kanonické párování bází je tzv. Watson-Crickovo (WC) (viz Obrázek 5), které bylo popsáno v 50. letech 20. století vědci Watsonem a Crickem. Je založeno na tom, že se vždy páruje purinová báze a pyrimidinová. Konkrétně může být párován guanin s cytosinem a adenin s uracilem. V případě páru A-U je vazba uskutečněna pomocí dvou vodíkových můstků, v případě G-C jsou využity 3 vodíkové můstky. Sekvence nukleotidů takto spojených se nazývají komplementární. [10]

Obrázek 5. Kanonické párování bází RNA, přerušovanou čarou jsou zvýrazněny vodíkové vazby. (Převzato a upraveno z [11])

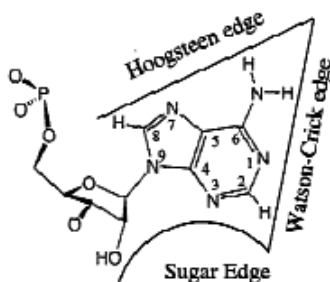


Kromě WC párování bází je známo i jiné, nekanonické, párování bází. Je to jakékoli jiné párování bází, než Watson Crickovo (jiný počet vodíkových vazeb mezi danými nukleotidy). Nukleové báze si představujeme tak, že obsahují tři strany - Hoogsteenovu (H), Watson-Crickovu (WC) a stranu cukru (SE) (viz Obrázek 6). Tyto báze k sobě mohou být přiřazeny jinými bázemi ze všech tří stran. Mimo interakce těchto tří stran je zohledňována také orientace báze, přesněji orientace glykosidické vazby. Upořádání trans je takové uspořádání, kde glykosidické vazby leží na opačných stranách linie kolmé na pár bází. Pokud jsou glykosidické vazby nukleotidů na stejné straně linie, hovoříme o orientaci cis. Celkem rozlišujeme 12 rodin párování bází (viz Tabulka 1). [12][13]

Tabulka 1. Klasifikace párování hran bází. (Převzato a upraveno z [12])

Číslo rodiny	Interagující hrany	Orientace glykosidické vazby	Symbol interakce
1	WC/WC	Cis	
2	WC/WC	Trans	
3	WC/H	Cis	
4	WC/H	Trans	
5	WC/SE	Cis	
6	WC/SE	Trans	
7	H/H	Cis	
8	H/H	Trans	
9	H/SE	Cis	
10	H/SE	Trans	
11	SE/SE	Cis	
12	SE/SE	Trans	

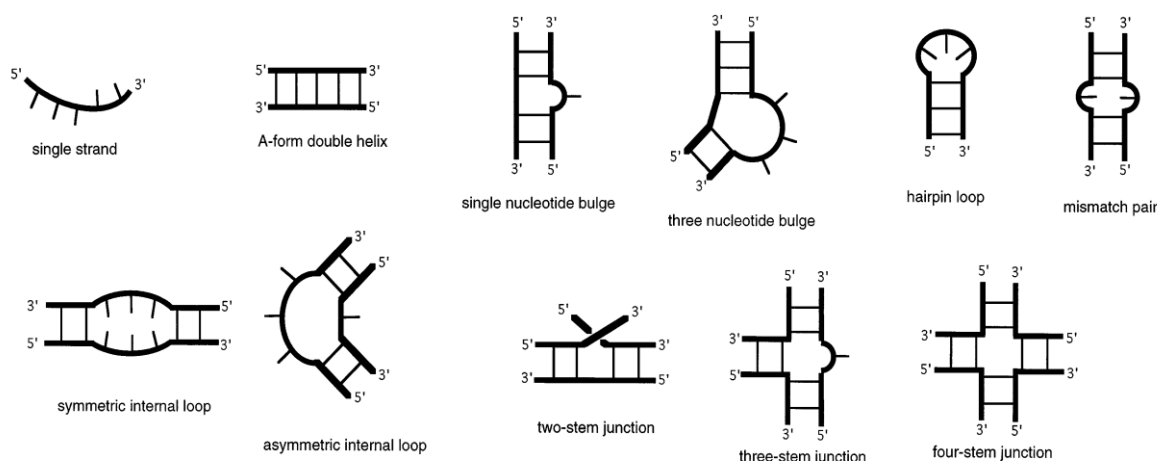
Obrázek 6. Grafické znázornění jednotlivých hran u purinové báze. (Převzato z [12])



2.1.3 Sekundární a terciární struktura RNA

Polynukleotidové řetězce a jejich uspořádání vytváří sekundární struktury RNA molekul (viz Obrázek 7). Tyto polynukleotidové řetězce mohou být uspořádány do šroubovic nebo smyček, konkrétně do dvojité šroubovice (duplex), jednovláknové oblasti (single-stranded regions), vlásenek (hairpins), vnitřních smyček (internal loops), vydutých a zakřivených oblastí (bulges) a uzlů (junction). [14] Základním typem u RNA je dvojitá šroubovice v A formě, která se skládá ze dvou řetězců, které jsou vůči sobě orientovány antiparalelně. Na povrchu této šroubovice je malý a velký žlábek, které se od sebe liší šířkou a hloubkou z důvodu nesouměrnosti glykosidických vazeb (viz také kapitola 2.1). Ve žlábcích se vážou anorganické sloučeniny nebo biomolekuly.

Obrázek 7. Motivy sekundární struktury RNA. (Převzato z [11])



Interakcí mezi odlišnými sekundárními motivy, spojování dvoušroubovic, interakce mezi nespárovanými regiony, nebo mezi dvoušroubovicemi a nespárovanými regiony vzniká terciární struktura. [14] Jmenované systémy mohou vytvářet různé motivy, které nejsou pro všechny RNA molekuly jednotné. Dnes stále existuje řada motivů, které nejsou detailně popsány a neznáme jejich přesnou funkci a význam. Tato a obdobné studie se snaží popsat tyto neobjasněné vlastnosti.

2.1.4 Ribozomy

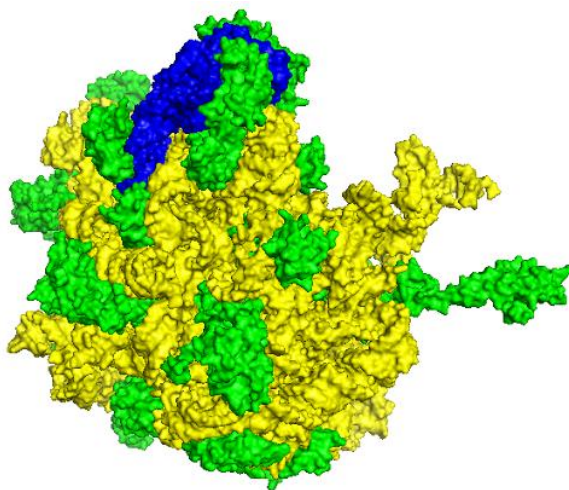
Ribozomy, neboli ribonukleoproteiny, jsou jedny z nejsložitějších komplexních struktur, přibližně kulovitého tvaru, skládající se asi ze dvou třetin z ribozomální rRNA a z jedné třetiny z bílkovinné složky. Za úplné objasnění funkce a struktury byla teprve v roce

2009 udělena Nobelova cena za chemii Venkatramanovi Ramakrishnanovi, Thomasi Steitzovi a Adě Jonatové. [15]

Ribozomy se vyskytují v cytoplazmě nebo na membránách granulového endoplazmatického retikula. Rozlišujeme je na prokaryotické a eukaryotické. Ribozomy těchto dvou typů buněk jsou si podobné, rozdíl mezi nimi je popisován sedimentačním koeficientem, což je veličina udávající čas, za který proběhne sedimentace ribozomu v ultracentrifuze. [16] Oba dva typy jsou tvořeny dvěma podjednotkami – malou a velkou. Prokaryotická malá podjednotka se na základě této veličiny označuje jako 30S, velká podjednotka jako 50S (viz Obrázek 8). U eukaryotických podjednotek je to 40S resp. 60S. [16][17]

Funkce jednotlivých podjednotek jsou přesně dány. Malá podjednotka prokaryontního ribozomu se skládá z 21 bílkovinných složek a jedné molekuly RNA o velikosti 1600 nukleotidů. Označuje se zkratkou 16S RNA. Je využita při zachycení příslušné tRNA a její nasednutí na mRNA. Velká podjednotka se skládá z 33 proteinů, z jedné větší molekuly RNA složené z 2900 nukleotidů, která je označována zkratkou 23S RNA a z jedné menší molekuly (5S RNA), složené ze 120 nukleotidů (viz Příloha 1). Úkol této podjednotky je vznik peptidové vazby mezi aminokyselinami, tedy vazby ve vznikajícím polypeptidu. Hlavní funkcí ribozomů je syntéza proteinů, které jsou pro buňku nezbytné. Na začátku syntézy dochází ke spojení malé a velké podjednotky (vznik 70S ribozomu). Rozdělení těchto podjednotek a rozpad ribozomu je považován za ukončení procesu syntézy bílkovin. [18][19]

Obrázek 8. Velká ribozomální podjednotka 50S bakterie E.coli. Zeleně jsou vyznačeny proteiny, žlutě tRNA a modře studovaná 5S rRNA. (Vytvořeno programem Pymol, PDB kód: 2AW4).



2.1.5 Loop E

Jak již bylo zmíněno v předchozí kapitole, 5S rRNA tvoří nedílnou část velké ribozomální prokaryotické podjednotky. Skládá se z pěti helixů (I-V), dvou vlásenkových smyček (C a D), dvou vnitřních smyček (B a E) a kloubového regionu (A) (viz Příloha 2). Tato podjednotka se liší u eubakterií a archeí/eukaryot, a to s rozdílem zejména v motivu Loop E. V obou případech jsou jednovláknové oblasti na 5' a 3' konci motivu párovány mezi sebou a tvoří dobře definované terciární struktury složené z nekanonických párů bází. V eubakteriích mají obě strany smyčky stejnou délku. V archeích a eukaryotech se strany v délce liší o jeden nukleotid. [19]

Rentgenová krystalografie [20] a NMR analýza [21] odhalily, že motiv Loop E je symetrický motiv skládající se ze sedmi po sobě jdoucích nekanonických párů bází (viz Obrázek 9). Původní rentgenová struktura tohoto motivu obsahuje pět Mg^{2+} kationtů vázaných ve velkém žlábků, které interagují s bázemi a aniontovými fosfátovými kyslíky a stabilizují molekulu. Tři z pěti hořečnatých kationtů interagují přímo s RNA atomy (tzv. inner-shell vazba), zbývající dva interagují s molekulami vody (tzv. outer-shell vazba). [22]

Motiv Loop E v ribozomální podjednotce slouží jako rozpoznávací místo pro interakci RNA-protein a hraje klíčovou roli při uspořádání vícehelixového křížení (tzv. multihelix junction). Podobná role byla zjištěna pro interakci RNA-RNA pro motiv Loop E u hairpin ribozymu. [23] Několik motivů Loop E má výjimečnou náchylnost k meziřetězcovému UV indukovanému propojení mezi některými guaninovými a uridinovými rezidui. [24]

Obrázek 9. Struktura motivu Loop E. Modře jsou vyznačeny cukry s navázanými bázemi. Fialovými koulemi jsou vyznačeny hořčíky. (Vytvořeno programem Pymol, PDB kód: 354D)



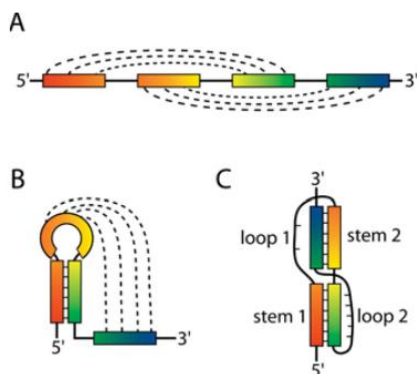
Motiv Loop E byl pomocí MD studován již dříve, se zaměřením na nekanonické párování, pevně vázané molekuly vody a pozice hořčkových iontů. [25][26] V práci Auffinger a kol. byl model zpřesněn stanovením obsazovacích faktorů Mg 4A a Mg 4B v poměru 1:2. [26] V předložené práci jsou ke studiu chování tohoto motivu použita nejnovější modifikovaná silová pole, která při předešlých studiích ještě neexistovala. Časové škály simulací jsou podstatně delší, než v zmínovaných studiích.

2.1.6. Pseudouzel

Další studovanou strukturou je terciární motiv pseudouzel (pseudoknot). Již v roce 1982 byl v tzv. viru žluté mozaiky vodnice (TYMV, turnip yellow mosaic virus) pseudouzel popsán jako struktura RNA, která se skládá minimálně ze dvou helikálních segmentů spojených jednovláknovou oblastí nebo smyčkou. [27]

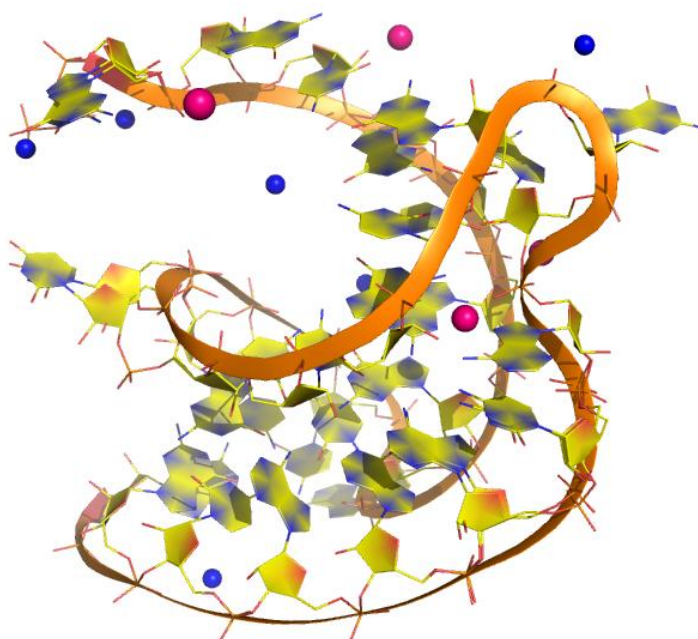
Existuje několik typů pseudouzlů, nejlépe je však charakterizován typ H. V H-typu tvoří báze ve smyčce vlásenky intramolekulární páry s bázemi mimo stem. To způsobuje utvoření druhého stemu a smyčky, což má za následek vznik pseudouzlu se dvěma stemy a dvěma smyčkami. Dva stemy jsou schopny se na sebe skládat, aby vytvořily jakoby souvislou šroubovici s jedním spojitým a jedním nespojitým vláknem. Tyto oblasti jednovláknových regionů často interagují se sousedními stemy (smyčka 1-stem 2 nebo smyčka 2-stem 1) k vytvoření vodíkových vazeb a k podílení se na celkové struktuře molekuly (viz Obrázek 10). Toto skládání může poskytnout velmi složité a stabilní RNA struktury. [28]

Obrázek 10. Stavba RNA pseudouzlu. (A) Lineární uspořádání prvků párování bází pro RNA pseudouzel typu H. Přerušovanými čarami je vyznačeno párování bází. (B) Formování počáteční vlásenky v sekvenci pseudouzlu. Přerušovanými čarami jsou vyznačena párování z loopu k bázím mimo vlásenku. (C) Klasické složení pseudouzlu typu H. (Převzato a upraveno z [28])



Pseudouzel hraje celou řadu různých rolí v biologii. Příkladem je ribozomální „frameshifting“, což je mechanismus, při kterém dochází k vytvoření lokálního triplexu měnícího čtecí rámec, který umožňuje rozdíly v translaci mRNA. [29] Tento mechanismus je využíván viry, bakteriemi, kvasinkami a dále při vkládání DNA sekvenční. Struktura pseudouzlu hraje důležitou roli v lidské telomerázové RNA, která se ukládá do všech obratlovců a má zásadní význam pro telomerázovou aktivitu. [30] V této práci popisujeme chování motivu v „beet western yellow virus“ (BWYV). Ten se skládá z jediného řetězce A a je složen z 28 po sobě jdoucích nukleotidů. Ve své struktuře má navázáno pět hořečnatých, 3 sodné a jeden draselný ion (viz Obrázek 11). I tento pseudouzel a jeho mutace byly již dříve studovány metodou molekulové dynamiky se zaměřením na počáteční fáze jeho rozbalování. [31]

Obrázek 11. Schéma sekundární struktury BWYV pseudouzlu. Žluto-modře jsou vyznačeny cukry s navázanými bázemi, modrými koulemi jsou vyznačeny hořčíky a růžovými koulemi sodíky a draslíky. (Vytvořeno programem Pymol, PDB kód: 1L2X)



2.2 Teoretická chemie

Teoretická (výpočetní) chemie je vědní obor zabývající se teoretickými studii různých molekul, včetně biomolekul. K získání požadovaných dat (energie vazeb, tranzitních stavů, vibrační frekvence, molekulové orbitály,...) se využívají molekulární modelování a počítačové simulace. [32] Počítačová simulace umí popsat strukturu a dynamiku na atomární úrovni, což nás dále informuje o funkci molekul. Počítačové modelování a simulace nám poskytují i další důležité informace o konkrétním systému a mohou být vhodným doplňkem k experimentálním metodám.

