

UNIVERZITA PALACKÉHO OLOMOUČ

Přírodovědecká fakulta
Katedra fyzikální chemie



Analýza chování silových polí při simulacích DNA a RNA

Diplomová práce

2010

Vypracovala: Bc. Ivana Velikovská

Obor: Fyzikální chemie

Vedoucí práce: doc. Petr Jurečka, Ph.D.

Děkuji doc. Petru Jurečkovi, Ph.D. za odborné rady a za neocenitelnou pomoc s vypracováním mé diplomové práce. Dále děkuji za pomoc během svého studia všem zaměstnancům katedry Fyzikální chemie.

Prohlašuji, že jsem svou diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením doc. Petra Jurečky, Ph.D. za použití citované literatury.

V Olomouci dne

.....

podpis

OBSAH

OBSAH	4
ÚVOD	6
TEORETICKÁ ČÁST	7
1. Nukleové kyseliny	8
1.1 Objev DNA.....	8
1.2 Stavba DNA a RNA.....	8
1.3 Struktura DNA a RNA.....	12
1.4 Formy DNA a RNA.....	12
1.4.1 Torzní úhly cukrfosfátové páteře.....	16
1.4.2 Úhel χ (γ)	21
1.4.3 Konformace páteře DNA a RNA.....	23
1.4.3.1 Konformace cukru	25
1.4.4 Strukturní parametry	26
2. Výpočetní chemie.....	28
2.1 Empirický potenciál pro DNA a RNA.....	28
2.1.1 van der Waalsovy parametry	33
2.1.2 Permittivita (ϵ)	34
2.1.2.1 Explicitní rozpouštědlo	35
2.1.2.2 Implicitní rozpouštědlo	36
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	37
3. Cíl práce	38
4. Metody	38
5. Výsledky a diskuse	39
5.1 Korelace strukturních parametrů s úhly cukrfosfátové páteře a s úhlem χ	39
5.1.1 B-DNA	41
5.1.2 A-RNA	43
5.1.3 Z-DNA.....	44
5.1.4 Korelační tabulky a tabulky směrnic	45
5.1.5 Variabilita korelací v závislosti na sekvenci.....	52
5.2 Modifikace parametrů silového pole	54

5.2.1	Permitivita	54
5.2.2	Úhel χ	56
5.2.2.1	Změna fáze úhlu χ	57
5.2.2.2	Amplituda úhlu χ	60
5.3	van der Waalsovy parametry	64
ZÁVĚR		70
SUMMARY		72
PŘÍLOHY		74
Použitá literatura		78
Použité zkratky.....		81

ÚVOD

DNA (deoxyribonukleová kyselina) a RNA (ribonukleová kyselina) jsou nepostradatelnou součástí organismů. Každá z nich má své esenciální funkce, bez kterých by život nebyl možný. Výjimečností biologické makromolekuly DNA je především to, že předurčuje vývoj a vlastnosti celého živého organismu, neboť uchovává a přenáší genetické informace, kdy bez RNA by nedocházelo k jejich přepisu.

Zájem teoretických chemiků o DNA a RNA je obrovský a to především díky stále dokonalejším MD simulacím, neboť narůstá dostupnost rychlejších paralelních počítačů a také dochází ke zdokonalování silových polí. Současná silová pole pro nukleové kyseliny poskytují dobré výsledky pro dvojšroubovice DNA, avšak ne vždy jsou tak důvěryhodná také pro variabilnější RNA struktury. Je proto snaha zjistit, které parametry silového pole vyžadují změnu a opravit je. Tento proces je však velmi pomalý a nesnadný.

Také má diplomová práce se bude zabývat počítačovými simulacemi nukleových kyselin. Důvodem sepsání této diplomové práce byl fakt, že některé ze základních strukturních parametrů, které charakterizují makromolekulu, nejsou v současných silových polích zcela v pořádku. Jedná se například o hodnoty helikálního twistu, propelleru, α / γ , ϵ / ζ torzí či velikost malého a velkého žlábků (vzdálenost fosfátů v cukr-fosfátové páteři). Ve své diplomové práci se zaměřím na helikální twist a velikost žlábků.

Cílem této práce bude zjistit, které parametry silového pole ovlivňují vybrané strukturní parametry a jak se makromolekula jako celek chová v závislosti na změně parametrů, jako například permitivita, torzní úhel χ či van der Waalovy parametry. V rámci diplomové práce budu také zkoumat korelace parametrů silového pole se strukturními parametry molekul nukleových kyselin pomocí vytvořených korelačních tabulek a dále budu tyto závislosti charakterizovat jejich směnicemi. Navíc porovnáím vliv použitého modelu rozpouštědla na základní strukturní charakteristiky makromolekul DNA a RNA.

TEORETICKÁ ČÁST

1. Nukleové kyseliny

DNA a RNA jsou nepostradatelné biologické makromolekuly. U eukaryotních organismů se DNA vyskytuje v buněčném jádře (kde je hlavní součástí chromosomů) nebo v buněčných organelách jako jsou mitochondrie a chloroplasty. U prokaryotních organismů je uložena v cytoplasmě. Mezi její základní vlastnosti patří schopnost replikace, transkripce a mutace. [1] RNA se vyskytuje nejčastěji v cytoplasmě, ribozómu či jadérku. Mezi její hlavní funkce patří schopnost nést informaci o primární struktuře proteinů (sekvence aminokyselin), schopnost transportu aminokyselin k ribozómu či její stavební funkci v ribozómu. [2]

1.1 Objev DNA

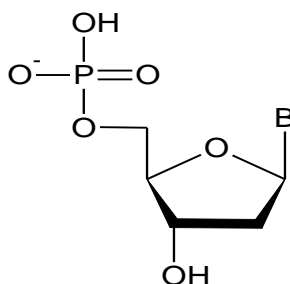
DNA byla vyizolována již v roce 1869 švýcarským lékařem Miescherem [2] z bílých krvinek hnisu. Avšak vzorek nebyl nedostatečně čistý vzorek pro další zkoumání.

V padesátých letech 20. stol. vyhotovila Rosalind Franklin rentgenové snímky DNA molekuly. Watson s Crickem se začali této problematice věnovat, využili také výsledků práce M. Wilkinse a v květnu 1953 publikovali v časopise Nature článek s názvem „A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid“, [3] za což jim byla v roce 1962 udělena prestižní Nobelova cena „Za objev molekulové struktury nukleových kyselin a jejich významu pro přenos dědičné informace“ v kategorii fyziologie a medicína. Rosalind Franklinová zemřela několik let před udělením této ceny na rakovinu, čímž se jí ceny nedostalo. [2]

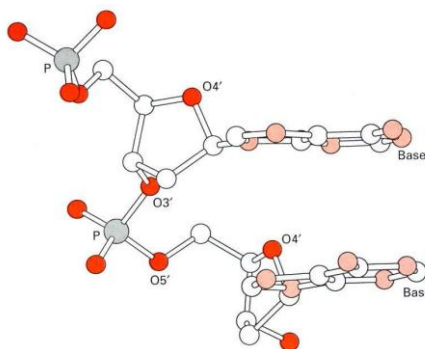
1.2 Stavba DNA a RNA

Makromolekula DNA je vysoce orientovaný polymer. Jedná se o dvojšroubovici asi 2nm širokou se vzdáleností jedné otáčky asi 3,4nm. [4] Dvojšroubovice je složena ze dvou opačně orientovaných řetězců nukleotidů. Každý nukleotid obsahuje tři základní části, kterými jsou fosfát, sacharid (pentóza), dusíkatá heterocyklická báze (viz Obrázek 1) a pojí se tak, jak je znázorněno na Obrázku 2.

Obrázek 1. Struktura nukleotidu (B = A, G, C, T).



Obrázek 2. Konformace dvou následných nukleotidů (obrázek převzat z [5]).



Fosfátem rozumíme zbytek kyseliny fosforečné. Jedna OH skupina kyseliny fosforečné, nezapojující se do struktury DNA, ve vodném prostředí odštěpuje vodík, čímž zůstává na fosfátu záporně nabitý kyslík, který dává celé makromolekule záporný náboj.

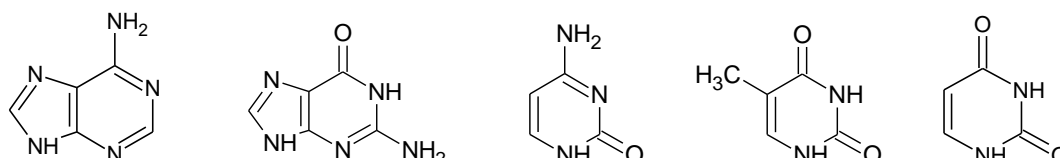
Cukrem je pětiuhlíková pentóza, deoxyribóza, která má na rozdíl od klasické ribózy o jednu OH skupinu na C2' uhlíku méně. Přes C5' a C3' uhlíky deoxyribózy jsou navázány fosfáty. Deoxyribosové jednotky jsou spojeny 3'-5'-fosfodiesterovou vazbou. Vazba deoxyribózy s dusíkatou bází se nazývá N-glykosidová vazba.

Nukleové báze jsou dusíkaté aromatické heterocyklické sloučeniny, obsahující jak akceptory tak donory vodíkových vazeb. Jsou to polární látky s velkým dipólovým momentem. [6]

Základem nukleových bází je purin nebo pyrimidin. Mezi purinové báze řadíme adenin (A) a guanin (G), mezi pyrimidinové báze cytosin (C), tymin (T) a uracil (U),

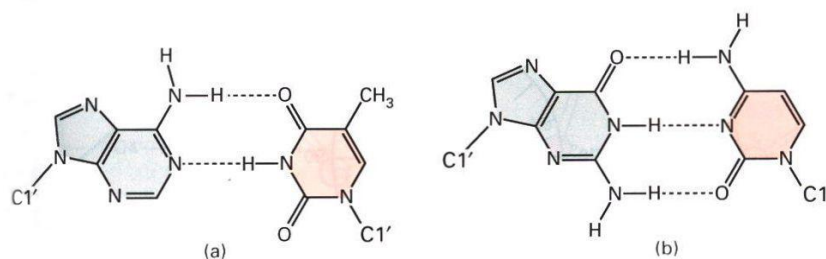
který ovšem náleží mezi báze RNA (viz Obrázek 3). Purinové báze se k C1' uhlíku deoxyribózy váží pomocí N9 dusíku a pyrimidinové báze se k C1' uhlíku deoxyribózy váží pomocí N1 dusíku.

Obrázek 3. Nukleové báze: adenin, guanin, cytosin, thymin, uracil.



Tyto báze jsou ve dvojšroubovici DNA párovány kanonicky podle principu komplementarity (Watson-Crickovo párování bází), neboli vždy se spojuje adenin s thyminem (DNA) nebo uracilem (RNA) a cytosin s guaninem (viz Obrázek 4). Báze jsou mezi sebou spojeny pomocí nekovalentní vodíkové vazby. Díky těmto nekovalentním vodíkovým vazbám a také patrovým (angl. stacking) interakcím mezi dusíkatými bázemi nad sebou je celá makromolekula DNA stabilizována ve své kanonické geometrii. [6]

Obrázek 4. Watson-Crickovo párování bází. (a) A = T, (b) G ≡ C (obrázek převzat z [5]).