2.2.1 Molekulová dynamika

V mé práci je ke studiu molekul používána molekulová dynamika (MD). Tato metoda popisuje vývoj (pohyb) studovaného systému v čase. Hlavním rysem molekulové dynamiky je použití silového pole, jehož podstatou je funkce potenciální energie. K výpočtům se využívají klasické zákony Newtonovské fyziky.

U MD se využívá fakt, že atomová jádra jsou mnohem těžší než elektrony, což ve výsledku způsobí oddělení dynamiky jader a elektronů. Oddělení pohybu elektronů a jader se nazývá Born-Oppenheimerova aproximace. V silovém poli nesou atomy parciální náboj, který je umístěn v jeho středu. Poloměr těchto atomů je popisován Van der Waalsovým potenciálem, který působí mezi atomy. Celý systém má tak energii, která je funkcí pozic jednotlivých atomů (viz rovnice 1).

$$E = f(R) \quad (1)$$

2.2.2 Potenciální energie

V silovém poli se celková energie vypočítá jako suma všech vazebných interakcí, mezi které patří délka vazby (E_b), vazebné úhly (E_a) a torzní úhly (E_t) a nevazebných interakcí, jež zahrnují van der Waalsovy (E_{vdw}) a Coulombické neboli elektrostatické síly (E_C). (viz rovnice 2). [33]

$$E_{pot} = \sum E_b + \sum E_a + \sum E_t + \sum E_{vdw} + \sum E_C \quad (2)$$

Energie vazeb a vazebných úhlů lze spočítat dle rovnic (viz rovnice 3). Jedná se o závislost na druhé mocnině odchylky z rovnovážné polohy.

$$E_b = \sum K_r (r - r_0)^2 \quad E_a = \sum K (\alpha - \alpha_0)^2 \quad (3)$$

Elektrostatickou energii vyjadřujeme jako interakci dvou parciálních nábojů (viz rovnice 4).

$$E_C = \sum_{i < j} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \quad (4)$$

E_C má v čitateli součin parciálních nábojů atomů $q_i q_j$ a ve jmenovateli pak permitivitu vakua ϵ_0 a vzdálenost atomů r_{ij} .

Van der Waalsova interakční energie je popsána Lennard-Jonesovým potenciálem (viz rovnice 5)

$$E_{Vaw} = \sum_{i < j} \epsilon_{ij} \left[\left(\frac{R_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left(\frac{R_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad (5)$$

Přičemž ϵ_{ij} je hloubka potenciálové jámy, r_{ij} vzdálenost dvou atomů a R_{ij} značí rovnovážnou vzdálenost.[34]

2.2.2.1 Torzní úhly

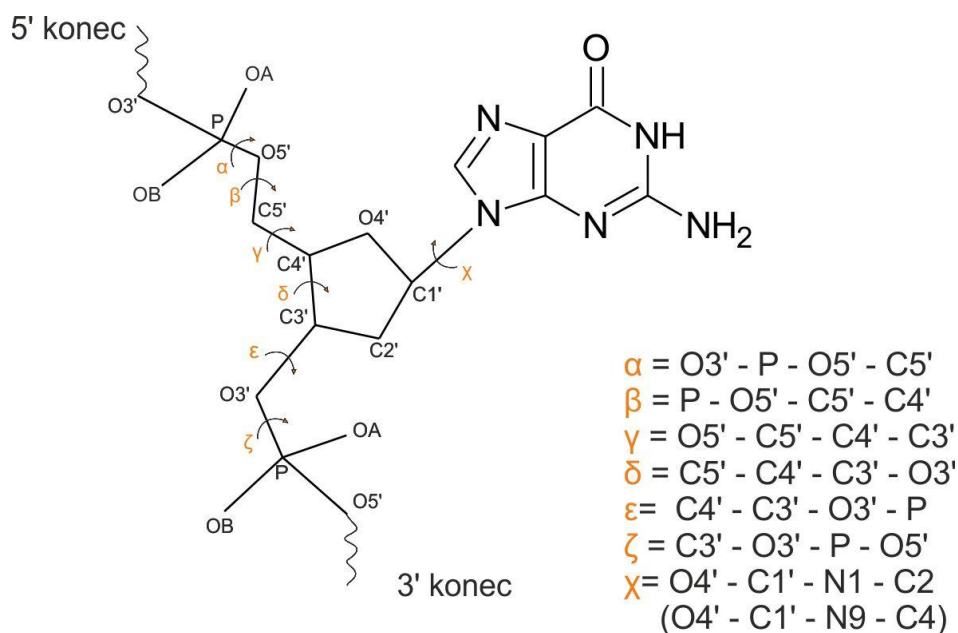
Torzní úhel vyjadřujeme vzorcem (viz rovnice 6)

$$E_t = \sum_t \sum_n \frac{E_n}{2} [1 + \cos(n\phi - \phi_{n0})] \quad (6)$$

E_t znamená torzní příspěvek k potenciální energii, ϕ_{n0} je fázový posun v n-té periodě a ϕ je vazebná torze. E_n vyjadřuje výšku potenciální bariéry v n-té periodě přičemž n je perioda jedné harmonické složky.

Torzní úhel (úhel mezi dvěma rovinami) se pohybuje v hodnotách od 0° do 360° . Udávají nám, jak jsou vůči sobě orientovány např. jednotlivé části nukleotidu. V nukleových kyselinách se jedná konkrétně o úhly α , β , γ , δ , ϵ , ζ a χ , které mají v DNA i RNA své typické hodnoty. Jednotlivé torzní úhly pro nukleové kyseliny jsou zobrazeny v obrázku níže (viz Obrázek 12).

Obrázek 12. Nukleotidová jednotka s navázaným purinem s vyznačenými jmény a čísly atomů. Torzní úhly jsou vyznačeny oranžově. V pravém dolním rohu jsou definovány jednotlivé úhly. Úhel χ je definován dle navázané báze, v závorce je uvedena definice úhlu v případě, že je na pentózu navázán pyrimidin. (Vytvořeno programem Chemskech a Corel)



2.2.3 Explicitní a implicitní rozpouštědlo

V molekulární dynamice se často modeluje vodné prostředí molekuly (solvatace)- buďto explicitním nebo implicitním modelem rozpouštědla. V případě použití explicitního rozpouštědla se molekula nachází v boxu s molekulami vody. Tyto molekuly jsou „skutečné“ a jsou dalšími interagujícími částicemi v systému. Oproti tomu existuje rozpouštědlo implicitní, které považujeme za kontinuum, ve kterém dochází k pohybu simulovaných molekul.[35]

Je známo hned několik explicitních modelů vody, mezi nejpoužívanější patří TIP3P, TIP4P, TIP5P a SPC/E.[36][37] Liší se od sebe základními fyzikálními veličinami modelu vody a parametry.

2.2.4 Silová pole

Existuje hned několik silových polí, pro studium DNA a RNA jsou však nejpoužívanější silová pole AMBER [38] a CHARMM [39].

AMBER (Assisted Model Building with Energy Refinement) je programový balíček, rozvíjející se v posledních třech desetiletích, který umožňuje, mimo jiné, molekulovou dynamiku bimolekulárních systémů jako jsou nukleové kyseliny, proteiny a sacharidy. [40]

Obsahem tohoto balíčku jsou programy potřebné k molekulově-dynamickým simulacím a k následné analýze výsledků. Jedním z programů je například program LEaP, který slouží jako primární nástroj potřebný k vytvoření nového systému v AMBER nebo k modifikaci starého systému. Mezi simulační programy patří SANDER a pmemd, které uskutečňují energetické minimalizace a molekulárně dynamické simulace. Jedním z analyzačních programů je PTRAJ. Je to univerzální nástroj pro analýzu a zpracování trajektorií nebo souborů souřadnic vytvořené MD simulací. Provádí výpočty délky vazeb, velikostí úhlů, dihedrálních úhlů, nebo extrakci souřadnic. [38]

Nejširší využití mají pro nukleové kyseliny silová pole vycházející ze silového pole Cornell et al. [41] programového balíčku AMBER, které označujeme zkratkou ff94. Pozdější úpravy přinesly nové verze a to ff98 a ff99. Analýzou dlouhých simulací bylo ve verzích ff94-ff98 odhaleno, že neposkytují dostatečně stabilní trajektorie. To vedlo k upřesnění jejich torzních potenciálů a k vyřešení hlavního strukturálního problému. Verze parmbsc0 z roku 2007 [42] zavedla nové parametry pro α/γ torze, aby se zabránilo zhroucení B-DNA v důsledku nahromadění nevratných, nepřírozených γ -trans páteřních dihedrálních stavů. V posledních letech vzniklo několik dalších modifikací silového pole, převážná většina z nich se zaměřuje na další úpravy torzních potenciálů. V roce 2010 [43][44] byla publikována oprava glykosidického torzního úhlu χ_{OL3} (χ_{OL}), která opravuje anti (210°) a high-anti (250°) rovnováhu a zabráňuje tak dříve pozorovanému přechodu RNA do žebříkovitého tvaru. [45] RNA „žebřík“ se obvykle tvoří mnohem pomaleji než γ -trans struktury B-DNA, tudíž většina starších studií RNA není tímto artefaktem ovlivněna. [46] Modifikace parmbsc0 a χ_{OL3} jsou v současné době v programu AMBER výchozími parametry pro RNA nukleové kyseliny. Jsou dostupné při použití setu silových polí pod názvem ff14SB (ff99parmbsc0 χ_{OL3}). V roce 2015 byla publikována verze silového pole parmbsc1, navazující na verzi parmbsc0 z roku 2007. Tato verze pro RNA přináší modifikaci χ torze a pro DNA modifikuje χ , ϵ/ζ , a puckeru cukru (P).

Další upřesnění dihedrálních úhlů poskytují silová pole modifikovaná v Olomouci, konkrétně se jedná o verze $\epsilon\zeta_{OL1}$ [47] a β_{OL1} [48], které upravují parametry úhlů ϵ/ζ a β . Přehled modifikací torzí je uveden v tabulce (viz Tabulka 2).

Tabulka 2. Přehled silových polí seřazený podle roku modifikace daného silového pole. Zkratka ff (force field) je označením pro silové pole, OL je zkratka pro Olomouc a χ , ϵ , ζ , β jsou modifikované úhly.

Silové pole	Rok modifikace	Modifikace
ff94	1995	
ff98	1999	
ff99	2000	
ff99parmbsc0	2007	α/γ
ff99parmbsc0 χ_{OL3}	2010	$\alpha/\gamma, \chi$
ff99parmbsc0 $\chi_{OL3}\epsilon\zeta_{OL1}$	2013	$\alpha/\gamma, \chi, \epsilon/\zeta$
ff99parmbsc0 $\chi_{OL3}\epsilon\zeta_{OL1}\beta_{OL1}$	2015	$\alpha/\gamma, \chi, \epsilon/\zeta, \beta$
ff99parmbsc1	2015	DNA: $\alpha/\gamma, \chi, \epsilon/\zeta, P$ RNA: $\alpha/\gamma, \chi$

Druhým silovým polem, jež vyhovuje pro simulace nukleových kyselin, je CHARMM. Starší verzí je CHARMM27, který byl přeparametrizován na CHARMM36 korekcí torzního potenciálu 2'-OH ribosy a to kvůli pokusu o potlačení poměrně rychle se rozvíjející nestability klasicky spárovaných regionů. [46]

Nadále se pracuje na nových modifikacích silových polí. Některé ze zde testovaných parametrů ($\epsilon\zeta_{OL1}$, β_{OL1} , ff99parmbsc1) byly vytvořeny primárně pro DNA. Zaměřením této práce je také otestovat funkčnost těchto parametrů pro molekulu RNA.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Cíle práce

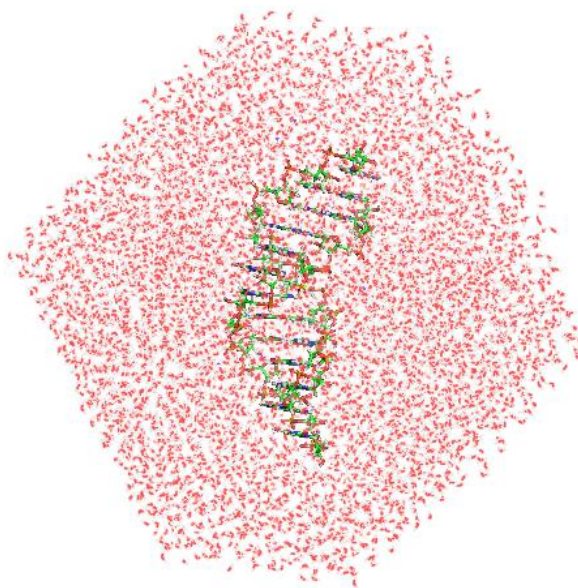
Tato bakalářská práce se zabývá zejména α/γ úhly cukrfofosátové páteře, které hrají důležitou roli ve struktuře nukleových kyselin. Jejich nekanonické hodnoty se vyskytují např. v DNA-proteinových komplexech [49] a mohou tak ovlivňovat popis vazby z nukleových kyselin na proteiny. V původní verzi silového pole ff99 nebyly tyto úhly modelovány realisticky, proto vznikla v roce 2007 modifikace silového pole ff99parmbse0. V poslední době však sílí podezření, že ani tato modifikace není zcela správná a že dochází k nepřírozené destabilizaci $\alpha/\gamma = t/t$ stavů v RNA a možná i v DNA. Z těchto důvodů byly ke studiu vybrány dva RNA systémy obsahující nekanonické α/γ stavy. Cílem práce je detailní popis stability těchto α/γ stavů v dnes používaných silových polích a posouzení, zda jsou těmito silovými poli popsány správně.

3.2 Metody

Výchozí struktury studovaných makromolekul byly převzaty z proteinové databanky (<http://www.rcsb.org>). Loop E byl převzat z X-ray struktury velké ribozomální podjednotky bakterie E.coli s rozlišením 1,5 Å (PDB kód: 354D). [20] Krystalová struktura virové makromolekuly pseudouzel byla převzata rovněž z X-ray struktury v atomovém rozlišení 1,25 Å (PDB kód: 1L2X). [50]

K realizaci simulací byl použit programový balíček AMBER. Simulace byly testovány pro silová pole ff99parmbse0 χ_{OL3} , ff99parmbse0 $\chi_{OL3}\epsilon\zeta_{OL1}$, ff99parmbse0 $\chi_{OL3}\epsilon\zeta_{OL1}\beta_{OL1}$ a ff99parmbse1 (viz Tabulka 1). Oba dva systémy byly pomocí modulu LEaP zneutralizovány kationty K^+ [51] a vloženy do oktahedrálního boxu (viz Obrázek 13), konkrétně byl použit explicitní model vody TIP3P [36], u něhož byla nastavena vzdálenost stěny boxu a nejbližšího atomu solutu na 12 Å. Pro Mg^{2+} ionty byly použity parametry Allner a kol. [52] U každé simulace musí před spuštěním proběhnout minimalizace a ekvilibrace, při které se systém postupně zahřívá z 0 na 298,16 při konstantním tlaku (podrobnější protokol viz článek [44]). Pro tyto kroky byl použit programový balíček pmemd. Délka simulací byla 1 mikrosekunda pro Loop E a 100 nanosekund pro strukturu pseudouzlu.

Obrázek 13. Motiv Loop E v boxu vody. (Vytvořeno programem Pymol)



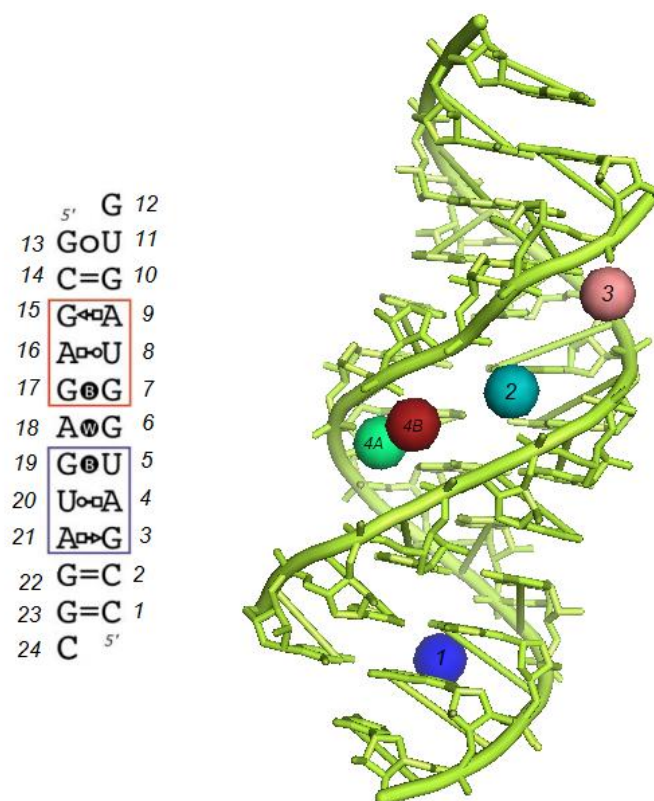
Pro spojování trajektorií byl použit modul ptraj. Úhly α , β , γ , δ , ϵ , ζ , χ , nekanonické vodíkové vazby a vzdálenosti hořčičků od nejbližšího atomu byly měřeny taktéž programem ptraj a snímky MD simulací byly vizuálně pozorovány a posuzovány programy VMD a Pymol. Pro tvorbu grafů k přehlednému vyhodnocení všech parametrů byl použit program gnuplot.

3.3 Výsledky a diskuze

3.3.1 Loop E

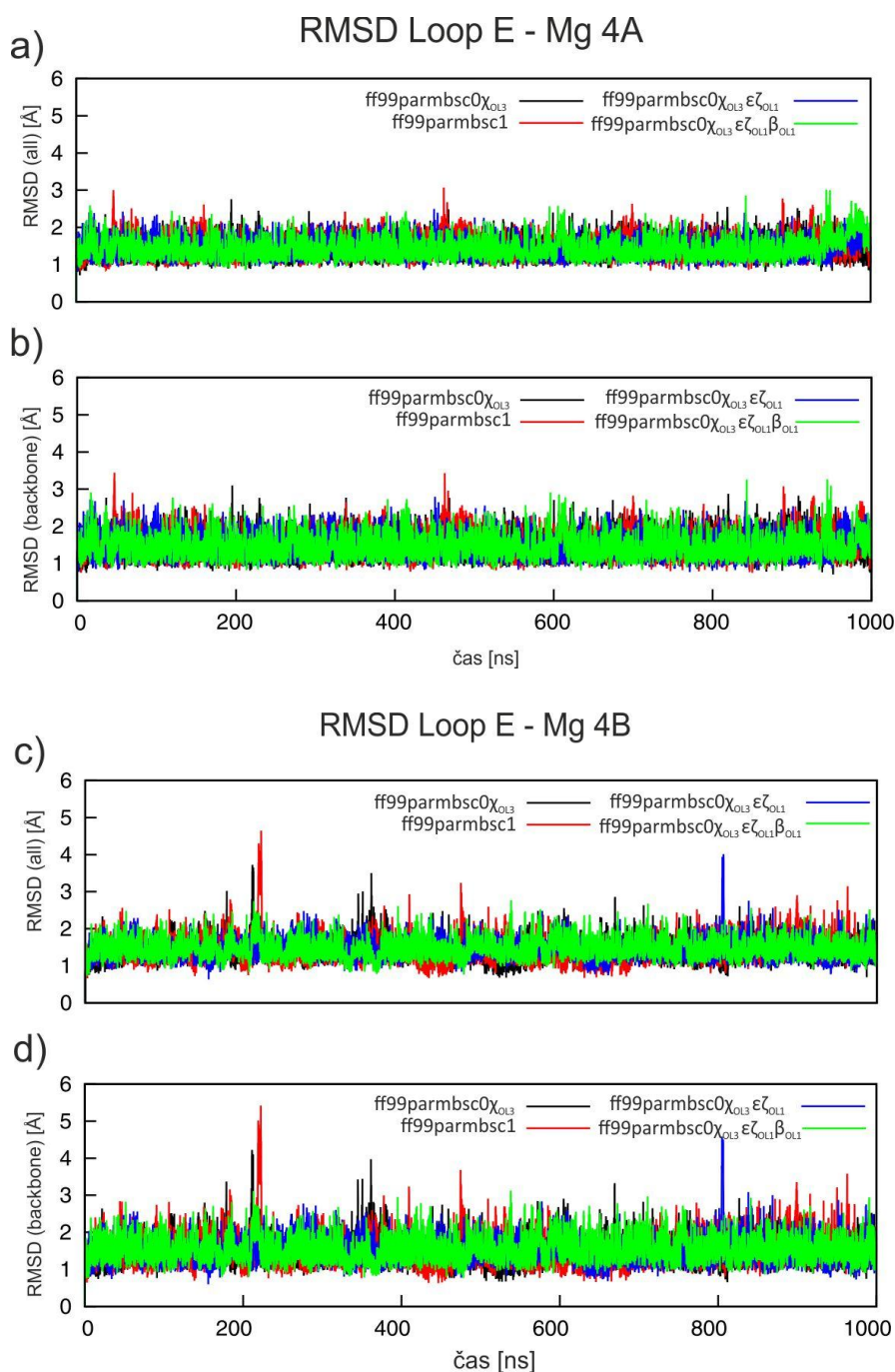
Motiv Loop E obsahuje nekanonické stavy hodnot úhlů α/γ . Hlavním cílem práce bylo zjistit, jak budou tyto stavy popsány v silových polích ff99parmbsc0 χ_{OL3} , ff99parmbsc0 $\chi_{OL3}\epsilon\zeta_{OL1}$, ff99parmbsc0 $\chi_{OL3}\epsilon\zeta_{OL1}\beta_{OL1}$ a ff99parmbsc1. Tyto úhly se nacházejí na dvou místech páteře, v reziduích A4 a A16 (viz Obrázek 14). Spolu s úhly α a γ nabývá nekanonické hodnoty i mezilehlý úhel β . Úhly $\alpha/\beta/\gamma$ odpovídají v nativní konformaci hodnotám $254^\circ/79,6^\circ/161,2^\circ$ pro reziduum A4 a $258,5^\circ/81,9^\circ/169^\circ$ pro reziduum A16. Typickými hodnotami pro A-RNA jsou $295^\circ/173^\circ/54^\circ$. [53]

Obrázek 14. Struktura motivu Loop E. V levé části jsou po sobě jdoucí, očíslované páry bází. Mezi každými dvěma bázemi je symbol interakce podle interagujících stran bází (viz Tabulka 1). V pravé části je graficky znázorněna celá struktura Loop E. Barevnými koulemi jsou vyznačeny hořčíky s použitým číslováním. (Vytvořeno programem Pymol a Correl)



Protože rentgenová struktura vykazovala částečné obsazovací faktory pro hořčík Mg 4 (viz Obrázek 14), byly simulace pro každé silové pole spuštěny zvlášť s Mg v poloze A respektive s Mg 4B. Jako první jsme posuzovali celkovou stabilitu struktury v molekulové dynamice s jednotlivými silovými poli, která byla hodnocena na základě RMSD (Root-mean-square-deviation of atomic positions) (viz Graf 1). Hodnoty RMSD nám kvantitativně popisují podobnosti dvou struktur. [54] Čím menší je hodnota RMSD, tím méně se od sebe struktury odchylují, při hodnotě 0 jsou struktury totožné. Hodnota RMSD nám obecně udává informaci o tom, jak je molekula během simulace stabilní. Pro tuto strukturu byly použity hodnoty měřené bez koncových (nepárových) bází G12 a C24. RMSD pro celou molekulu zahrnující i koncové báze G12 a C24 bylo větší z důvodu plápolání konců do roztoku. Tento jev je však přirozený a nemá výrazný vliv na strukturu vnitřní části helixu.

Graf 1. Vypočtené hodnoty RMSD pro simulace s hořčíkem 4 v poloze A a B pro cukrfosfátovou páteř i báze (a, c) a jen pro cukrfosfátovou páteř (b, d). Snímky byly zaznamenávány každých 10 ps. Výsledný graf obsahuje pro větší přehlednost pouze každý desátý snímek.



V grafu 1a) a 1c) je zobrazeno RMSD pro atomy páteře i bází. Hodnoty RMSD pouze pro cukrfosfátovou páteř jsou zobrazeny v grafech 1b) a 1d). Samotná hodnota RMSD u všech silových polí se, až na menší výchytky, pohybuje přibližně mezi 1-2 Å. V jistých

okamžicích (210 ns, 380 ns, 810 ns) však dochází u určitých silových polí k rapidnímu zvýšení RMSD, které je ale vždy vratné. Struktura je tedy na naší časové škále stabilní.

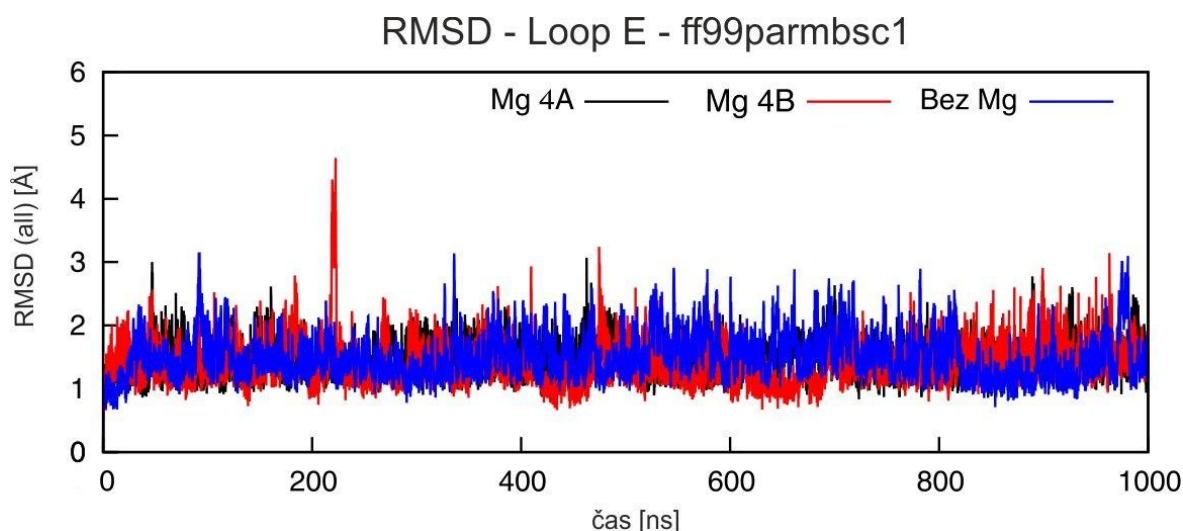
Na začátku práce nemohlo být vyloučeno, že nekanonické hodnoty úhlů α/γ souvisejí s pozicemi hořčičků (viz Obrázek 14). Proto jsme se v této práci zaměřili také na sledování toho, jestli se hořečnaté ionty jsou schopny udržet v původní poloze studovaného motivu a jestli jejich poloha má vliv na hodnotu α/γ (viz Grafy 3-10). Vzdálenosti hořčičků od nejbližšího atomu v původní struktuře jsou uvedeny v tabulce níže (viz Tabulka 3). Zjistili jsme, že ionty, které jsou na molekulu RNA vázány nepřímo přes molekulu vody ve 2. solvatační sféře (Mg 1, Mg 2), se ve všech silových polích nejsou schopny udržet ve své startovní pozici a po celou dobu simulace dochází ke vzdalování a zpětnému přibližování k původní vzdálenosti. Výjimkou je silové pole ff99parmbsc0 $\chi_{OL3}\epsilon_{OL1}$ s hořčíkem 4B, kde se hořčík č. 2 do přibližně 700 ns drží ve své původní poloze, ovšem poté opět dochází k prodloužení vzdálenosti od daného atomu. To je způsobeno tím, že se vytvoří přímý kontakt hořčíku na blízký fosfát (v 1. solvatační sféře Mg), který se však po 700 ns přeruší. Mnohem stabilnější jsou hořčíky vázané přímo na RNA (vazba RNA nahradí jednu molekulu vody z 1. solvatační sféry hořčíku (Mg 3, Mg 4)), které se téměř u všech silových polí drží po celou dobu simulace ve své původní poloze. Jinak je tomu jen u hořčíku č. 3. V silovém poli ff99parmbsc0 χ_{OL3} v simulaci s hořčíkem 4B nedochází ke změně vzdálenosti od daného atomu pouze prvních přibližně 110 ns. U silového pole ff99parmbsc1 se Mg 3 drží podstatně déle, ke zvětšení délky vazby dochází až od 700 ns. To ukazuje na to, že ačkoli je hořčík č. 3 vázán v 1. solvatační sféře, je v časové škále naší simulace (1 μ s) schopen výměny s okolní vodou. Je ale nutno zmínit, že tento hořčík váže ve své 1. solvatační sféře kyslík guaninu a nikoli fosfátový kyslík, jako je tomu u hořčíku č. 4.