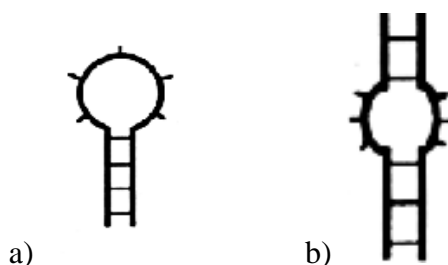
Neméně důležitou nukleovou kyselinou je RNA (ribonukleová kyselina). RNA je stejně jako DNA polymer, který se skládá z purinových a pyrimidinových dusíkatých bází, sacharidů a fosfátů. I přesto, že jsou DNA a RNA obě nukleovými kyselinami, můžeme mezi nimi najít značné rozdíly. Prvním z nich je odlišná dusíkatá báze. RNA namísto thyminu (T) obsahuje uracil (U). Dalším rozdílem je sacharid. RNA obsahuje

namísto 2'-deoxyribosy ribózu, díky které získává RNA značnou variabilitu. RNA netvoří dvoušroubovici, nýbrž pouze jeden řetězec, ve kterém nemusí být obsah guaninu stejný jako cytosinu či adeninu jako uracilu, jak je tomu v DNA, o čemž pojednávají Chargaffova pravidla. [2] RNA se vyskytuje na rozdíl od DNA v několika formách. Jsou jimi mRNA (messenger), tRNA (transfer) a rRNA (ribosomální), které se značně liší ve velikosti. [2]

RNA může být na rozdíl od DNA kanonická i nekanonická. Nekanonicita RNA znamená, že může obsahovat páry dusíkatých bází, které nejsou vázány pomocí Watson-Crickova párování. V RNA není tak striktní párování jako u DNA, protože RNA má velice variabilní možnosti párování a může zde vznikat mnoho různých párů na jednom vlákně. Hlavní způsoby, kterými se RNA může párovat, popsal Neocles B. Leontis, který pro ně také zavedl značení. [7]

RNA obsahuje ve své struktuře několik skupin charakteristických motivů, jako jsou tzv. loopy, stemy, pseudoknoty, Kink-turny a mnoho dalších. Loopy neboli „smyčky“ vznikají v RNA v případě, kdy řetězec nukleotidové sekvence obsahuje nepárové báze. Většinou se jedná o tři takto nespárované báze. „Smyčka“ se může vytvořit buď na konci řetězce (viz Obrázek 5 a)) nebo uprostřed řetězce (viz Obrázek 5 b)).

Obrázek 5. Struktura smyčky: a) na konci řetězce, b) uprostřed řetězce (obrázek převzat z [8]).



Stemy neboli „ramena“ vznikají v důsledku tvorby loopu v řetězci. Kink-turny jsou opakující se 3D architektonické motivy RNA, které obsahují dva stemy (ramena) spojené loopem (kloubem). Jsou charakteristické nekanonickým párováním bází. K-turny vykonávají kloubový pohyb, při kterém dochází k natahování a vzájemnému přitahování ramen. Mnoho Kink-turnů má funkci při translaci proteinů. [9]

Všechny tyto vlastnosti RNA způsobují, že popis její struktury je velmi náročný na kvalitu empirického potenciálu. Nedokonalost potenciálu je způsobena hlavně tím, že byl konstruován pro kanonické struktury, jako např. dvojšroubovice DNA.

1.3 Struktura DNA a RNA

Nukleové kyseliny mají primární a sekundární strukturu. Primární struktura je u obou nukleových kyselin relativně podobná. Jedná se o pořadí nukleotidů v polynukleotidových řetězcích. V pořadí nukleotidů DNA jsou zakódovány genetické informace neboli genetický kód. Sekundární struktura určuje nukleovým kyselinám jejich uspořádání v prostoru, tedy tvar makromolekul, což vytváří hlavní vizuální rozdíly mezi DNA a RNA.

1.4 Formy DNA a RNA

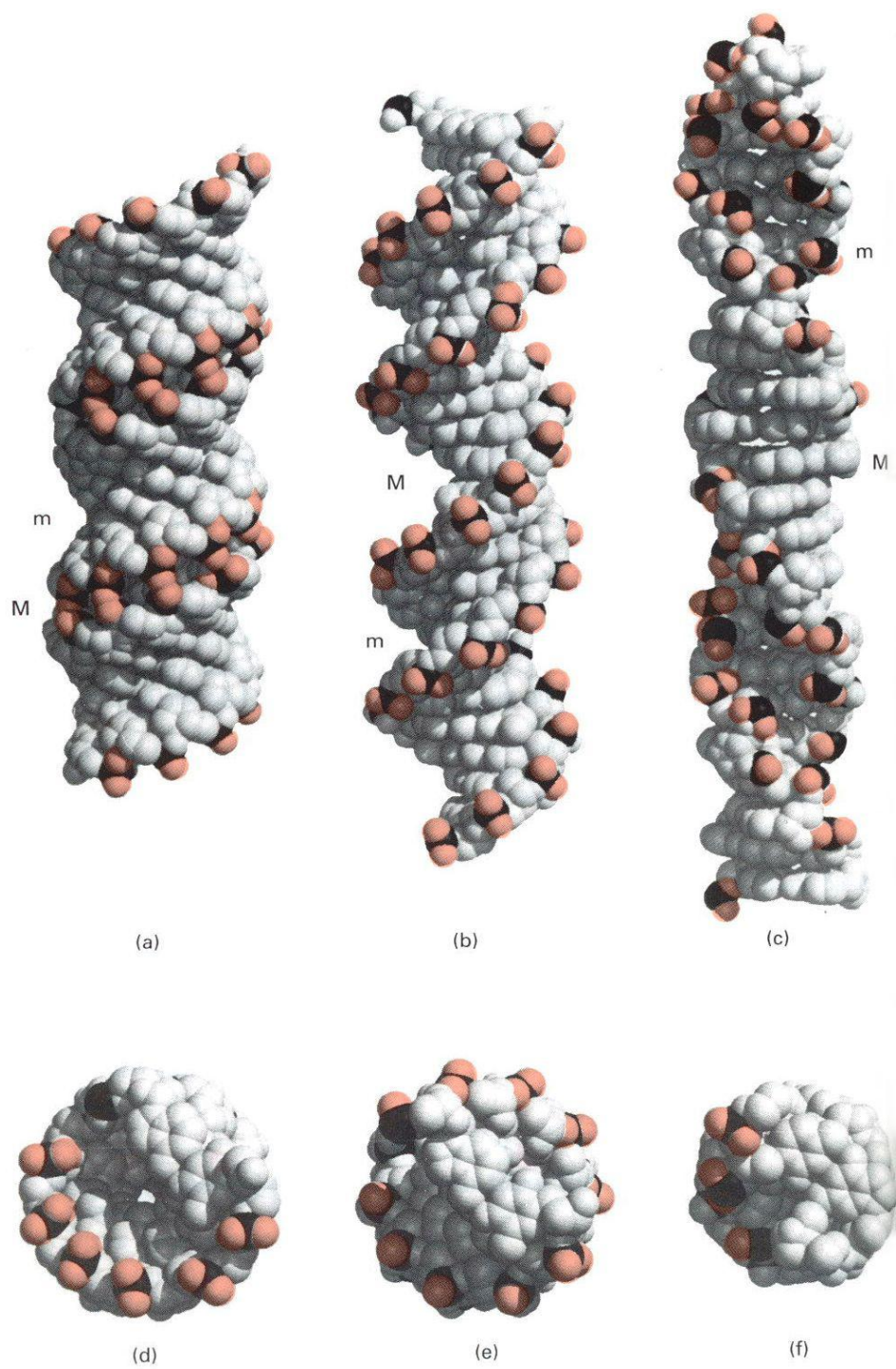
DNA se vyskytuje ve třech základních formách, kterými jsou pravotočivá A a B forma a levotočivá Z forma (Obrázek 6 a Obrázek 7). Nejběžnější a ve vodném prostředí nejstabilnější je forma B-DNA. Nejméně se vyskytující a nejméně stálá je Z-DNA forma. Forma A-DNA se vyskytuje především v místech se zvýšenou iontovou silou a pokud je DNA dehydratována. [2], [10]

Tyto formy se liší v počtu párů bází na otáčku, v průměru vlákna a vzhledu malého a velkého žlábků. Základní charakteristiky jednotlivých forem DNA jsou zapsány v Tabulce 1.

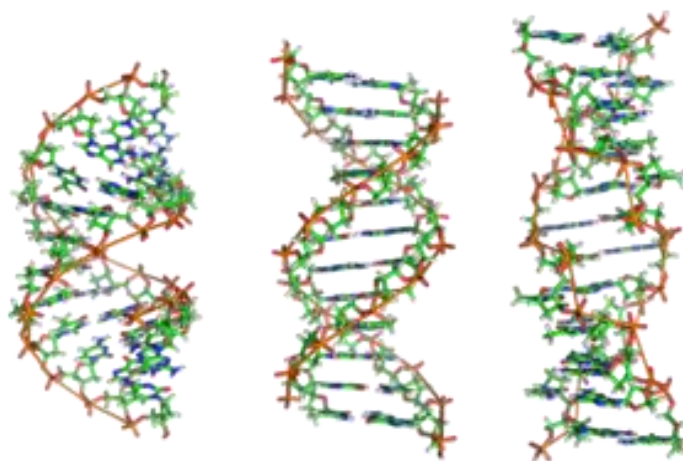
Tabulka 1. Charakteristika forem DNA (tabulka převzata z [10]).

DNA konformace	Helikální otáčivost	Počet párů bází na otáčku	Průměr vlákna (nm)	Velký žlábek	Malý žlábek
B	Pravotočivá	10,5	~ 2,0	Široký, hluboký	Úzký, hluboký
A	Pravotočivá	11,0	~ 2,6	Úzký, hluboký	Široký, mělký
Z	Levotočivá	12,0	~ 1,8	Plochý	Úzký, hluboký

Obrázek 6. Zobrazení (a) A-DNA, (b) B-DNA, (c) Z-DNA, (d – f) pohled na jednotlivé formy zdola, M – velký žlábek, m – malý žlábek (obrázek převzat z [5]).

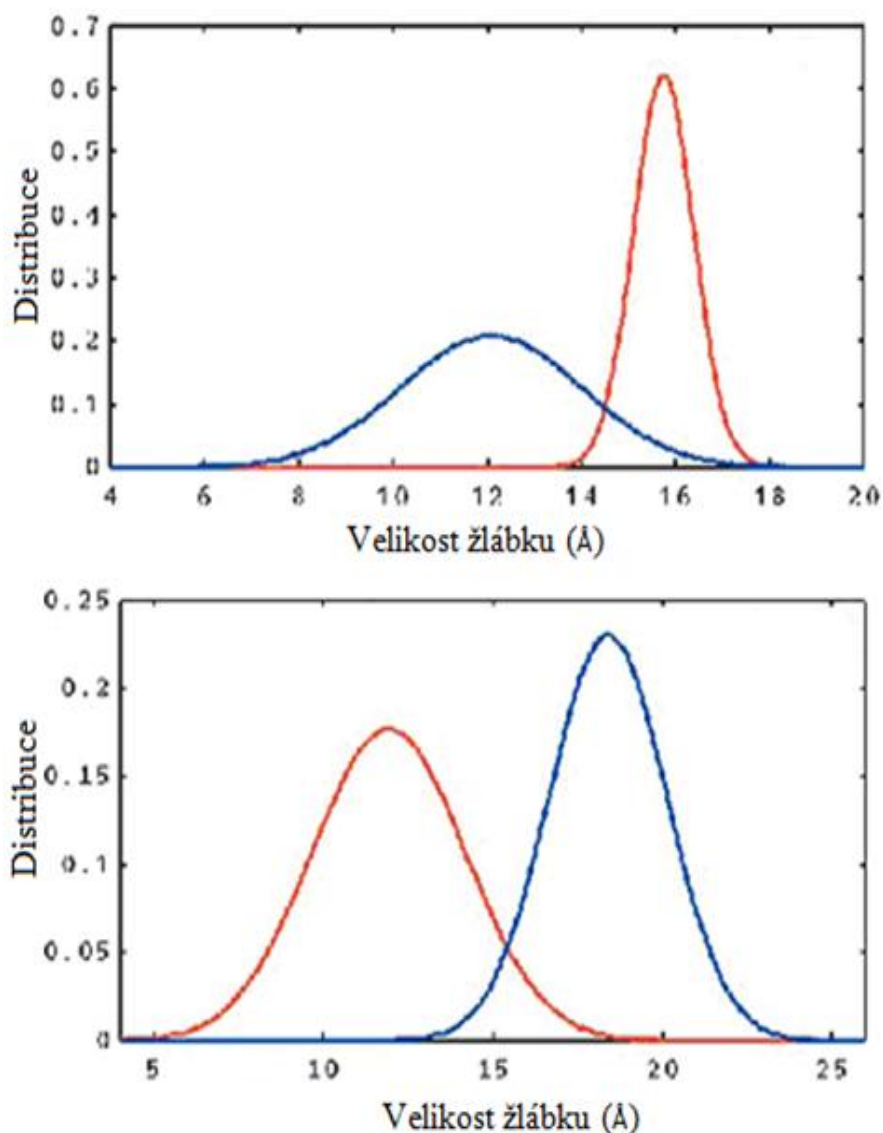


Obrázek 7. Formy DNA: A-DNA, B-DNA, Z-DNA (obrázek převzat z [1]).



Protože jedním z témat, kterému se věnuje tato práce je velikost žlábků nukleových kyselin, uvádím i obrázek distribuce těchto velikostí v MD simulacích (Obrázek 8).

Obrázek 8. Distribuce šířky (Å) malého žlábků (horní obrázek) a velkého žlábků (dolní obrázek) DNA - modře a RNA - červeně (MD simulace, obrázek převzat z [11]).



RNA stejně jako DNA může nabývat různých forem. Nejčastější a nejpravidelnější formou je A-RNA. Druhou známou formou RNA je A'-RNA. Liší se od sebe tím, že A-RNA je 11-otáčkový helix, zatímco A'-RNA je 12-otáčkový helix. Dalším rozdílem je také velikost žlábků (viz Tabulka 2).

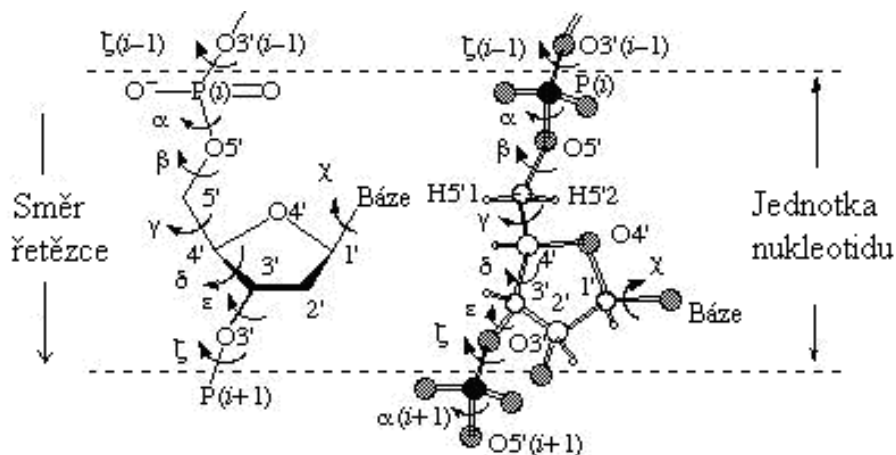
Tabulka 2. Charakteristika žlábků pro jednotlivé formy RNA (analýza difrakce vlákna: X-ray, tabulka převzata z [12]).

	Velký žlábek – šířka (Å)	Velký žlábek hloubka (Å)	Malý žlábek šířka (Å)	Malý žlábek hloubka (Å)
A-RNA	4,7	12,9	10,8	3,3
A'-RNA	8,9	14,4	10,5	3,4

1.4.1 Torzní úhly cukrfosfátové páteře

Všechny části nukleotidu jsou vůči sobě určitým způsobem orientovány. Torzní úhly vyjadřují sterické interference mezi rezidui v polynukleotidu. Těmito úhly v DNA jsou α , β , γ , δ , ϵ , ζ a χ [8]. Jednotlivé úhly jsou zakresleny na Obrázku 9 a jejich typické hodnoty pro DNA jsou zapsány v Tabulce 3 a pro RNA v Tabulce 4. Obrázek 10 znázorňuje distribuce vybraných úhlů DNA a RNA.

Obrázek 9. Torzní úhly páteře DNA (obrázek převzat z [13]).



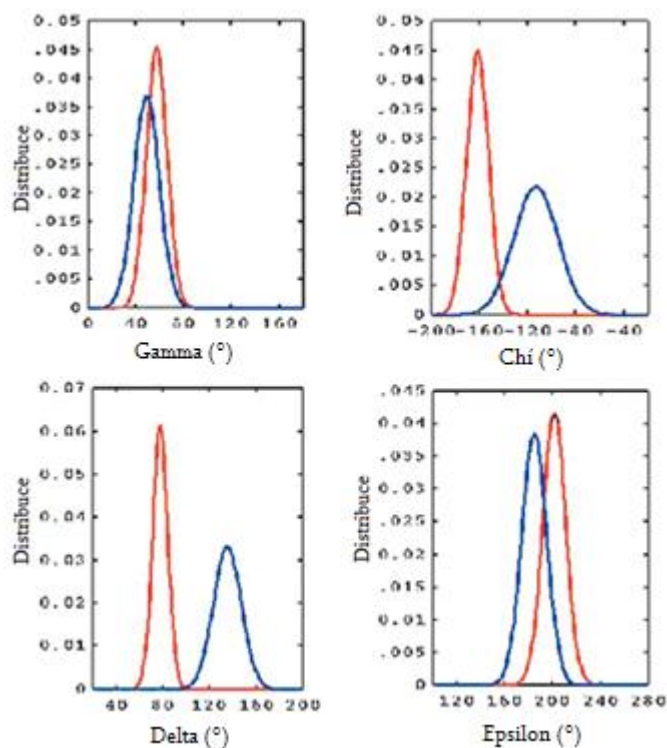
Tabulka 3. Průměrné hodnoty torzních úhlů DNA (ve °) (analýza difrakce vlákna: X-ray, tabulka převzata z [12]).

	α	β	γ	δ	ϵ	ζ	χ
A-DNA	-52	175	42	79	-148	-75	-157
B-DNA	-30	136	31	143	-141	-161	-98
Z-DNA (C rezidua)	-140	-137	51	138	-97	82	-154
Z-DNA (G rezidua)	52	179	-174	95	-104	-65	59

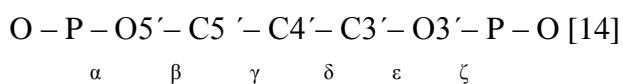
Tabulka 4. Průměrné hodnoty torzních úhlů RNA (ve °) (analýza difrakce vlákna: X-ray, tabulka převzata a upravena z [12]).

		α	β	γ	δ	ϵ	ζ	χ
A'-RNA	Adenin	-69	179	55	82	-154	-71	-161
	Thymin	-64	178	51	83	-152	-173	-161
A-RNA		-70	177	61	77	-153	-70	-163

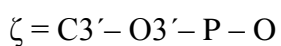
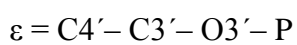
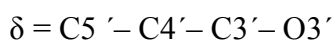
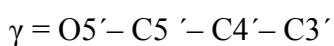
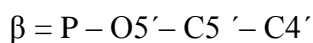
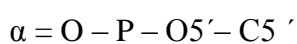
Obrázek 10. Distribuce některých úhlů DNA - modře a RNA - červeně (MD simulace, obrázek převzat z [11]).



Jednotlivé torzní úhly cukrfošfátové páteře DNA (α , β , γ , δ , ϵ , ζ) můžeme znázornit následovně jako dihedrální úhly:



tedy: [14]



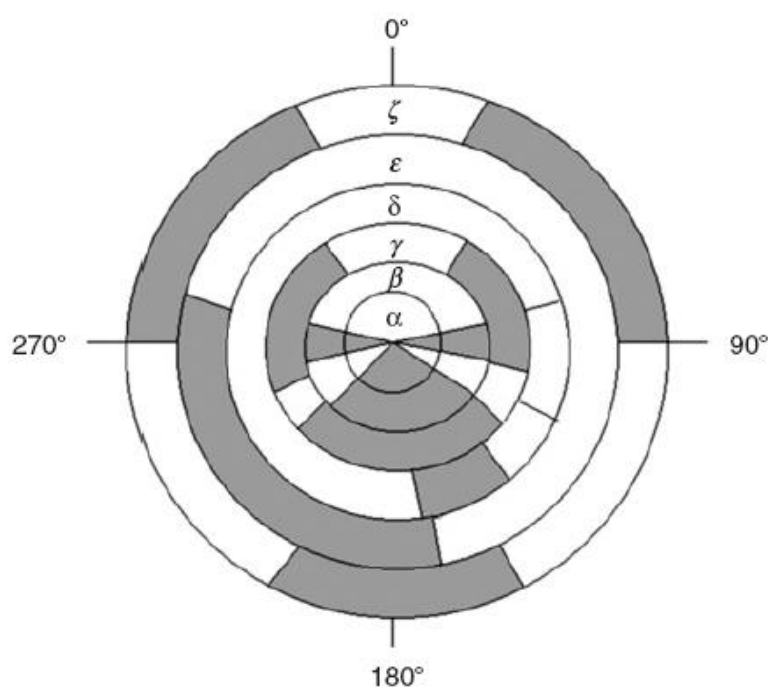
Atomové jména znázorňuje Obrázek P-1, Obrázek P-2, Obrázek P-3, Obrázek P-4, Obrázek P-5, Obrázek P-6.

Mezi některými úhly páteře můžeme pozorovat výrazné korelační vztahy, z čehož vyplývá také fakt korelačních pohybů v roztoku. [12] Existence takovýchto korelací je důležitá. Mezi nejdůležitější korelace úhlů páteře patří korelace α/γ či ε/ζ nebo korelace mezi úhlem χ a konformací cukru.