Změny délky vazeb mezi hořčíky a nejbližšími atomy nijak nekorelují s flipy úhlů α/γ , při každém flipu se hořčíky chovají jinak. Celkově má tedy poloha hořčičků na α/γ stavy a stabilitu jen velmi malý vliv. Pro srovnání byla spuštěna simulace bez přítomnosti hořčíku. Z grafu (viz Graf 2) lze vyčíst, že přítomnost hořčičků nehraje roli pro celkovou stabilitu studovaného motivu a analýza úhlů α/γ ukázala, že se chovají podobně, jako v simulacích obsahujících kationty hořčíku. Výsledky se v ostatních silových polích nelišily, proto je přiložen pouze graf pro silové pole ff99parmbsc1.

Tabulka 3. Vzdálenosti hořčků od nejbližšího atomu v krystalové struktuře.

Mg ve 2. solvatační sféře		Mg v 1. solvatační sféře	
Vazba	Vzdálenost [Å]	Vazba	Vzdálenost [Å]
Mg 1 - A21:OP2	4,66	Mg 3 - G15:O6	2,59
Mg 2 - U5:OP2	4,46	Mg 4A - A18:OP2	2,05
Mg 2 - G7:O6	3,68	Mg 4B - G17:OP2	2,14

Graf 2. Hodnoty RMSD molekuly Loop E po dobu 1 μ s v silovém poli ff99parmbsc1 v přítomnosti Mg v polohách 4A a 4B a bez Mg.



Hlavním cílem této práce bylo posouzení stability nekanonických α/γ stavů v reziduích A4 a A16, které v krystalové struktuře nabývají hodnot $\alpha/\beta/\gamma \sim 260^\circ/80^\circ/170^\circ$. Ve všech provedených simulacích se v prvních nanosekundách simulace úhel α přeměnil do polohy gauche⁻ ($\sim 300^\circ$), úhel β do trans ($\sim 180^\circ$) polohy a úhel γ do polohy gauche⁺ ($\sim 60^\circ$). V případě struktur obsahujících Mg 4A se úhly ve zmíněných polohách drží po většinu času. Úhly struktur zahrnující hořčík 4 v poloze B se sice také vyskytují převážně v nenativní $\alpha/\beta/\gamma = g-/t/g+$ konformaci, ale v průběhu simulace se několikrát na velmi krátkou dobu vrátí do nativní konformace. Přesto, že je populace nativního stavu ve 4B simulaci celkově velmi nízká, je znatelně vyšší, než v simulaci s hořčíkem 4 v poloze A. V této souvislosti zmiňuji, že poloha hořčíku 4 v pozici B je v krystalové struktuře převažující (poměr částečných obsazovacích faktorů A:B = 1:2 [26]). Hlavním výsledkem simulací je, že žádné z námi testovaných silových polí nedokáže udržet nativní hodnoty α/γ stavů cukrfosfátové páteře ve struktuře Loop E.

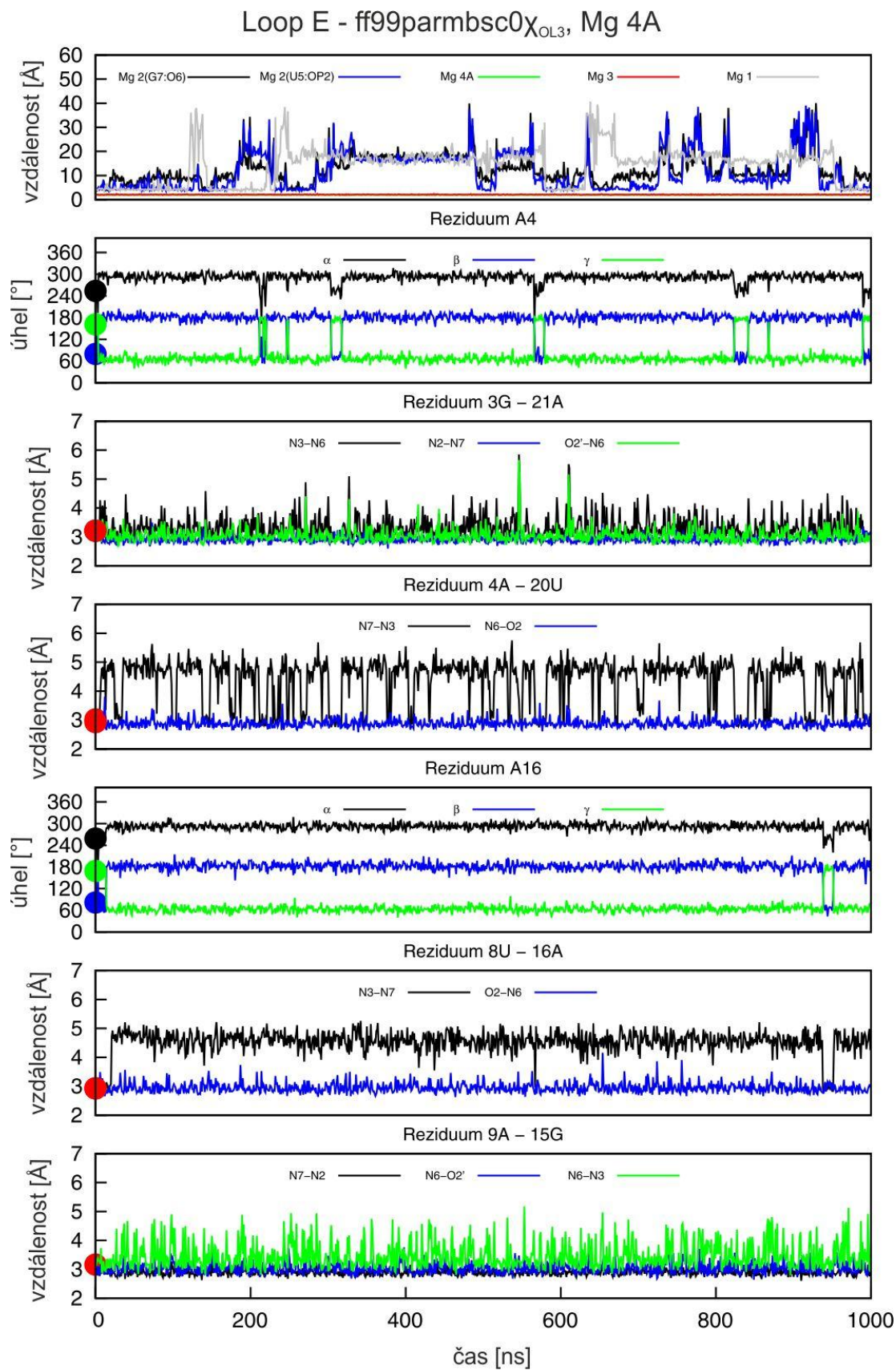
Tabulka 4. Délky vodíkových vazeb nekanonických párů bází. Tučně vyznačeny vazby, které po celou dobu simulace téměř nemění svou délku.

H-vazba	Délka [Å]	H-vazba	Délka [Å]
3G (O2') – 21A (N6)	2,91	8U (O2) – 16A (N6)	2,91
3G (N2) – 21A (N7)	3,02	8U (N3) – 16A (N7)	2,93
3G (N3) – 21A (N6)	3,21	9A (N7) – 15G (N2)	3,16
4A (N7) – 20U (N3)	3,02	9A (N6) – 15G (O2')	2,94
4A (N6) – 20U (O2)	2,73	9A (N6) – 15G (N3)	3,19

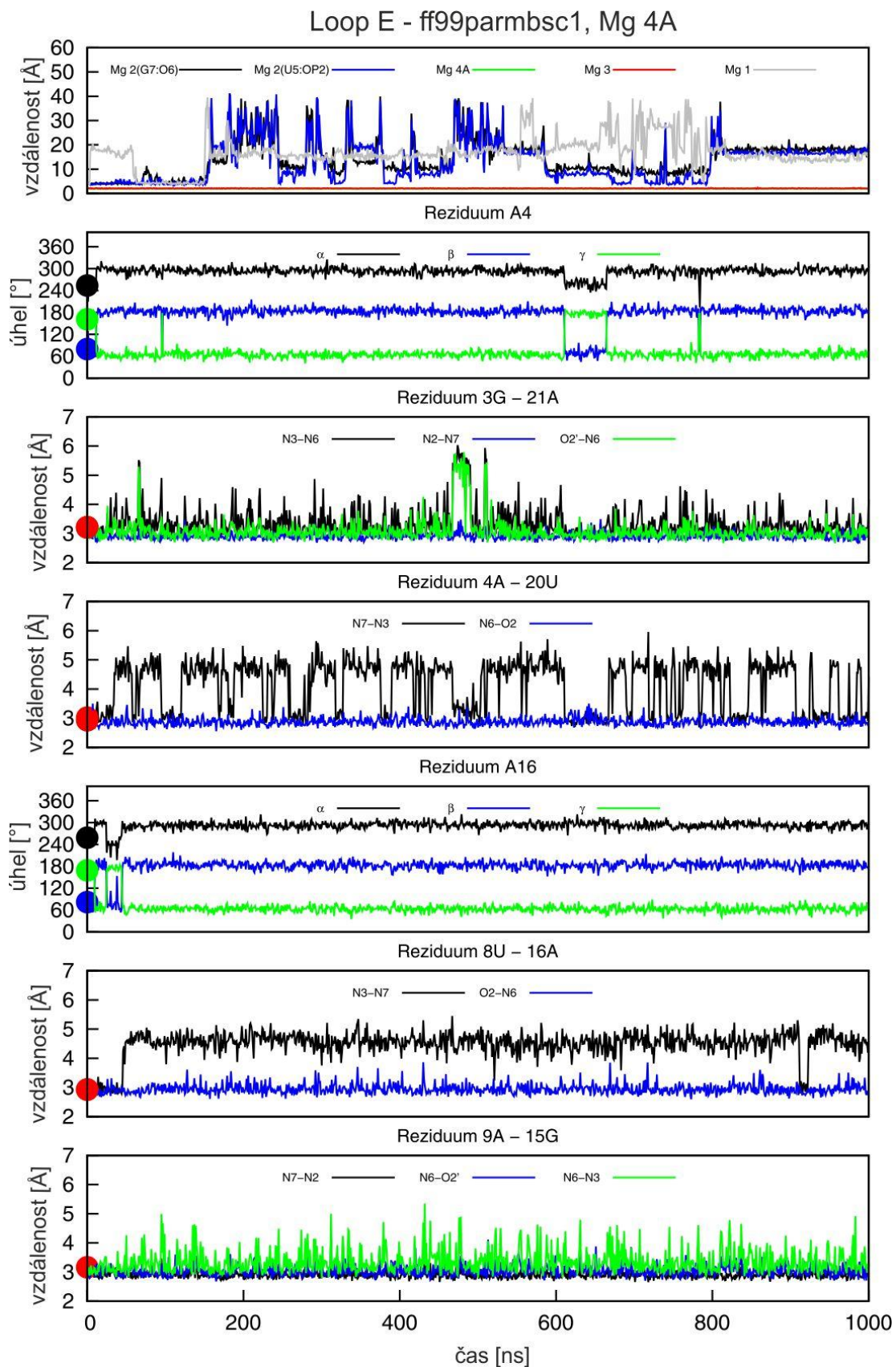
Dalším kritériem k posouzení celkové stability Loop E motivu bylo studium stability nekanonických párů bází a jejich korelace se studovanými úhly $\alpha/\beta/\gamma$ (viz Grafy 3-10). Celkem je ve struktuře 8 nekanonických párů. V práci jsou dále analyzovány a diskutovány pouze ty, které jsou ovlivněny flipy studovaných úhlů. Vodíkové vazby studovaných nekanonických párů a jejich délka ve startovní struktuře jsou zaznamenány v tabulce (viz Tabulka 4).

Kvůli prostorové blízkosti s vybranými úhly jsme k posuzování zvolili vodíkové vazby mezi rezidui 3G-21A a 4A-20U pro úhly v reziduu A4 a 8U-16A a 9A-15G pro úhly v reziduu A16 (viz Obrázek 14). Mezi jmenovanými se vyskytly vodíkové vazby, které po celou dobu simulace udržely stejnou délku, jaká byla ve startovací geometrii. Tyto nekanonické páry jsou pro snazší orientaci tučně vyznačeny v předešlé tabulce (viz Tabulka 4). Mezi těmito vazbami je zahrnuta i vazba 4A (N6) – 20U (O2). U silového pole ff99parmbsc0 $\chi_{OL3}\epsilon\zeta_{OL1}$ s hořčíkem 4B však při 400 ns dochází na krátkou dobu (asi 50 ns) k prodloužení této vazby na přibližně 6 Å, poté se ale opět vrací do startovní hodnoty, kterou pak udržuje po celou dobu simulace. U tohoto jevu nebyla pozorována korelace s $\alpha/\beta/\gamma$ úhly páteře.

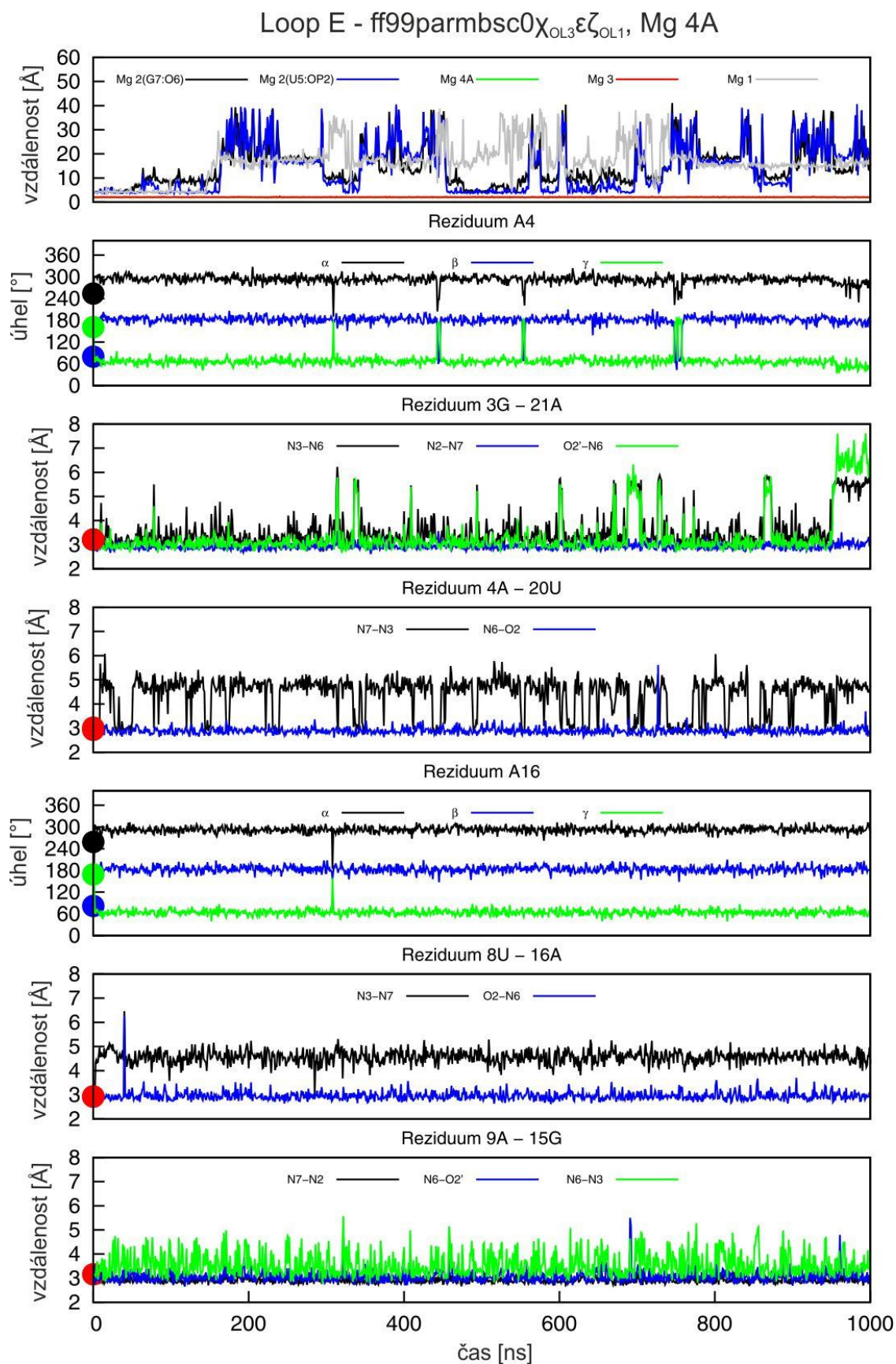
Graf 3. Výsledky simulací pro silové pole ff99parmbsc0 χ_{OL3} s hořčíkem v poloze 4A. Barevnými kolečky na ose y jsou vyznačeny startovní hodnoty jednotlivých parametrů.