Úhly páteře se podle dohody popisují speciálními termíny. Tyto termíny jsou *gauche*⁺(g^+) pro hodnoty $\sim 60^\circ$, *gauche*⁻(g^-) pro -60° a *trans* (t) pro $\sim 180^\circ$. Například úhly α a γ mohou nabývat konformací g^+ , g^- a také t . Úhly α a ζ vykazují vysoký stupeň flexibility v různých krystalových strukturách. Jsou pozorovány v konformacích tg^- , g^-g^- , g^+g^+ . Naproti tomu například úhel β můžeme najít výlučně v konformaci t . [12]

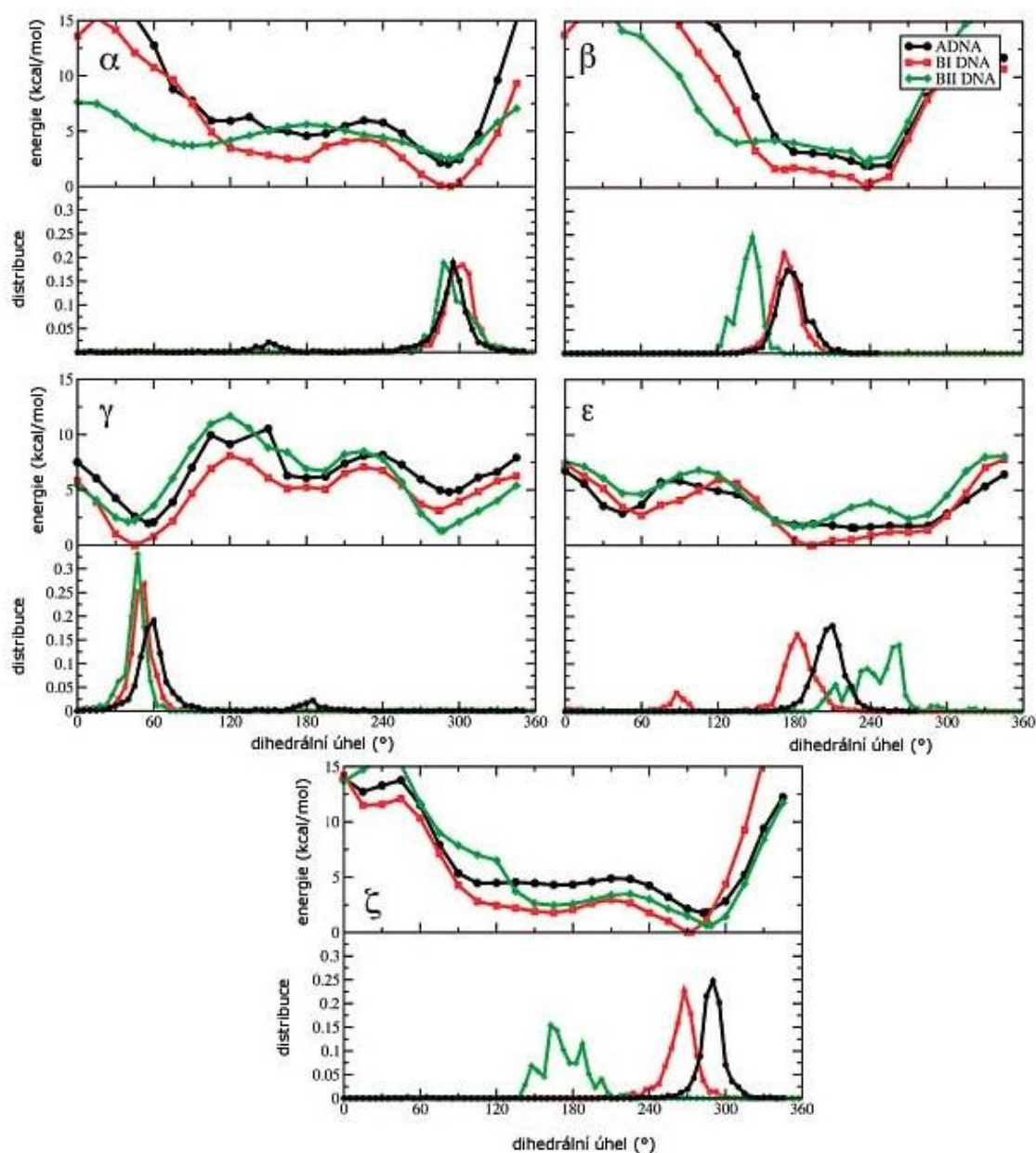
Úhly páteře jsou omezeny pouze na určité diskrétní intervaly a nejsou proto schopny volně přijímat jakékoli hodnoty mezi 0° - 360° . Obrázek 11 ukazuje tyto možné rozmezí.

Obrázek 11. Konformační kolo ukazující povolené rozsahy úhlů cukrfosfátové páteře - vyšrafovaná část (obrázek převzat z [12]).



Každý úhel cukrfosfátové páteře má odlišnou distribuci a plochu potenciální energie. Tyto hodnoty vyjadřuje Obrázek 12.

Obrázek 12. Plocha potenciální energie (MP2/6-31+G(d)//MP2/cc-pVTZ) úhlů α , β , γ , δ , ϵ , ζ pro formy A DNA, B_I DNA a B_{II} DNA (horní obrázek), krystalografická distribuce úhlů α , β , γ , δ , ϵ , ζ pro formy A DNA, B_I DNA a B_{II} DNA (dolní obrázek). (obrázek převzat z [15], definice úhlů viz tamtéž).



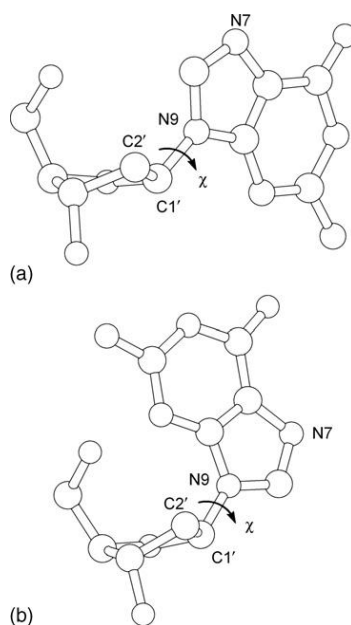
1.4.2 Úhel Chí (χ)

Úhel χ je úhlem otáčení dusíkaté báze vůči deoxyribóze (N-glykosidová vazba), proto se mu také říká glykosidický úhel χ . V purinových bazích je to dihedralní úhel mezi O4'– C1'– N9 – C4 atomy a v pyrimidinových bazích mezi O4'– C1'– N1 – C2 atomy. [14], [16]

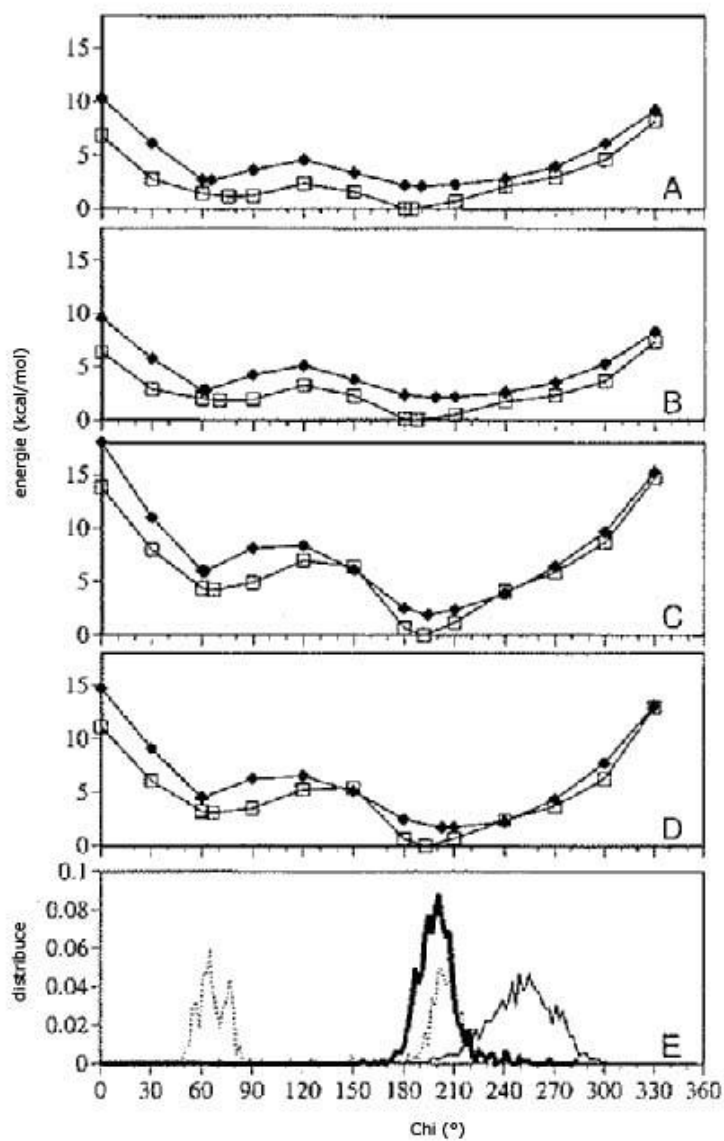
Úhel χ může být vůči pentóze v anti ($-120^\circ > \chi > -180^\circ$), nebo syn ($0 < \chi < 90^\circ$) konformaci [12], přičemž konformace anti je většinou stabilnější než syn. S konformací syn se setkáváme většinou ve formě Z-DNA, ale také u některých bází ve strukturách RNA. Prostorové uspořádání těchto konformací je znázorněno na Obrázku 13.

Potenciální energie a distribuce tohoto úhlu pro všechny formy DNA jsou zakresleny na Obrázku 14.

Obrázek 13. Konformace χ a) χ v anti konformaci, b) χ v syn konformaci (obrázek převzat z [12]).



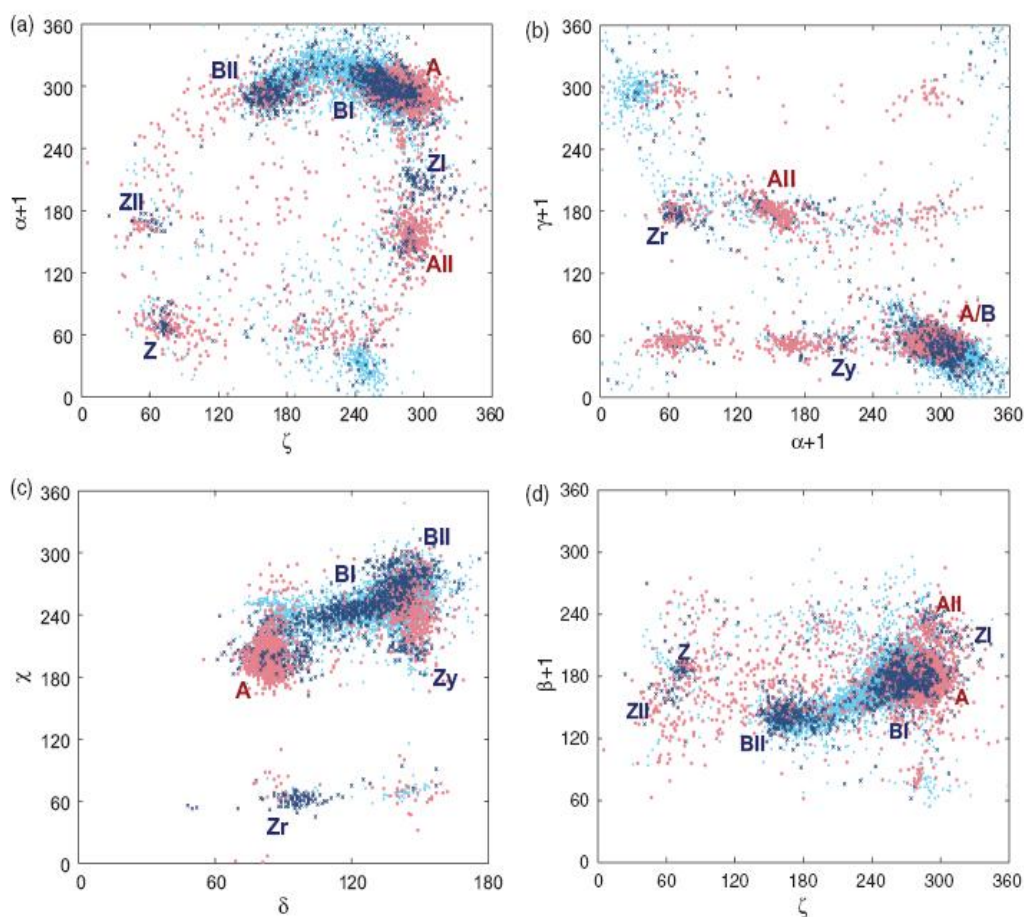
Obrázek 14. Potenciální energie úhlu χ : obrázek A – adenin, B – guanin, C – cytosin, D – thymin, \blacklozenge C2'endo a \square C3'endo konformace, E – distribuce: A DNA (silná čára), B DNA (tenká čára), Z DNA (tečkovaná čára) v krystalu (obrázek převzat z [14], definice úhlů viz tamtéž).