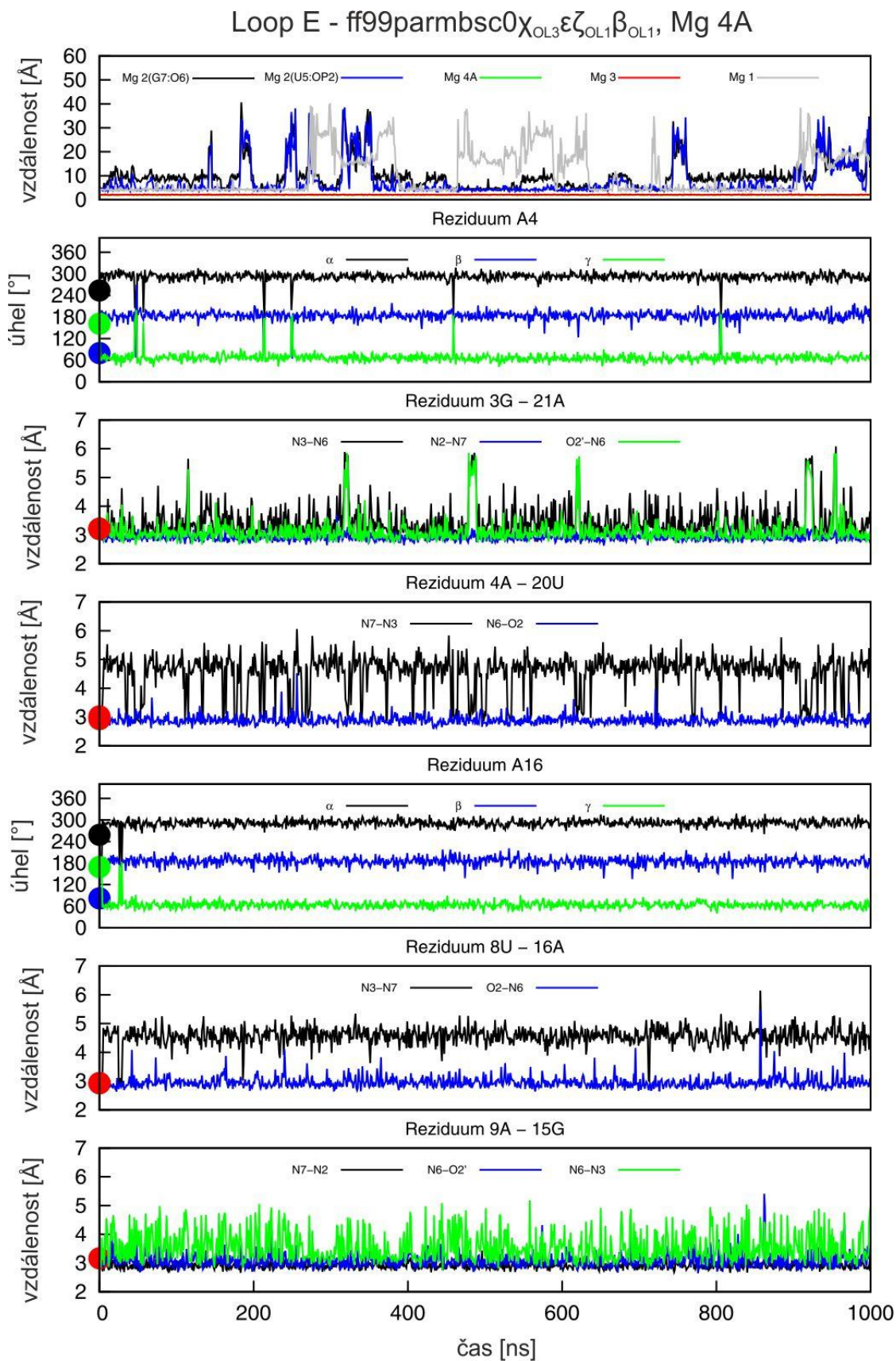
Graf 4. Výsledky simulací pro silové pole ff99parmbsc1 s hořčíkem v poloze 4A. Barevnými kolečky na ose y jsou vyznačeny startovní hodnoty jednotlivých parametrů.



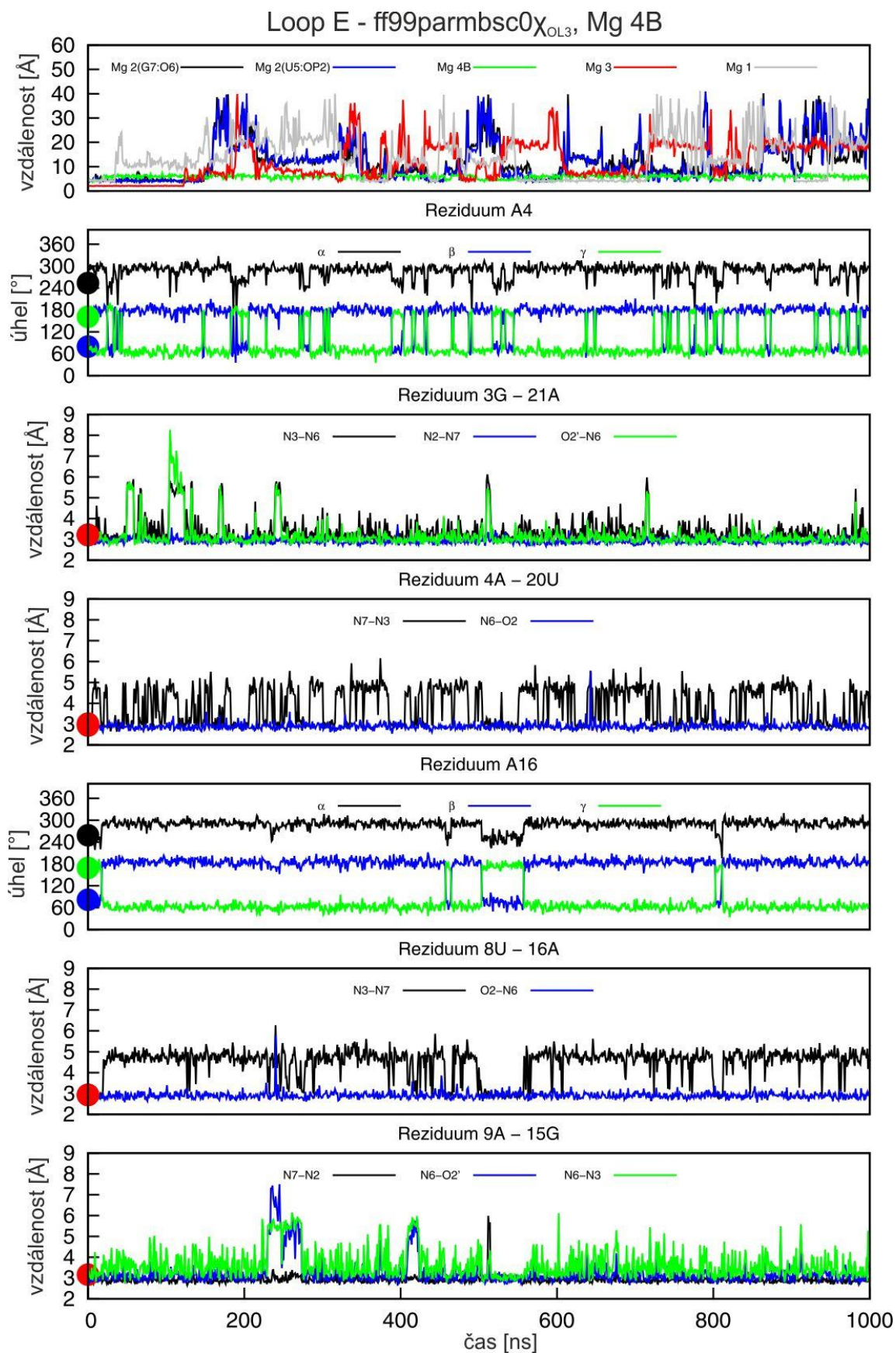
Graf 5. Výsledky simulací pro silové pole $\text{ff99parmbsc0}\chi_{\text{OL3}}\epsilon\zeta_{\text{OL1}}$ s hořčíkem v poloze 4A. Barevnými kolečky na ose y jsou vyznačeny startovní hodnoty jednotlivých parametrů.



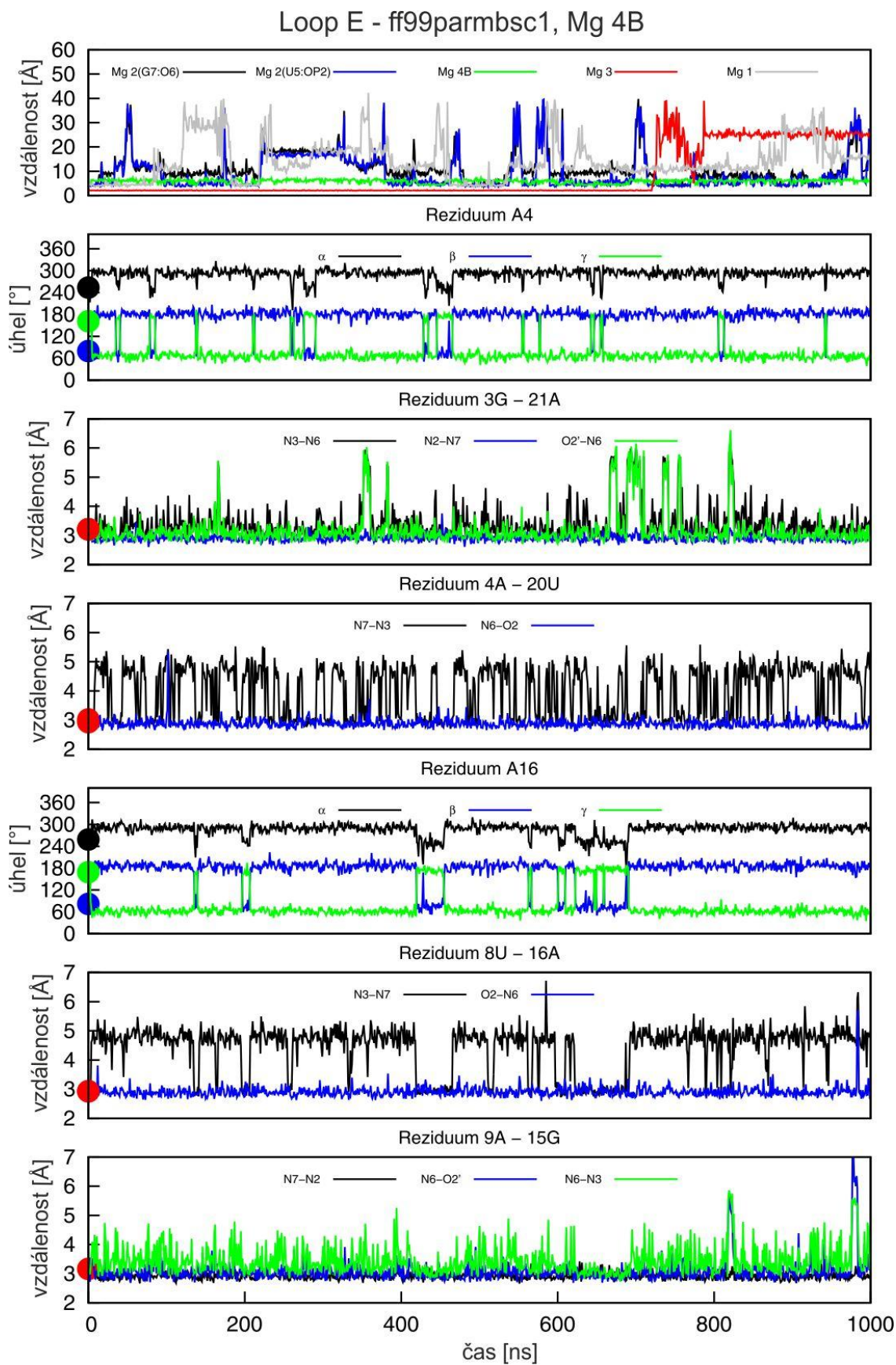
Graf 6. Výsledky simulací pro silové pole $\text{ff99parmbsc0}\chi_{\text{OL3}}\epsilon\zeta_{\text{OL1}}\beta_{\text{OL1}}$ s hořčíkem v poloze 4A. Barevnými kolečky na ose y jsou vyznačeny startovní hodnoty jednotlivých parametrů.