1.4.3 Konformace páteře DNA a RNA

V DNA můžeme pozorovat velké množství konformačních klastrů, které jsou kondenzované do menšího počtu konformačních rodin (B_I , B_{II} , A_I , A_{II} , Z) [17], viz Obrázek 15.

Obrázek 15. Dvojdimenzionální scattergramy tozních úhlů DNA (tmavě modrá), DNA z komplexu (azurová) a RNA (růžová). r – pro puriny, y – pro pyrimidiny (obrázek převzat z [17], definice úhlů viz tamtéž).



Například forma B-DNA se tedy může vyskytovat ve dvou konformacích, které jsou dány především odlišnými ϵ/ζ torzemi. Jedná se o B_I konformaci (ϵ v trans, ζ v g^-) a B_{II} konformaci (ϵ v g^- , ζ v trans). B_I je stabilnější a můžeme ji častěji pozorovat než B_{II} . [14] Správný popis B_I/B_{II} konformací je důležitý pro pochopení specifity interakcí nukleových kyselin s proteiny.

U DNA a RNA jsou případy, kdy dochází ke spřažení dvojice úhlů, kdy existují dvě stabilní kombinace těchto úhlů. Přechody mezi stabilními stavy se někdy označují jako flipy. Nejčastěji se s tímto jevem setkáváme u úhlů α/γ (kanonické konformace (α v g^- , γ v g^+) tj. $-90^\circ, 60^\circ$ a přesmyknuté konformace (α v g^+ , γ v trans) tj. $100^\circ, -160^\circ$) a u úhlů ϵ/ζ viz výše. A-forma i B-forma DNA se přizpůsobují pohybu podobnému pohybu klikové hřídele mezi torzemi α a γ , avšak odlišují se v jeho realizaci. Tento pohyb lze pozorovat u DNA i RNA. [17] Tabulka 5 udává hodnoty pro torzní úhly DNA jednotlivých konformací, Tabulka 6 pro torzní úhly RNA.

Tabulka 5. Torzní úhly v nukleotidech A-formy a B-formy DNA (ve $^\circ$). (RTG data, tabulka převzata a upravena z [17]).

Konformace DNA	$\gamma-1$	$\delta-1$	$\epsilon-1$	$\zeta-1$	α	β	γ	δ	$\chi-1$	χ
A(I)	54	82	-155	-75	-66	172	55	83	-159	-158
B(I)	47	136	-176	-98	-58	179	45	138	-109	-100
B(II)	46	143	-115	-188	-63	142	46	141	-91	-101

Tabulka 6. Torzní úhly v nukleotidech A-formy RNA (ve $^\circ$). (RTG data, tabulka převzata z [18]).

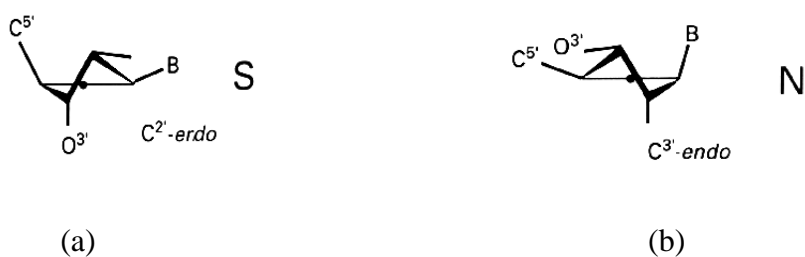
Konformace RNA	$\delta-1$	$\epsilon-1$	$\zeta-1$	α	β	γ	δ
A (1a[18])	81	-148	-71	-65	174	54	81

1.4.3.1 Konformace cukru

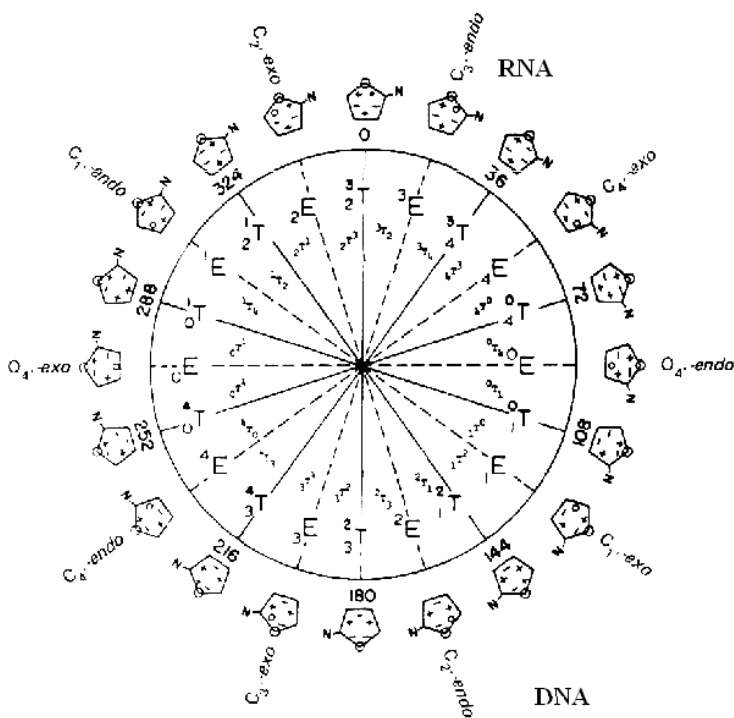
Pětihlíkatý cyklus cukru v nukleotidu není planární, a proto může mít odlišné prostorové uspořádání, odlišnou konformaci (sugar pucker).

Na Obrázku 16 je znázorněna S (C2'-endo) a N (C3'-endo) konformace. Konformace S (C2'-endo) je charakteristická pro DNA, zatímco N (C3'-endo) forma pro RNA (Obrázek 17). [12]

Obrázek 16. Konformace cukru: (a) S – south (C2'-endo) konformace, (b) N – north (C3'-endo) konformace (obrázky převzaty z [8]).



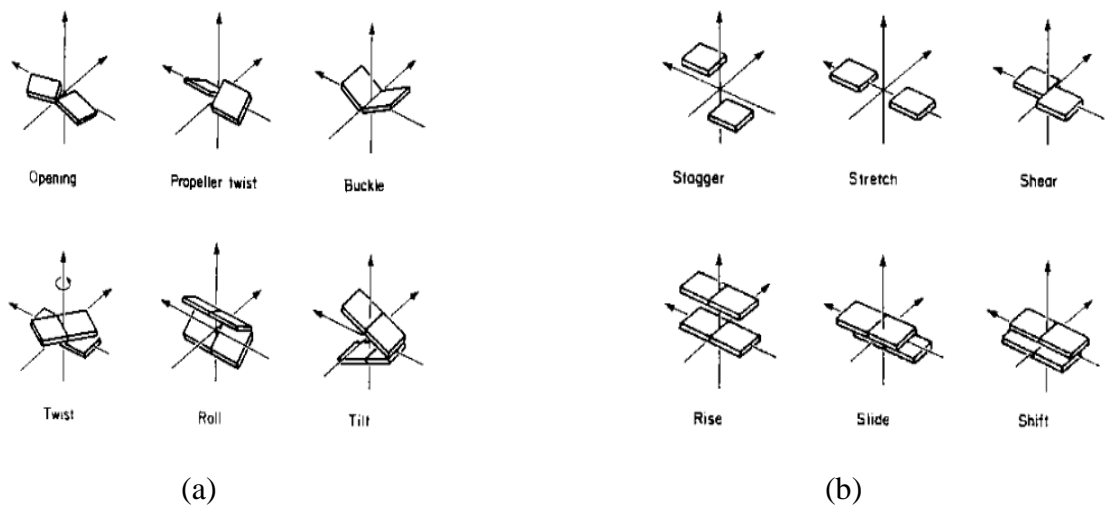
Obrázek 17. Pseudorotační kruh furanosového kruhu v nukleotidu (obrázek převzat a upraven z [8]).



1.4.4 Strukturní parametry

Strukturní parametry jsou dány orientací dusíkatých bází nebo párů bází DNA vůči sobě buď pod určitým úhlem - Obrázek 18 (a) nebo posunem - Obrázek 18 (b). Strukturní parametry se dělí na mezipárové neboli helikální parametry, kterými jsou tilt, roll, twist, shift, slide, rise a mezibázové parametry, kterými jsou buckle, propeller, opening, shear, stretch a stagger. V Tabulkách 7 a 8 jsou zapsány hodnoty vybraných parametrů pro jednotlivé formy DNA a RNA.

Obrázek 18. Strukturní parametry: (a) úhly bází, (b) posun bází (obrázek převzat a upraven z [19]).



Tabulka 7. Hodnoty vybraných parametrů pro jednotlivé formy DNA (analýza difrakce vlákn: X-ray, tabulka převzata z [12]).

	Rise (Å)	Helikální twist (°)	Bázový step Roll (°)	Pár bází Propeller twist (°)
A-DNA	2,54	32,7	0,0	-10,5
B-DNA	3,38	36,0	0,0	-15,1
Z-DNA (C rezidua)	7,25	-49,3	5,6	8,3
Z-DNA (G rezidua)	7,25	-10,3	-5,6	8,3

Tabulka 8. Hodnoty vybraných parametrů pro jednotlivé formy RNA (analýza difrakce vlákn: X-ray, tabulka převzata z [12]).

	Posunutí bází (Å)	Rise (Å)	Helikální twist (°)	Roll (°)	Propeller twist (°)
A-RNA	0,44	2,8	32,7	-0,8	-2,1
A'-RNA	0,51	3,0	30,0	0,0	2,3

2. Výpočetní chemie

Výpočetní chemie je obor chemie, který je založený na teoretickém modelování studovaných systémů. Díky výpočetní chemii můžeme například určit strukturu a energii molekuly, tranzitního stavu, energii vazeb, náboje atomů, dipól momenty, elektronovou hustotu a mnoho jiných vlastností. Jedná se tedy o obor, které využívá k získávání nových poznatků neexperimentální metody. [20] Dále se zaměřím na metody modelování pomocí empirického potenciálu a molekulárně dynamických simulací.

Empirické silové pole je základní nástroj pro studium vztahů mezi strukturou a účinkem nejen biologických makromolekul. Studie, při kterých dochází k používání silového pole, nejenže usnadňují výklad experimentálně získaných dat a jsou schopny experimentální pozorování reprodukovat, ale dokáží také poskytnout detailní pohled na přetrvávající problémy ve struktuře nukleových kyselin. [21], [22] Úspěch empirických silových polí je založen na kvalitě používaných silových polí v kombinaci s algoritmickými postupy.

2.1 Empirický potenciál pro DNA a RNA

Podstatou každého silového pole je funkce potenciální energie, avšak sama o sobě netvoří silové pole. Jedná se o kombinaci funkce potenciální energie s parametry použitými v této funkci. [22]

Celková energie systému je v běžných empirických potenciálech popsána součtem energií kovalentních a nekovalentních příspěvků (viz Rovnice 1). Kovalentními příspěvky jsou připisovány deformaci úhlů (E_a), vazeb (E_b) a torzí (E_t). Nekovalentní příspěvky jsou elektrostatika (E_c) a van der Waalsovy interakce (E_{vdw}). [16]

$$E = E_a + E_b + E_t + E_c + E_{vdw} \quad \text{Rovnice 1}$$

např. torzní příspěvek je modelován pomocí Rovnice 2 [16]

$$E_{\text{torze}} = \sum_{\text{torze}} \sum_n V_n [1 + \cos(n\Phi - \gamma)] \quad \text{Rovnice 2}$$

n je periodičita, V_n rotační bariéra, Φ torzní úhel a γ fázový úhel.

Empirický potenciál není dokonalý, obsahuje parametry, které mohou být nepřesné, z čehož plyne úsilí zjistit které to jsou, prostudovat je a snažit se o jejich zdokonalení.

Ve své diplomové práci jsem používala silové pole pro nukleové kyseliny AMBER (Assisted Model Building with Energy Refinement) [23]. Program AMBER je molekulárně-mechanické silové pole (Cornell *et al.*) [24] pro simulace biomolekul (nukleových kyselin a proteinů) ve výpočetní chemii.

AMBER byl vytvořen skupinou lidí kolem Petra Kolmana na Kalifornské Univerzitě v San Franciscu.[25] Obsahuje několik desítek programů určených pro molekulární modelování a simulace, výpočty molekulové mechaniky až po analýzu získaných výsledků. Jedním z programů AMBERu je Sander. Jedná se o program, pomocí něhož se provádí energetické minimalizace a molekulárně dynamické simulace. Rychlejší a lépe škálující verzi Sanderu je Pmemd. Dále je to například LEaP, který je určen pro tvorbu vstupních souborů simulací. Ptraj slouží například k analýze MD trajektorií. [25], [26]

Další často používané silové pole pro nukleové kyseliny kromě Cornell *et al.* je CHARMM [27]. Obě tato silová pole poskytovala stabilní simulace nukleových kyselin, avšak obě měla systematické chyby a problémy, proto došlo k vývoji dokonalejších silových polí, které se snažily tyto chyby opravovat či alespoň minimalizovat. U CHARMM22 byla silná náchylnost k A formě DNA i při nízkých koncentracích solí. Tento problém vedl k úplné reoptimalizaci a změně na CHARMM27. Problémy silového pole AMBER parm94 byly spojené s konformací cukru a vybranými torzními parametry. Tento fakt vedl ke změně silového pole na parm98 a později parm99.

Dodnes mezi známé nedostatky empirického potenciálu patří například popis konformací B_I/B_{II} nebo úhlů α , γ a χ . Návrh zlepšených parametrů navíc komplikuje to, že parametry nelze měnit nezávisle, protože jejich účinky na výslednou strukturu jsou složitě propojeny. Mezi nejznámější propojení patří spřažení úhlů α/γ , ϵ/ζ nebo úhlu χ s konformací cukru.

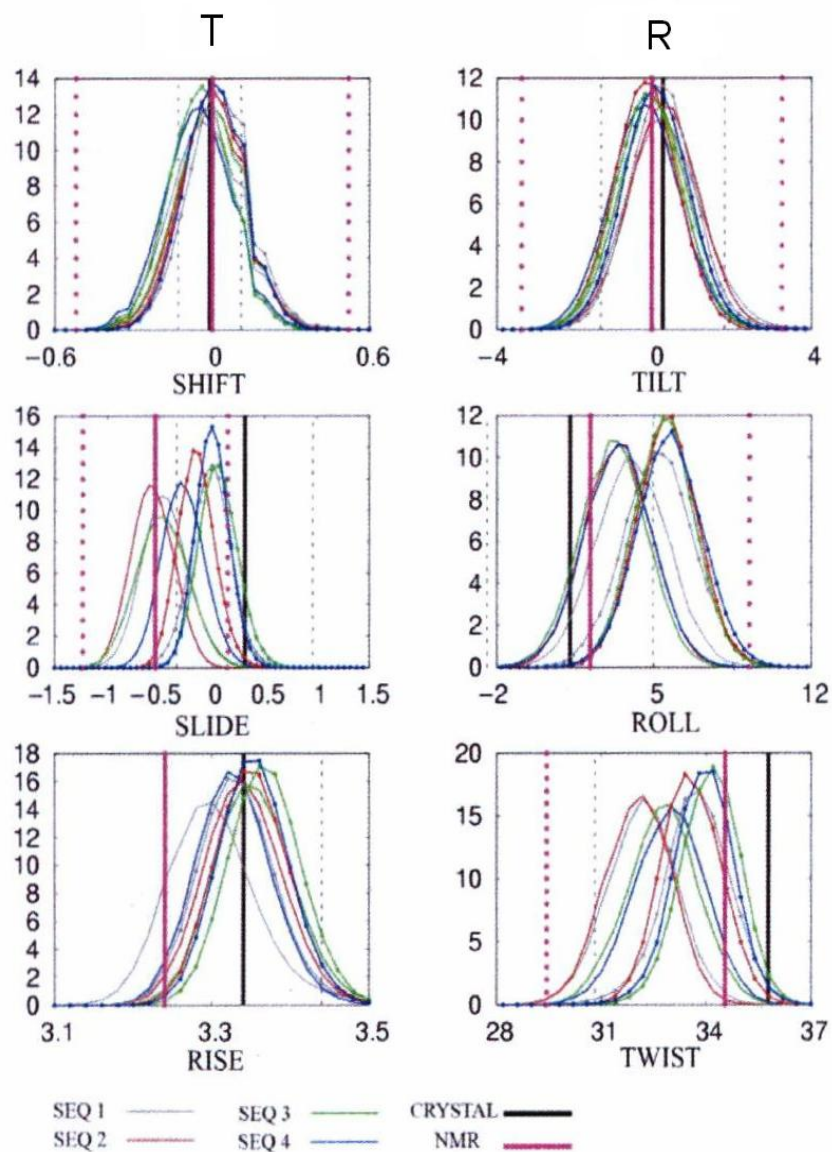
Mezi další strukturální parametry, které vykazují v MD simulacích se silovým polem parm99bsc0 nezanedbatelné odchylky, patří helikální twist. Obrázek 19 ukazuje odchylky mezipárových parametrů pro několik různých sekvencí DNA (viz původní článek [28]). Twist byl zjištěn teoreticky s použitím silových polí Parmbsc0 a CHARMM27, experimentálně z rentgenové difrakce a NMR (Tabulka 9). [28] Dalšími relativně nepřesnými parametry jsou vzdálenosti fosfátů v cukrfosfátové páteři neboli

velikost malého a velkého žlábků (viz Obrázek 20). Velikost malého a velkého žlábků byla zjištěna teoreticky z MD simulací s použitím silových polí Parmbsc0 a CHARMM27 a experimentálně z rentgenové difrakce a NMR (Tabulka 9) [28].

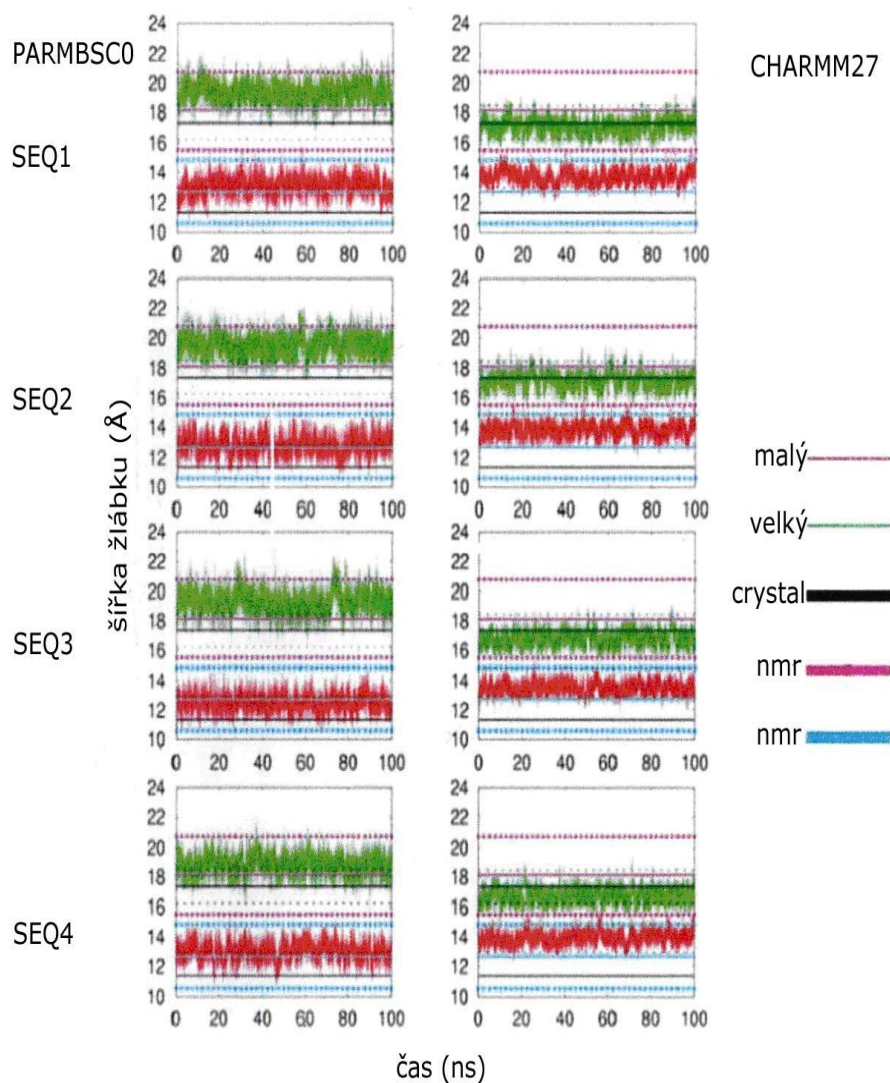
Tabulka 9. Velikost twistu a velikost velkého a malého žlábků (data převzata z [28]).