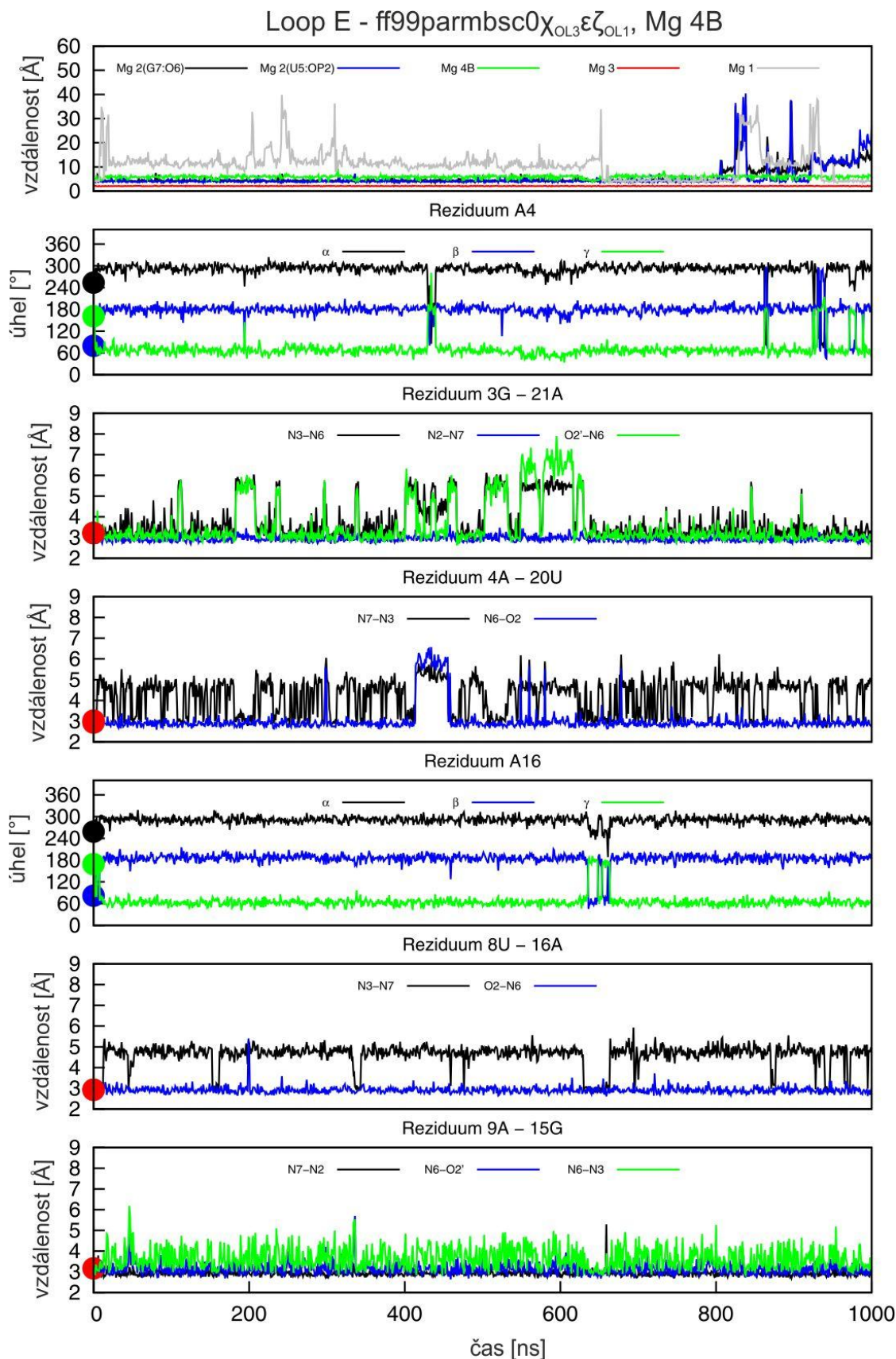
Graf 7. Výsledky simulací pro silové pole ff99parmbsc0 χ_{OL3} s hořčíkem v poloze 4B. Barevnými kolečky na ose y jsou vyznačeny startovní hodnoty jednotlivých parametrů.



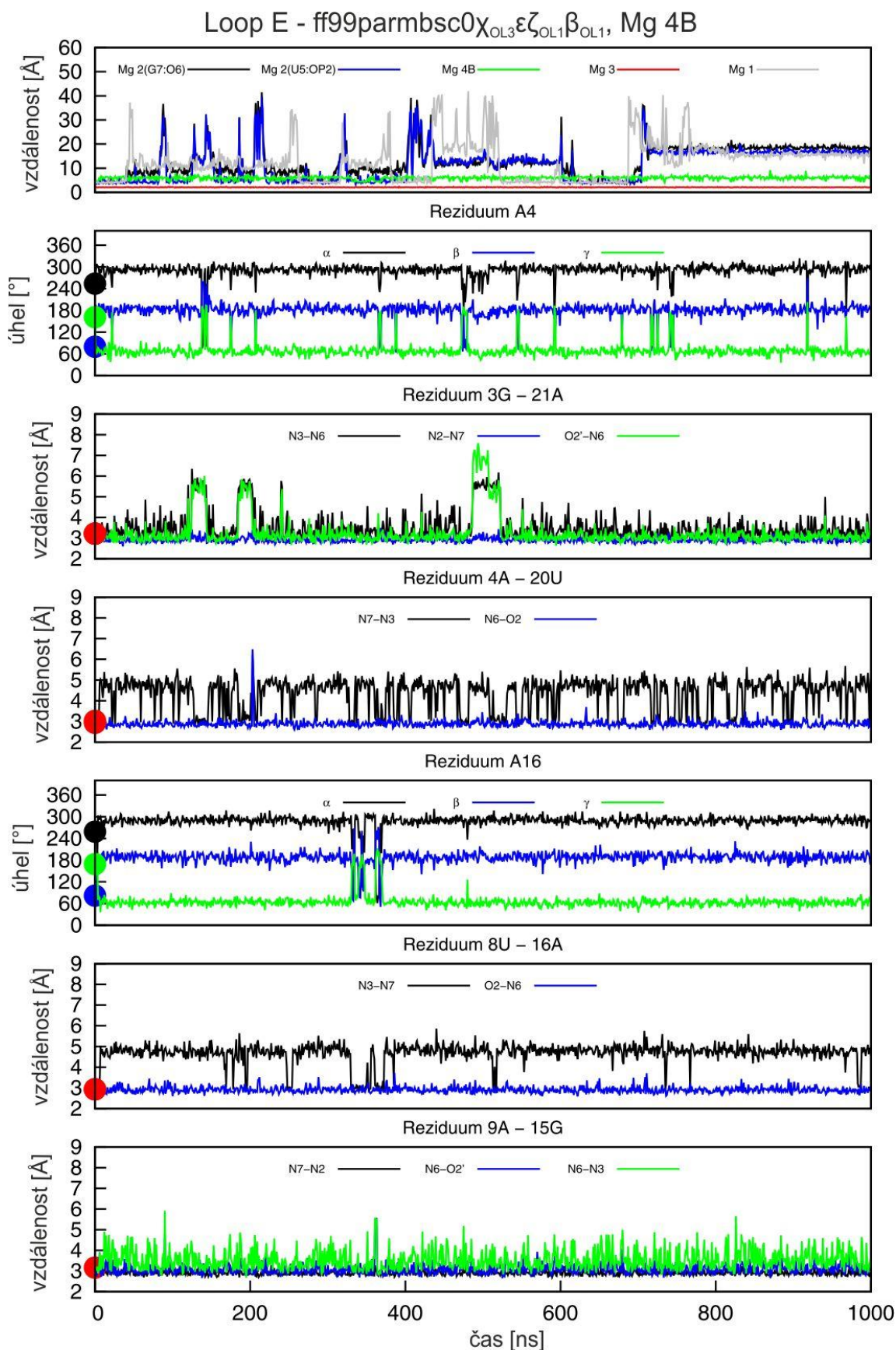
Graf 8. Výsledky simulací pro silové pole ff99parmbsc1 s hořčíkem v poloze 4B. Barevnými kolečky na ose y jsou vyznačeny startovní hodnoty jednotlivých parametrů.



Graf 9. Výsledky simulací pro silové pole $\text{ff99parmbsc0}\chi_{\text{OL3}}\epsilon\zeta_{\text{OL1}}$ s hořčíkem v poloze 4B. Barevnými kolečky na ose y jsou vyznačeny startovní hodnoty jednotlivých parametrů.



Graf 10. Výsledky simulací pro silové pole $\text{ff99parmbsc0}\chi_{\text{OL3}}\epsilon\zeta_{\text{OL1}}\beta_{\text{OL1}}$ s hořčíkem v poloze 4B. Barevnými kolečky na ose y jsou vyznačeny startovní hodnoty jednotlivých parametrů.



Vazby O2'-N6 a N3-N6 rezidua 3G-21A se náhodně prodlužují a vrací zpět do své výchozí délky. Tento jev souvisí s přeskoky úhlů $\alpha/\beta/\gamma$ – při každém flipu se tyto vazby zkrátí. Ke zkrácení délky však dochází i v jiných momentech, při kterých se jmenované úhly nijak nemění. K náhodnému prodlužování dochází analogicky i u symetricky položených vazeb N6-O2' a N6-N3 reziduí 9A–15G. Pokud se však úhel vrací do své startovní pozice na delší čas, což se děje u všech silových polí s hořčíkem 4B, dojde vždy ke zkrácení vazeb N6-O2' a N6-N3 na přibližně na původní délku okolo 3 Å. Zdá se tedy, že nativní geometrie páteře u sledovaného adeninu implikuje stabilní (krátkou) vodíkovou vazbu v sousedním GA páru.

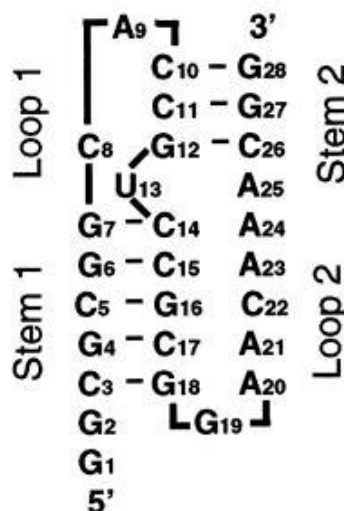
Vzhledem k přeskokům úhlů páteře je ale ještě zajímavější sledovat vodíkové vazby přímo mezi rezidui 4A-20U a 16A-8U. Vazba 4A(N7)–20U(N3) má svou původní délku cca 10-50% času, v závislosti na použitém silovém poli, a ve zbývajícím čase je prodloužená na délku okolo 5 Å. Zde lze opět pozorovat souvislost se změnou dihedrálních úhlů páteře v blízkosti adeninu, kdy při každém přeskoku má zmíněná vazba původní délku. Stejně jako u předchozích dvou vazeb, i zde se ale vazba vrací na původní délku i ve chvílích, kdy nejsou úhly páteře v nativní konformaci. Zajímavé je, že jinak je tomu u vazby N3-N7 rezidua 8U–16A. Ta se téměř ihned po spuštění simulace prodlouží na délku okolo 4,7 Å a tráví tak téměř celou dobu simulace. Délka této vazby zde ale jednoznačně souvisí s přeskoky úhlů rezidua A16. Ve všech případech, kdy se úhly vyskytnou v nativní konformaci, dojde ke změně vzdálenosti mezi rezidui na původní hodnotu. Pouze u silových polí ff99parmbsc0 $\chi_{OL3}\epsilon\zeta_{OL1}$ s hořčíkem 4B a ff99parmbsc1 s hořčíkem 4A můžeme sledovat velmi krátké časové úseky, ve kterých se délka vazby zkracuje nezávisle na úhlech. Opět tedy můžeme říci, že nativní konformace páteře u sledovaných reziduí adeninu implikuje stabilní (krátkou) vodíkovou vazbu v páru, který tento adenin vytváří.

3.3.2. Pseudouzlel

Motiv BWYV pseudouzlu byl studován v silových polích ff99parmbsc0 χ_{OL3} , ff99parmbsc0 $\chi_{OL3}\epsilon\zeta_{OL1}\beta_{OL1}$ a ff99parmbsc1. Z krystalografické struktury (PDB kód: 1L2X) bylo odstraněno reziduum 1 GTP s okolními hořčíky a reziduum 2 G (viz Obrázek 15). Tato rezidua byla odstraněna proto, že tvoří single strand, který je v krystalové struktuře vázán na okolní molekuly. Neočekáváme, že by odstranění single strandu z konce struktury mělo mít výrazný vliv na stabilitu celé struktury. Reziduum 8C bylo modelováno jako N3 protonizované. Parametry byly vzaty z reference číslo [55]. Krystalová struktura pseudouzlu

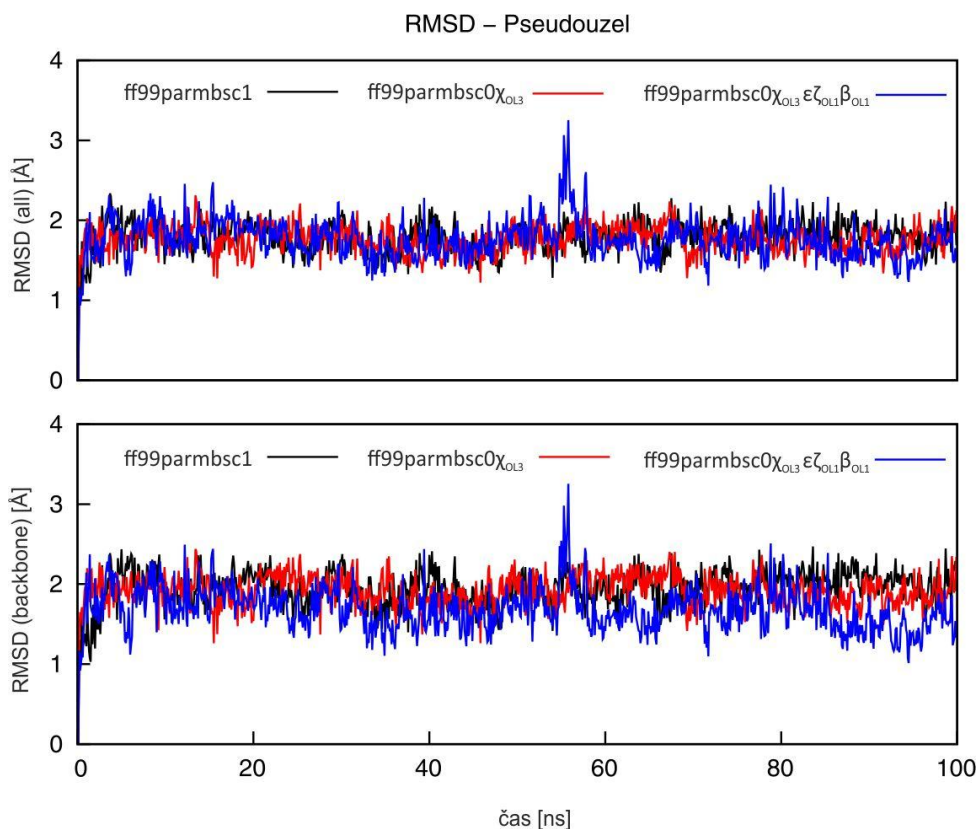
obsahuje rezidua 13, 22 a 23 ve dvou mírně odlišných polohách (A, B; obsazovací faktory 0,5). Proto jsme spustili dvě nezávislé simulace, jednu se startem všech tří reziduí z polohy A a druhou se startem z polohy B. Rozdíl mezi těmito simulacemi nebyl signifikantní a proto jsme se rozhodli pokračovat se strukturou A.

Obrázek 15. Sekundární struktura BWYV pseudouzlu s očíslovanými, po sobě jdoucími rezidui.



Stabilita systému je vyhodnocena pomocí RMSD (viz Graf 11). Pro měření nebyla zahrnuta rezidua č. 13 a 19, protože jsou exponována do roztoku a proto jsou velmi flexibilní. Ani reziduum č. 3, které je v naší simulaci koncové a vykazuje fraying. Struktura je po dobu simulace stabilní a v různých silových polích je popsána velmi podobně (viz Graf 11). Je ale třeba zmínit, že tato simulace je kratší, než v případě Loopu E (pouze 100ns v porovnání s 1 μ s). Kratší simulační čas byl zvolen proto, že nás zajímalo hlavně chování α/γ úhlů, které je dostatečně charakterizováno už na kratší časové škále.