Metoda	Twist (°)	Velký žlábek (Å)	Malý žlábek (Å)
Parmbsc0	33	19	12 - 13
CHARMM27	35	17	13 - 14
X-ray	35,5	17	11
NMR	34,5	18,2	12,8

Obrázek 19. T – translační strukturální parametry - shift, slide, rise, R-rotační strukturální parametry - tilt, roll, twist, (obrázek převzat z [28]; různé barvy odpovídají různým DNA sekvencím, viz původní článek).



Obrázek 20. Vývoj šířky žlábků v čase pro silová pole parmbsec0 a CHARMM27 (obrázek převzat z [28]; různé barvy odpovídají různým DNA sekvencím, viz původní článek).



Přestože relativně velké odchylky mají i např. roll, helikální twist je považován za důležitější parametr, protože i relativně malé chyby, které nejsou větší než jednotky stupňů či angströmů, se při spirálovém zatočení DNA nakumulují a ve výsledku dochází ke vzniku relativně velké chyby.

2.1.1 van der Waalsovy parametry

vdW interakce popisujeme nejčastěji pomocí 6-12 Lennard – Jonesova potenciálu. Jedná se o jednoduchý matematický model, který popisuje slabé interakce repulzního a disperzního typu. Byl navržen již v roce 1924 anglickým matematikem Johnem Lennardem-Jonesem [29], [30]. K jeho matematickému popisu jsou používány různé matematické rovnice (viz Rovnice 3 [30], Rovnice 4 [30], Rovnice 5 [30], které se liší významem parametrů.

$$V(r) = 4 \cdot \varepsilon \cdot [(\sigma / r)^{12} - (\sigma / r)^6] \quad \text{Rovnice 3}$$

ε je hloubka minima, σ je vzdálenost, na které je potenciál nulový, r je vzdálenost mezi částicemi. Člen r^{-12} vyjadřuje vzájemné odpuzování neboli Pauliho repulzi a člen r^{-6} vzájemnou přitažlivost dvou částic (disperzní energie). S přibližováním dvou částic dochází k nejprve k poklesu energie a následně k jejímu obrovského vzrůstu, což vyjadřuje Obrázek 21.

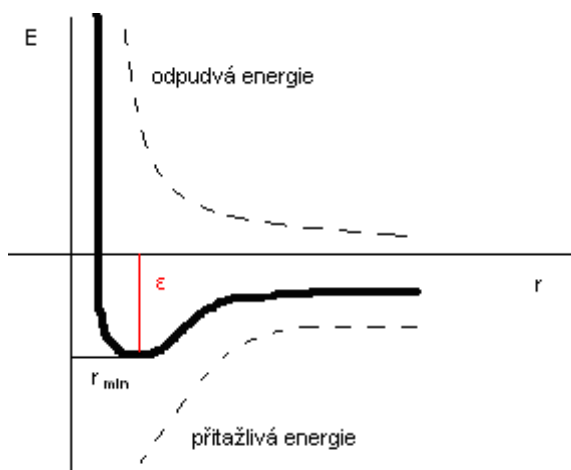
r_{\min} v Rovnici 4 je vzdálenost, na které nabývá potenciální energie minima (viz Obrázek 23). Mezi r_{\min} a σ platí vztah $r_{\min} = \sqrt[6]{2} \sigma$.

$$V(r) = \varepsilon \cdot [(r_{\min} / r)^{12} - 2 \cdot (r_{\min} / r)^6] \quad \text{Rovnice 4}$$

Rovnice 5 je nejjednodušším matematickým vyjádřením 6-12 Lennard – Jonesova potenciálu. Tuto formulaci používá silové pole AMBER, kdy koeficienty A a B jsou zapsány v jeho části `topologie.top`.

$$V(r) = (A / r)^{12} - (B / r)^6 \quad \text{Rovnice 5}$$

Obrázek 21. Závislost celkové energie na vzdálenosti středů dvou neutrálních částic.



2.1.2 Permitivita (ϵ)

Elektrostatika hraje jednu z nejdůležitějších rolí při téměř všech procesech, které se týkají biomolekuly v roztoku. Permitivita (dielektrická konstanta) popisuje reakci rozpouštědla na vnější elektrické pole. Permitivita je charakterizována dielektrickou konstantou, která vyjadřuje míru, s jakou se rozpouštědlo polarizuje v elektrickém poli (např. v poli rozpuštěných molekul). Permitivita je zahrnuta v Coulombově zákoně, který popisuje elektrostatickou interakci (viz Rovnice 6). [31], [32]

$$E = [(1 / 4 \cdot \pi \cdot \epsilon_0 \cdot \epsilon_r) \cdot (q_1 \cdot q_2 / r)]$$

Rovnice 6

kde ϵ_0 je permitivita vakua a ϵ_r je relativní permitivita, která vyjadřuje změnu elektrické síly, jestliže těleso s elektrickým nábojem bude v látkovém prostředí místo ve vakuu.

Permitivita rozpouštědla může ovlivnit strukturní parametry molekul DNA a RNA, například velikost žlábků prostřednictvím míry odpuzování fosfátů v cukr-fosfátové páteři nebo i helikální twist.

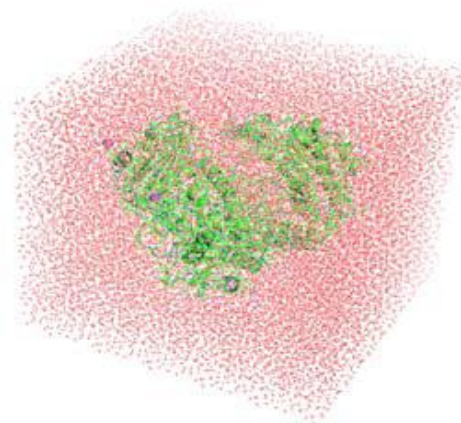
2.1.2.1 Explicitní rozpouštědlo

Makromolekula je obklopena „skutečnými“ molekulami vody v imaginárním boxu s vodou, který zobrazuje Obrázek 22. Nejpoužívanější modely explicitních vod jsou modely TIP3P [33], [34], TIP4P [33], [34], TIP5P [33], [34] a SPC/E. [35] V Tabulce 10 jsou uvedeny hodnoty základních fyzikálních veličin a parametrů těchto modelů vod.

Tabulka 10. Vlastnosti modelů vod: σ , ϵ - Lennard-Jonesovy parametry (X-ray, tabulka převzata z [36]).

Model vody	σ (Å)	ϵ (kJ/mol)	Dipól moment	Dielektrická konstanta	Průměrná konfigurační energie (kJ/mol)	Maximální hustota (C°)
TIP3P	3,15061	0,6364	2,35	82	-41,1	-91
TIP4P	3,15365	0,6480	2,18	53	-41,8	-25
TIP5P	3,12000	0,6694	2,29	81,5	-41,3	+4
SPC/E	3,166	0,650	2,35	71	-41,5	-38

Obrázek 22. Box vody (obrázek převzat z [31]).



Z tabulky je vidět, že jednotlivé modely vody se výrazně liší permitivitou. Vzniká proto otázka, do jaké míry tyto rozdílné hodnoty permitivity ovlivňují strukturu DNA a RNA v simulacích.

2.1.2.2 Implicitní rozpouštědlo

Rozpouštědlo je chápáno jako polarizovatelné kontinuum s dielektrickou konstantou ϵ . Tento model je méně časově náročný v porovnání s explicitním modelem rozpouštědla. Ovšem v případě specifické interakce mezi makromolekulou a rozpouštědlem může selhat. [31] Pro výpočet solvatační energie se používají modely Poisson-Boltzmann (PB) [37] a Generalized Born (GB) [38]. Model Poisson-Boltzmann je výpočetně náročnější a většinou přesnější. Model Generalized Born je jednodušší a podstatně rychlejší. Oba modely často vykazují podobné výsledky, ale mnohdy se také výrazně liší a jejich použití pro solvataci nukleových kyselin se obecně nedoporučuje. I proto jsem se rozhodla model Generalized Born otestovat a srovnat s explicitním rozpouštědlem TIP3P.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3. Cíl práce

Cílem mé diplomové práce bylo zjistit, které parametry silového pole ovlivňují strukturu nukleových kyselin, zvláště mezipárové (helikální) parametry, mezibázové parametry a velikost žlábků. Mezi zkoumanými parametry byly permitivita, amplituda a fáze úhlu χ a van der Waalsovy parametry. Spouštěla jsem proto počítačové simulace, ve kterých jsem měnila standardní (defaultní) hodnoty pro tyto parametry a pro srovnání také simulace bez jakékoli změny těchto parametrů. Kromě toho jsem zkoumala korelace mezi fluktuacemi hodnot parametrů silového pole a strukturními parametry nukleových kyselin. Veškeré simulace byly prováděny jak v klasickém explicitním rozpouštědle, tak i v rozpouštědle implicitním, proto dalším cílem práce bylo porovnat chování makromolekul v každém z nich .

Celá má diplomová práce byla realizována pomocí počítačové simulace, která zkoumá vlastnosti systému díky experimentu s počítačovým modelem. Pomocí níže uvedených silových polí jsem simulovala makromolekulu DNA (B-DNA a Z-DNA), v jednom případě pro srovnání také A-RNA.

4. Metody

Při realizaci své diplomové práce jsem použila silové pole parm99bsc0 s korekcí na α/γ torzi pro DNA a parm99 pro RNA. Simulace v explicitním rozpouštědle byly provedeny v modelu vody TIP3P a u simulací v implicitním rozpouštědle byl použit model pro výpočet solvatační energie model Generalized Born (GB), protože je podstatně rychlejší než Poisson-Boltzmann. Pro analýzu byly vybrány v proteinové databázi (www.pdb.org) struktury pod čtyřmístným kódem 1BNA pro makromolekulu B-DNA, 1ICK pro makromolekulu Z-DNA a 1QC0 pro A-RNA.

Simulační protokol. Simulace byly prováděny za konstantního tlaku a teploty (NPT) s periodickými okrajovými podmínkami s Ewaldovou sumací pro elektrostatické interakce. Cutoff pro nevazebné interakce byl 10 Å, krok simulací v TIP3P byl 2 fs a krok pro simulace v GB byl 1 fs. Byly dodány ionty Na^+ k neutralizaci fosfátových skupin, které udělují makromolekule záporný náboj (B-DNA 22 iontů Na^+ , A-RNA 18 iontů Na^+). Prostředí Z-DNA bylo 2M roztoku NaCl (90 iontů). V implicitním rozpouštědle byla pro Z-DNA nastavena iontová síla 2. Box pro B-DNA měl rozměry 33 x 36 x 51 Å pro Z-DNA 44 x 44 x 50 Å a pro A-RNA 50 x 49 x 58 Å.

Před spuštěním simulace proběhla minimalizace pomocí programu sander z programového balíku AMBER (10 000 kroků) a následně ekvilibrace, při které jsem postupně zvyšovala teplotu na 298 K v průběhu 550 000 kroků.

Pro spojování trajektorií jsem použila modul ptraj a získané výsledky jsem vyhodnotila programem X3DNA. Pro vizualizaci, animaci a analýzu velkých makromolekul jsem použila program VMD (Visual Molecular Dynamics).

Jednotlivé simulace pro implicitní i explicitní rozpouštědlo běžely různou dobu v desítkách ns, což vyjadřuje Tabulka 11.

Tabulka 11. Doba simulací (v ns).