Graf 11. Vypočtené hodnoty RMSD pro strukturu BWYV pseudouzlu pro cukrfosfátovou páteř i báze (horní graf) a jen pro cukrfosfátovou páteř (dolní graf). Snímky byly zaznamenávány každých 10 ps. Výsledný graf obsahuje pro větší přehlednost pouze každý desátý snímek.



Stejně jako Loop E, obsahuje i pseudouzle nekanonické α/γ stavy. Ma tak velký význam pro testování kvality silových polí. Zatímco některé z těchto nekanonických konformací se nacházejí na reziduích, která jsou součástí smyček a jsou ve struktuře vázána volněji, jiné jsou ve vnitřní části struktury a dá se tedy předpokládat, že by měly být stabilní i v našich simulacích. Nekanonickým α/γ stavem na volněji vázaném reziduu vykazujícím krystalové kontakty je např. res. 19G s konformací $\alpha/\gamma = g+/g-$. Ve struktuře vnořená rezidua 8C⁺, 17C a 23A mají stavy $\alpha/\gamma = t/t$, které jsou v RNA molekulách relativně časté. [56] Žádný z těchto α/γ stavů se však v testovaných silových polích nebyl schopen udržet ve své nativní konformaci. K přechodům do alternativních konformací, většinou bližších kanonickým kombinacím α/γ úhlů, docházelo velmi rychle v prvních nanosekundách simulací. Některé ze studovaných úhlů byly schopny návratu do nativní konformace. Celkový čas strávený v nativní konformaci však tvořil zanedbatelný podíl z celkové simulace, což bylo také důvodem, proč simulaci dále neprodlužovat. Výsledky naznačují, že použité silové pole mohou nadměrně destabilizovat právě tyto nativní, ale nekanonické α/γ substavy páteře.

4. ZÁVĚR

V této práci bylo ke studiu motivu Loop E a BWYV pseudouzlu využito molekulové dynamiky, která teoreticky popisuje chování biomolekul. Výsledkem je chování a vývoj molekuly v čase za určitých podmínek. Hlavním cílem bylo studium stability zmíněných motivů s ohledem na nekanonické α/γ stavy cukrfosfátové páteře a jejich korelace s přítomnými hořečnatými ionty či vodíkovými vazbami mezi nekanonickými páry bází.

Motiv Loop E byl zkoumán ve čtyřech silových polích a to v ff99parmbsc0 χ_{OL3} , ff99parmbsc0 $\chi_{OL3}\epsilon\zeta_{OL1}$, ff99parmbsc0 $\chi_{OL3}\epsilon\zeta_{OL1}\beta_{OL1}$ a ff99parmbsc1. Protože původní rentgenová struktura vykazuje částečné obsazovací faktory pro hořčík č. 4, byla v každém silovém poli sledována s oběma startovními pozicemi hořčíků (4A a 4B). Ve všech silových polích byla molekula stabilní, s původní rentgenovou strukturou se neshoduje pouze v detailech páteře – jedná se však o α/γ stavy, které jsou důležitým parametrem. U simulací s Mg 4A se úhly vyskytují téměř celou dobu simulace v nenativní $\alpha/\beta/\gamma = g-/t/g+$ konformaci. Simulace s hořčíkem 4 v poloze B mají taktéž nízkou populaci nativní konformace $\alpha/\beta/\gamma$ a však zřetelně vyšší než s hořčíkem 4 v poloze A. Přeskoky úhlů do jisté míry souvisí i s délkou nativních vodíkových vazeb mezi rezidui 4A–20U a 9A–15G: nativní konformace úhlů stabilizují nativní vodíkové vazby. V simulacích jsme se také zaměřili na chování hořečnatých iontů. Hořčíky, které nejsou vázané tzv. inter shell vazbou, velmi rychle (v několika ns až desítkách ns) opouštějí svá vazebná místa původní krystalografické struktury, což může být artefaktem silového pole. Oproti tomu, většina hořčíků vázaných přímo na nukleovou kyselinu se ve svých vazebných místech udržuje po celou dobu simulace (1 μ s). Pozice hořčíků ovlivňuje populace nativních α/γ stavů pouze velmi slabě, nutno však zmínit, že s Mg 4B se zdají být o málo stabilnější. Rozdíly v simulacích s hořčíky v polohách 4A a 4B a zcela bez hořčíků jsou však natolik malé, že lze říci, že přítomnost hořčíku nemá zásadní vliv na stabilitu Loopu E.

Pseudouzle byl testován v silových polích ff99parmbsc0 χ_{OL3} , ff99parmbsc0 $\chi_{OL3}\epsilon\zeta_{OL1}\beta_{OL1}$ a ff99parmbsc1. Tato struktura obsahuje zajímavé α/γ substavy, které se ale v simulacích neudrží déle než několik ns ve svých nativních hodnotách z krystalové struktury. Rozdíly v popisu α/γ mezi silovými poli jsou malé a použité pole nemá na naší časové škále výrazný vliv ani na celkovou stabilitu struktury.

Z výše zmíněných výsledků lze vyvodit, že v žádném z testovaných polí není původní rentgenová struktura motivů zcela zachována. Studované α/γ stavy jsou nestabilní ve všech

silových polích, rozdíly mezi nimi jsou ale malé až zanedbatelné. Toto zjištění naznačuje, že je potřeba provést další modifikace silových polí pro RNA struktury. Provedené simulace ukazují, že modifikace parametrů primárně určených pro DNA (ϵ_{OL1} , β_{OL1} , ff99parmbsc1) nepřinesly významné změny v simulacích RNA struktur oproti původnímu silovému poli.

5. SUMMARY

The aim of this work was to study two RNA motifs, Loop E and a frameshifting pseudoknot, using molecular dynamics that describes behavior and development of molecules over time under given conditions. The main objective was to study stability of the mentioned motifs with focus on the noncanonical α/γ backbone states, their behavior in various modern force fields, and their correlation with the positions of the present magnesium ions or hydrogen bonds between noncanonical base pairs.

Motif Loop E has been studied with four force fields: ff99parmbsc0 χ_{OL3} , ff99parmbsc0 $\chi_{OL3}\epsilon\zeta_{OL1}$, ff99parmbsc0 $\chi_{OL3}\epsilon\zeta_{OL1}\beta_{OL1}$ and ff99parmbsc1. Because the original X-ray structure exhibits partial occupation factors for magnesium no. 4(4A and 4B), both starting positions (A and B) were considered. The molecule was stable in simulations with all force fields, being close to the original X-ray structure, except for the important α/γ states that are the focus of this study. In simulations with Mg 4A the studied angles spent almost the whole simulation time in the nonnative $\alpha/\beta/\gamma = g-/t/g+$ conformation. Simulations with magnesium 4 in position B are also found most of the time in the nonnative $\alpha/\beta/\gamma$ conformation, however, population of the native substate is higher than with magnesium 4 in position A. Studied angles were to some extent correlated with the length of the native hydrogen bonds between residues 4A - 20U and 9A - 15G: the native $\alpha/\beta/\gamma$ conformation stabilizes the native hydrogen bonds. Further, we have focused on behavior of the magnesium ions. The ions that are bound weakly (outer shell binding) left their crystallographic positions very quickly, after a few nanoseconds to tens of nanoseconds. We hypothesize that this could be due to an artifact of the force field. In contrast, most of the magnesium ions directly bound to nucleic acid (inner shell binding) maintained their initial positions throughout the simulations (1 μ s). Differences in Loop E structure in simulations with magnesium in the positions 4A and 4B and a simulation completely free of magnesium are relatively minor and it can be said that the presence of magnesium has no significant effect on the structure of Loop E at our simulation time scale.

Pseudoknot was tested with three force fields, ff99parmbsc0 χ_{OL3} , ff99parmbsc0 $\chi_{OL3}\epsilon\zeta_{OL1}\beta_{OL1}$ and ff99parmbsc1. This structure contains interesting α/γ substates. However, none of these substates is stable in our simulations and the corresponding angles depart from their initial X-ray values in a few nanoseconds. Differences in the description of the studied α/γ substates between force fields are small. Otherwise, the used

force field had no significant impact on the overall stability of the structure at our simulation time scale.

From the above results it is clear that the original X-ray structure motifs are not completely maintained in any of the tested force fields. In particular, the studied α/γ states are unstable in all force fields and the differences between them are small to negligible. This finding suggests there is a need for further forcefield modification for RNA structures. The simulations show that the parameter modifications that were primarily intended for DNA ($\epsilon\zeta\text{OL1}$, βOL1 , ff99parmbsc1) did not bring significant changes in simulations of RNA structures when compared to the original force field $\text{ff99parmbsc0}\chi_{\text{OL3}}$.

6. LITERATURA

- [1] R. H. Garrett and C. M. Grisham, "Biochemistry, Fifth Edition," *J. Chem. Educ.*, vol. 74, no. 2, p. 189, 1997, ISBN 0-7167-3051-0
- [2] <https://cs.wikipedia.org/wiki/RNA>. Dostupné dne 11.4. 2016.
- [3] A. D. Hershey, "Ribonukleové kyseliny," *Živa*, vol. 3, pp. 98-100, 2007.
- [4] P. Alberts, B. Johnson, A. Lewis, J. Raff, M. Roberts, K. Walter, *Molecular Biology of the Cell, 5th Edition*. 2008. 81-53410-59-0
- [5] P. Klouda, *Základy biochemie, 2.vydání*, pp. 144, 2005, ISBN 80–86369-11-0.
- [6] R. K.-H. Koolman Jan, *Barevný atlas biochemie*. Grada Publishing, a.s., 2012, ISBN 978-80-247-2977-0
- [7] A. Herbert and A. Rich, "Left-handed Z-DNA: structure and function," *Genetica*, vol. 106, no. 1–2, pp. 1–19, 1999.
- [8] J. Müller, "Functional metal ions in nucleic acids.," *Metallomics*, vol. 2, no. 5, pp. 318–327, 2010.
- [9] M. K. Campbell and S. O. Farrell, *Biochemistry*. ISBN 978-0840068583
- [10] T. Hermann and E. Westhof, "Non-Watson-Crick base pairs in RNA-protein recognition," *Chemistry and Biology*, vol. 6, no. 12. 1999.
- [11] J. Nowakowski and T. Ignacio, "RNA Structure and Stability," *Semin. Virol.*, vol. 8, pp. 153–165, 1997.
- [12] N. B. Leontis and E. Westhof, "Geometric nomenclature and classification of RNA base pairs.," *RNA*, vol. 7, no. 4, pp. 499–512, 2001.
- [13] N. B. Leontis, J. Stombaugh, and E. Westhof, "The non-Watson-Crick base pairs and their associated isostericity matrices.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 30, no. 16, pp. 3497–531, 2002.
- [14] R. T. Batey, R. P. Rambo, and J. A. Doudna, "Tertiary motifs in RNA structure and folding," *Angewandte Chemie - International Edition*, vol. 38, no. 16. pp. 2326–2343, 1999.

- [15] http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2009/. Dostupné ze dne 25. 2. 2016.
- [16] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter, *Molecular Biology of the Cell*, 4th edition. 2002, ISBN 0-8153-3218-1.
- [17] A. Ben-Shem, N. Garreau de Loubresse, S. Melnikov, L. Jenner, G. Yusupova, and M. Yusupov, “The structure of the eukaryotic ribosome at 3.0 Å resolution,” *Science*, vol. 334, no. 6062, pp. 1524–9, 2011.
- [18] M. Novotný, “Ribozom – továrna na proteiny,” *Vesmir* 89, vol. 7, pp. 444–446, 2010.
- [19] M. Szymanski, M. Z. Barciszewska, V. A. Erdmann, and J. Barciszewski, “5S rRNA: structure and interactions,” *Biochem J*, vol. 371, no. Pt 3, pp. 641–651, 2003.
- [20] C. C. Correll, B. Freeborn, P. B. Moore, and T. a Steitz, “Metals, motifs, and recognition in the crystal structure of a 5S rRNA domain,” *Cell*, vol. 91, no. 5, pp. 705–712, 1997.
- [21] R. a Owens and T. Baumstark, “Structural differences within the loop E motif imply alternative mechanisms of viroid processing,” *RNA*, vol. 13, no. 6, pp. 824–834, 2007.
- [22] T. Hermann and D. J. Patel, “Stitching together RNA tertiary architectures,” *J. Mol. Biol.*, vol. 294, no. 4, pp. 829–849, 1999.
- [23] S. E. Butcher and J. M. Burke, “A Photo-Cross-Linkable Tertiary Structure Motif Found in Functionally Distinct RNA Molecules Is Essential for Catalytic Function of the Hairpin Ribozyme,” *Biochemistry*, vol. 33, pp. 992–999, 1994.
- [24] A. D. Branch and H. D. Robertson, “A replication cycle for viroids and other small infectious RNA’s,” *Science*, vol. 223, no. 4635, pp. 450–455, 1984.
- [25] K. Réblová, N. Špacková, R. Štefl, K. Csaszar, J. Koca, N. B. Leontis, and J. Šponer, “Non-Watson-Crick basepairing and hydration in RNA motifs: molecular dynamics of 5S rRNA loop E,” *Biophys. J.*, vol. 84, no. 6, pp. 3564–82, 2003.
- [26] P. Auffinger, L. Bielecki, and E. Westhof, “The Mg²⁺ binding sites of the 5S rRNA loop E motif as investigated by molecular dynamics simulations,” *Chem. Biol.*, vol. 10, no. 6, pp. 551–561, 2003.

- [27] K. Rietveld, R. van Poelgeest, C. W. A. Pleij, J. H. van Boom, and L. Bosch, "The tRNA-Uke structure at the 3' terminus of turnip yellow mosaic virus RNA. Differences and similarities with canonical tRNA," *Nucleic Acids Res.*, vol. 10, no. 6, pp. 1929–1946, 1982.
- [28] D. W. Staple and S. E. Butcher, "Pseudoknots: RNA structures with diverse functions," *PLoS Biology*, vol. 3, no. 6, pp. 0956–0959, 2005.
- [29] R.-S. C and M. LA, "The Complementarity of the Loop to the Stem in DNA Pseudoknots Gives Rise to Local TAT Base-Triplets," *Methods Enzym.*, pp. 413–32, 2016.
- [30] J.-L. Chen and C. W. Greider, "Functional analysis of the pseudoknot structure in human telomerase RNA.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, no. 23, pp. 8080–5; discussion 8077–9, 2005.
- [31] K. Csaszar, N. Špacková, R. Štefl, J. Šponer, and N. B. Leontis, "Molecular dynamics of the frame-shifting pseudoknot from beet western yellows virus: the role of non-Watson-Crick base-pairing, ordered hydration, cation binding and base mutations on stability and unfolding.," *J. Mol. Biol.*, vol. 313, no. 5, pp. 1073–1091, 2001.
- [32] M. Otyepka, T. Zelený, and P. Sklenovský, "Úlohy do cvičení z výpočetní chemie", 2008.
- [33] A. D. Mackerell, "Empirical force fields for biological macromolecules: Overview and issues," *Journal of Computational Chemistry*, vol. 25, no. 13, pp. 1584–1604, 2004.
- [34] W. F. van Gunsteren and H. J. C. Berendsen, "Computer Simulation of Molecular Dynamics: Methodology, Applications, and Perspectives in Chemistry," *Angew. Chemie Int. Ed. English*, vol. 29, no. 9, pp. 992–1023, 1990.
- [35] G. S. Grest and K. Kremer, "Molecular dynamics simulation for polymers in the presence of a heat bath," *Phys. Rev. A*, vol. 33, no. 5, pp. 3628–3631, 1986.
- [36] W. L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J. D. Madura, R. W. Impey, and M. L. Klein, "Comparison of simple potential functions for simulating liquid water," *J. Chem. Phys.*, vol. 79, no. 2, p. 926, 1983.

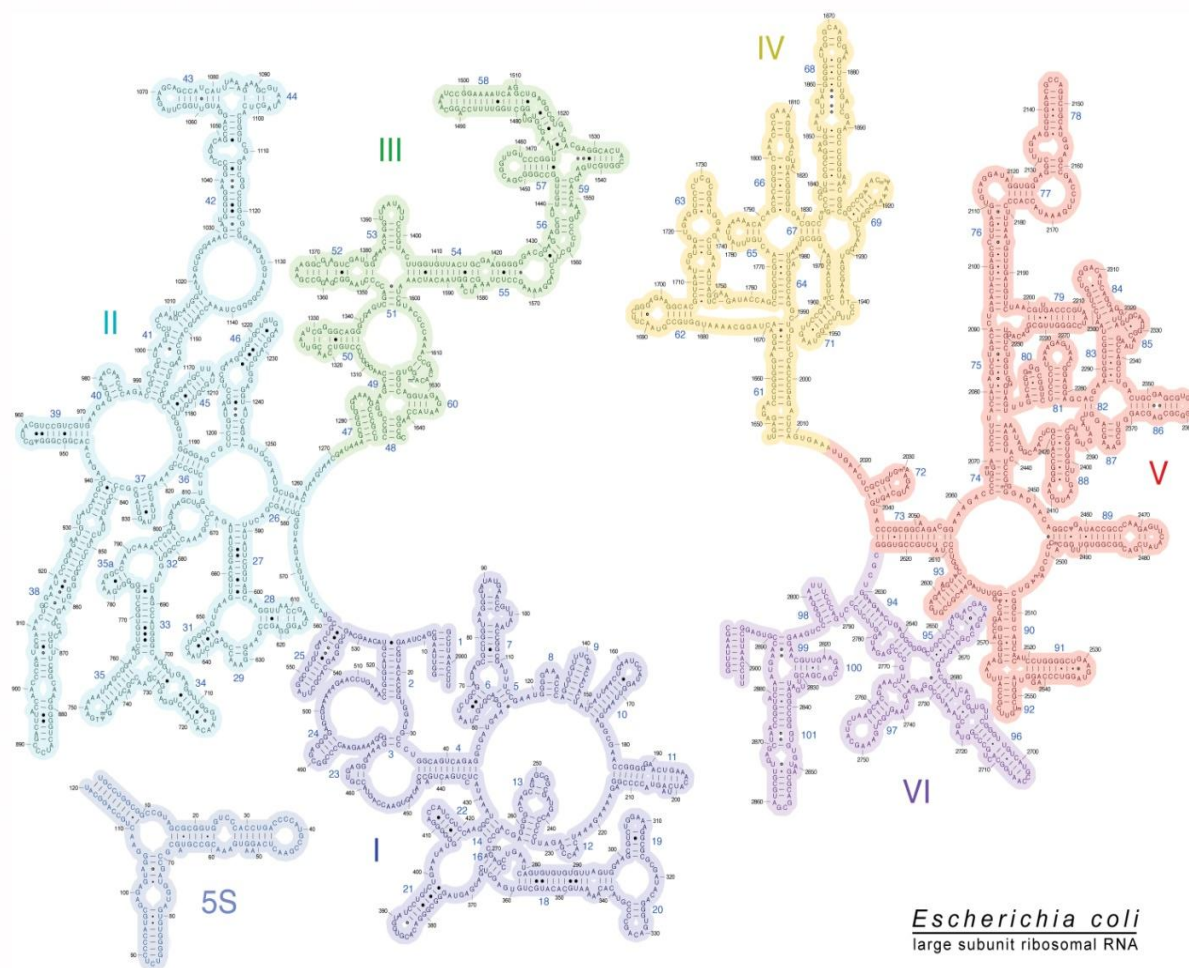
- [37] I. Shvab and R. J. Sadus, "Atomistic water models: Aqueous thermodynamic properties from ambient to supercritical conditions," *Fluid Phase Equilib.*, vol. 407, pp. 7–30, 2015.
- [38] D. A. Case, T. E. Cheatham, T. Darden, H. Gohlke, R. Luo, K. M. Merz, A. Onufriev, C. Simmerling, B. Wang, and R. J. Woods, "The Amber biomolecular simulation programs," *Journal of Computational Chemistry*, vol. 26, no. 16, pp. 1668–1688, 2005.
- [39] B. R. Brooks, C. L. Brooks, A. D. Mackerell, L. Nilsson, R. J. Petrella, B. Roux, Y. Won, G. Archontis, C. Bartels, S. Boresch, A. Caflisch, L. Caves, Q. Cui, A. R. Dinner, M. Feig, S. Fischer, J. Gao, M. Hodoscek, W. Im, K. Kuczera, T. Lazaridis, J. Ma, V. Ovchinnikov, E. Paci, R. W. Pastor, C. B. Post, J. Z. Pu, M. Schaefer, B. Tidor, R. M. Venable, H. L. Woodcock, X. Wu, W. Yang, D. M. York, and M. Karplus, "CHARMM: The biomolecular simulation program," *J. Comput. Chem.*, vol. 30, no. 10, pp. 1545–1614, 2009.
- [40] J. Šponer and F. Lankaš, "Computational studies of RNA and DNA.," *Challenges and Advances in Computational Chemistry and Physics*, vol. 2, pp. 635, 2006.
- [41] W. D. Cornell, P. Cieplak, C. I. Bayly, I. R. Gould, K. M. Merz, D. M. Ferguson, D. C. Spellmeyer, T. Fox, J. W. Caldwell, and P. A. Kollman, "A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids, and organic molecules," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 117, no. 19, pp. 5179–5197, 1995.
- [42] A. Pérez, I. Marchán, D. Svozil, J. Šponer, T. E. Cheatham, C. A. Laughton, and M. Orozco, "Refinement of the AMBER force field for nucleic acids: improving the description of alpha/gamma conformers.," *Biophys. J.*, vol. 92, no. 11, pp. 3817–29, 2007.
- [43] M. Zgarbová, M. Otyepka, J. Šponer, A. Mládek, P. Banáš, T. E. Cheatham, and P. Jurečka, "Refinement of the Cornell et al. Nucleic acids force field based on reference quantum chemical calculations of glycosidic torsion profiles," *J. Chem. Theory Comput.*, vol. 7, no. 9, pp. 2886–2902, 2011.

- [44] P. Banáš, D. Hollas, M. Zgarbová, P. Jurečka, M. Orozco, T. E. Cheatham, J. Šponer, and M. Otyepka, "Performance of molecular mechanics force fields for RNA simulations: Stability of UUCG and GNRA hairpins," *J. Chem. Theory Comput.*, vol. 6, no. 12, pp. 3836–3849, 2010.
- [45] V. Mlýnský, P. Banáš, D. Hollas, K. Réblová, N. G. Walter, J. Šponer, and M. Otyepka, "Extensive molecular dynamics simulations showing that canonical G8 and protonated A38H⁺ forms are most consistent with crystal structures of hairpin ribozyme," *J. Phys. Chem. B*, vol. 114, no. 19, pp. 6642–6652, 2010.
- [46] J. Šponer, P. Banáš, P. Jurečka, M. Zgarbová, P. Kührová, M. Havrila, M. Krepl, P. Stadlbauer, and M. Otyepka, "Molecular dynamics simulations of nucleic acids. from tetranucleotides to the ribosome," *Journal of Physical Chemistry Letters*, vol. 5, no. 10, pp. 1771–1782, 2014.
- [47] M. Zgarbová, F. J. Luque, J. Šponer, T. E. Cheatham, M. Otyepka, and P. Jurečka, "Toward improved description of DNA backbone: Revisiting epsilon and zeta torsion force field parameters," *J. Chem. Theory Comput.*, vol. 9, no. 5, pp. 2339–2354, 2013.
- [48] M. Zgarbová, J. Šponer, M. Otyepka, T. E. Cheatham, R. Galindo-Murillo, and P. Jurečka, "Refinement of the Sugar-Phosphate Backbone Torsion Beta for AMBER Force Fields Improves the Description of Z- and B-DNA," *J. Chem. Theory Comput.*, vol. 11, no. 12, pp. 5723–5736, 2015.
- [49] P. Várnai, D. Djuranovic, R. Lavery, and B. Hartmann, "Alpha/Gamma transitions in the B-DNA backbone," *Nucleic Acids Research*, vol. 30, no. 24, pp. 5398–5406, 2002.
- [50] M. Egli, G. Minasov, L. Su, and A. Rich, "Metal ions and flexibility in a viral RNA pseudoknot at atomic resolution," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 99, no. 7, pp. 4302–4307, 2002.
- [51] I. S. Joung and T. E. Cheatham, "Determination of alkali and halide monovalent ion parameters for use in explicitly solvated biomolecular simulations," *J. Phys. Chem. B*, vol. 112, no. 30, pp. 9020–9041, 2008.
- [52] O. Allnér, L. Nilsson, and A. Villa, "Magnesium ion-water coordination and exchange in biomolecular simulations," *J. Chem. Theory Comput.*, vol. 8, no. 4, pp. 1493–1502, 2012.

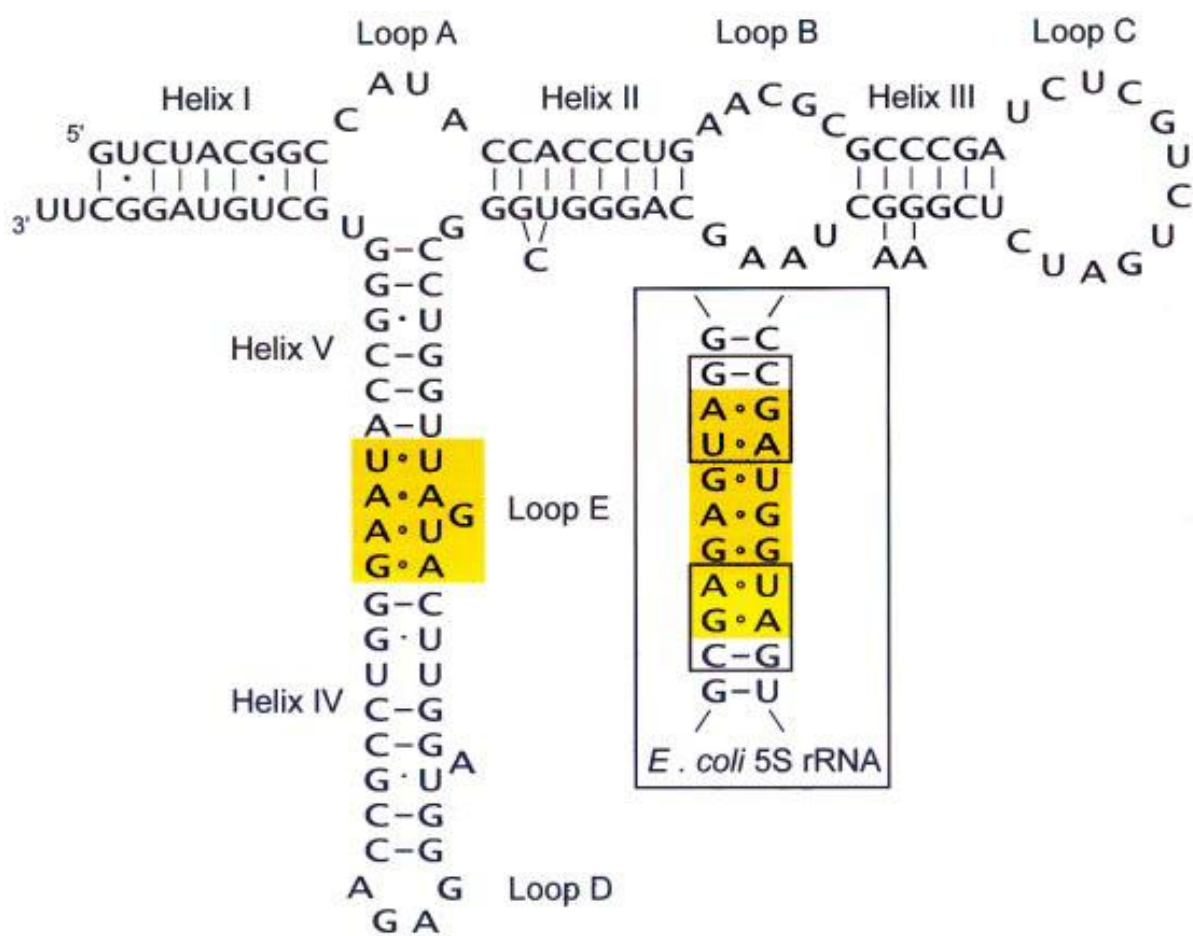
- [53] B. Schneider, Z. Morávek, and H. M. Berman, “RNA conformational classes,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 32, no. 5, pp. 1666–1677, 2004.
- [54] V. N. Maiorov and G. M. Crippen, “Significance of root-mean-square deviation in comparing three-dimensional structures of globular proteins.,” *Journal of molecular biology*, vol. 235, no. 2, pp. 625–634, 1994.
- [55] P. Banáš, P. Sklenovský, J. E. Wedekind, J. Šponer, and M. Otyepka, “Molecular mechanism of preQ1 riboswitch action: A molecular dynamics study,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 116, no. 42, pp. 12721–12734, 2012.
- [56] J. S. Richardson, B. Schneider, L. W. Murray, G. J. Kapral, R. M. Immormino, J. J. Headd, D. C. Richardson, D. Ham, E. HersHKovits, L. D. Williams, K. S. Keating, A. M. Pyle, D. Micallef, J. Westbrook, and H. M. Berman, “RNA backbone: consensus all-angle conformers and modular string nomenclature (an RNA Ontology Consortium contribution).,” *RNA*, vol. 14, no. 3, pp. 465–81, 2008.
- [57] http://rna.ucsc.edu/rnacenter/ribosome_images.html. Dostupné dne 5.4.2016.

7. PŘÍLOHY

Příloha 1. Sekundární struktura 23S podjednotky bakterie *E.coli*, v levém dolním rohu je vyznačena studovaná 5S rRNA. [57]



Příloha 2. Sekundární struktura 5S rRNA. [19]



8. SEZNAM ZKRATEK

Å	angström
AMBER	Assisted Model Building with Energy Refinement
BWYV	beet western yellow virus
DNA	deoxyribonukleová kyselina
HE	Hoogstenova strana (Hoogsteen edge)
CHARMM	Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics
MD	molekulová dynamika
NMR	nukleární magnetická rezonance
RMSD	Root-mean-square-deviation of atomic positions (střední kvadratická odchylka)
RNA	ribonukleová kyselina
SE	strana cukru (sugar edge)
TYMV	turnip yellow mosaic virus (virus žluté mozaiky vodnice)
UV	ultrafialové záření
WC	Watson-Crick
X-Ray	rentgenová