	GB	TIP3P
B-DNA	20	40
Z-DNA	20	40
A-RNA	20	40
χ (fáze)	4*10	X
χ (amplituda)	6*20	11*50
Epsilon	8*20	X
vdW parametry	11*10	3*40

5. Výsledky a diskuse

5.1 Korelace strukturálních parametrů s úhly cukrfofátové páteře a s úhlem χ

Tyto korelace byly získány pomocí výsledků simulací s původními parametry silového pole makromolekul (B-DNA, Z-DNA a A-RNA) v implicitním i explicitním rozpouštědle. Každý snímek byl vyhodnocen pomocí programu X3DNA, který vypsal hodnoty úhlů cukrfofátové páteře a úhlu χ , mezibázových, mezipárových parametrů, velikosti žlábků a úhlu pseudorotace pentózy. Tyto hodnoty pak byly pro každý snímek zprůměrovány. Sloupce průměrných hodnot byly zpracovány programem Statistica (postup: základní Statistica, korelační matice) a výsledky jsou ukázány v tabulkách (viz Tabulka 12 pro B-DNA (TIP3P), Tabulka 13 pro B-DNA (GB), Tabulka 14 pro A-RNA

(TIP3P)), které vystihují korelace všech parametrů těchto makromolekul. V tabulkách jsou jen hodnoty statisticky významné a hodnoty větší než 0,1.

Je třeba si uvědomit, že při tomto způsobu vyhodnocení jsou hodnoty v tabulkách zatíženy velkou statistickou chybou, a proto jsou pouze orientační. Zvlášť hodnoty meších korelačních koeficientů nejsou příliš spolehlivé. Konvergenci hodnot v tabulkách jsem ověřila ze závislosti hodnot korelačních koeficientů na délce simulace.

Chceme-li z tabulek například zjistit, na kterých tozních úhlech ve struktuře B-DNA v explicitním rozpouštědle s modelem vody TIP3P závisí velikost velkého žlábků, podíváme se na řádek maj (vyjadřuje velký žlábek) a zjistíme, že z úhlů páteře velikost velkého žlábků nejvíce koreluje s úhlem δ (-0,28), který popisuje konformaci deoxyribózy. Dále pak koreluje s hodnotou pseudorotačního úhlu P (-0,23), s amplitudou pseudorotace t_m (0,24), s hodnotou glykosidického úhlu χ (-0,25), či s hodnotou úhlu ζ (0,20). Ostatní korelace jsou méně výrazné. Navíc velikost velkého žlábků výrazně koreluje s helikálními parametry slide (-0,53) a twist (-0,60).

Hodnoty korelačních koeficientů mohou být užitečné v tom, že napovídají, kterým směrem je potřeba změnit parametry silového pole, abychom dosáhli lepší shody s experimentem. Např. zvětšováním úhlu δ , dosáhneme zmenšení velikosti velkého žlábků (-0,28).

V následujícím textu se budu věnovat hlavně korelaci mezi úhly páteře a χ , velikostí žlábků, propelleru a helikálního twistu, protože právě zmíněné strukturní parametry patří mezi výrazně se odchylojící od experimentu (hodnot získaných z krystalografických dat).

5.1.1 B-DNA

Tabulka 12. Korelace parametrů makromolekuly B-DNA v explicitním rozpouštědle s modelem vody TIP3P.

V této verzi DP jsou korelační tabulky součástí přílohy.

Korelace mezi úhly páteře. Tabulka 12 ukazuje, že za největší korelace lze považovat korelaci úhlu ζ s úhly ϵ (-0,90) a δ (-0,70). Korelace mezi úhly ϵ a ζ byla předpokládána, protože je zčásti důsledkem přechodu mezi B_I a B_{II} formou, který se charakterizován současnou provázanou změnou úhlů ϵ a ζ . Korelace úhlu ζ s úhlem δ naznačuje provázanost tohoto úhlu s konformací pentózy, která je také potvrzena velkou korelací úhlu ζ s hodnotou pseudorotačního úhlu P (-0,55). S konformací pentózy koreluje také ϵ . Mezi další významné korelace patří korelace úhlu ϵ s úhly β (-0,50) a α (-0,41). Korelace úhlů α a γ je také známá (viz Kapitola 1.4.4).

Korelace malého a velkého žlábků. Malý žlábek dobře koreluje s úhly δ (-0,30), ζ (0,24) a ϵ (-0,12). Velký žlábek dobře koreluje s úhly δ (-0,28), χ (-0,25), ζ (0,20) a β (-0,14). Oba žlábků jsou tedy závislé na konformaci cukru, jehož součástí je úhel δ . To znamená, že velikost žlábků by bylo možné ovlivnit změnou parametru pentózy, ale také některých jiných parametrů cukrfofosátové páteře. V případě malého žlábků úhly δ , ζ a ϵ a v případě velikosti velkého žlábků úhly δ , χ , ζ a β .

Malý žlábek dále pak koreluje s parametry roll (0,52), stagger (-0,22) a pseudorotačním úhlem P (-0,32). Velký žlábek koreluje s slidem (-0,53), amplitudou pseudorotace tm (0,24) a P (-0,23).

Korelace propelleru, helikálního twistu a dalších strukturních parametrů. Twist koreluje s úhlem χ a až na úhel ϵ i všemi úhly cukrfofosátové páteře. Nejvíce koreluje s δ (0,27) a α (0,22). Výrazná je také korelace twistu s malým žlábkem (-0,39), velkým žlábkem (-0,60), pseudorotačním úhlem P (0,27) a slidem (0,28).

Mezipárové parametry korelují dobře s úhly páteře, kdy mezi nejvýraznější korelaci můžeme zařadit korelaci parametru slide s úhly ζ (-0,64), ϵ (0,55), δ (0,48) a β (-0,27). Dále pak korelaci parametru rise s úhly χ (-0,39), ζ (-0,29) a parametru roll s úhly ζ (0,25) a ϵ (-0,22). Slide dobře koreluje s pseudorotačním úhlem P (0,42) a tilt s shiftem (0,71).

Jediná výraznější korelace mezibázových parametrů s tozními úhly patří korelace openingu s χ (-0,33) a staggeru s χ (0,22). Dále pak je to korelace openingu s parametry stretch (0,27) a stagger (-0,26).

Kromě toho existují také korelace mezipárových a mezibázových parametrů např. takto koreluje tilt se shiftem (0,71) a s buckelem (-0,40), stagger s rollem (-0,43) a risem (-0,36), sudar s shiftem (-0,34) a tiltem (-0,33) a také koreluje slide s pseudorotačním úhlem P (0,42). Některé z těchto závislostí byly již dříve pozorovány a popsány v literatuře. Např. Lankaš a spoluautoři zmiňují významné vazby mezi parametry slide a rise, twist a roll a twist a slide [39]. Tyto korelace jsou vidět i v Tabulce 12, která ale kromě toho ukazuje i některé další významné korelace. Je třeba upozornit, že korelace v článku Lankaše a spoluautorů byly získány jinou metodou.

Tabulka 13. Korelace parametrů makromolekuly B-DNA v implicitním rozpouštědle (GB).

V této verzi DP jsou korelační tabulky součástí přílohy.

Tabulka 12 i Tabulka 13 znázorňují korelaci parametrů v B-DNA, jen s tím rozdílem, že Tabulka 13 vychází z implicitního rozpouštědla. Mezi Tabulkou 12 a Tabulkou 13 můžeme najít menší rozdíly, ale v podstatě jsou výsledky velmi podobné. Hlavními rozdíly od Tabulky 12 jsou menší korelace úhlů α , β a větší korelace parametru stretch.

Korelace mezi úhly páteře. Mezi nejvýraznější patří korelace úhlu ζ s úhly ϵ (-0,84), δ (-0,64), χ (-0,45), α (0,27) a korelace úhlu χ s úhlem δ (0,57). Dále pak za významnější korelace Tabulky 13 můžeme považovat korelaci úhlu ϵ s úhly δ (0,36), α (-0,35) a χ (0,26).

Korelace malého a velkého žlábků. Malý žlábek koreluje s úhly ζ (0,43), δ (-0,39) a ϵ (-0,25), dále pak s parametrem roll (0,62) a pseudorotačním úhlem P (-0,37). Velký žlábek koreluje především s úhlem χ (-0,37), parametrem slide (-0,63) a amplitudou pseudorotace t_m (0,32).

Korelace propelleru, helikálního twistu a dalších strukturních parametrů. Výrazná je korelace parametru twist s úhly δ (0,39) a ζ (-0,29), malým a velkým žlábkem (-0,41), pseudorotačním úhlem P (0,35) či parametry slide (0,49), tilt (-0,26) a

shift (0,23). Parametr propeller koreluje významněji s parametrem stagger (-0,27) a slide (-0,26).

Mezi výrazné korelace mezipárových parametrů a torzních úhlů patří korelace parametru slide s úhly χ (0,62), ζ (-0,42), ε (0,36), δ (0,31) a parametru roll s úhly ζ (0,52), ε (-0,36) a δ (-0,29). Dále pak významnými korelacemi mezi sebou jsou korelace parametru tilt s parametry rise (-0,62) a roll (-0,45).

Mezibázové parametry nekorelují tak výrazně, jako ostatní parametry Tabulky 13. Jedinými korelacemi, které jsou významnější jsou korelace s mezipárovými parametry. Jedná se o korelaci parametru stretch s parametry tilt (-0,39), rise (0,34) a roll (0,29) nebo o korelaci staggeru s parametry roll (-0,27) a rise (-0,22) či korelaci parametru opening s parametry rise (-0,31) a tilt (0,25).

5.1.2 A-RNA

Tabulka 14. Korelace parametrů makromolekuly A-RNA v explicitním rozpouštědle s modelem vody TIP3P.

V této verzi DP jsou korelační tabulky součástí přílohy.

Celkově můžeme říci, že korelace v A-RNA se výrazně liší od korelací v B-DNA.

Korelace mezi úhly páteře. Přesto v Tabulce 14 ale nalezneme také výraznější korelace, kterými jsou korelace úhlu α s úhly γ (-0,87), β (0,37) a δ (-0,29), korelace úhlu β s úhly α (0,37) a γ (-0,27), korelace úhlu γ s úhly χ (-0,26) a δ (0,25) nebo korelace úhlu ε s úhly ζ (-0,23) a α (0,22). Výrazné korelace úhlů α a γ jsou pravděpodobně důsledkem daleko častějších α/γ přesmyků v RNA, stejně jako výraznější korelace těchto úhlů s dalšími parametry. Přesmyky α/γ jsou obecně v RNA pozorovány daleko častěji než v DNA.

Korelace malého a velkého žlábků. Malý i velký žlábek A-RNA korelují výrazně s úhly α , γ a χ . Malý žlábek s úhly χ (0,35), γ (-0,32) a α (0,31). Velký žlábek s úhly γ (0,35), χ (-0,33) a α (-0,33). Malý žlábek navíc značně koreluje i s parametrem roll (0,62) a stagger (-0,28) a velký žlábek s parametrem slide (-0,64). Pokud odhlédneme od závislosti velikosti žlábků na úhlech α a γ (viz diskuze výše), zjistíme, že

žlábků jsou, stejně jako DNA, ovlivňovány především konformací ribózy a glykosidickým úhlem χ .

Korelace propelleru, helikálního twistu a dalších strukturních parametrů.

Propeller koreluje výrazněji s velkým žlábkem (0,33), slidem (-0,35), staggerem (-0,30), rollem (-0,26) a úhlem χ (-0,24). Parametr helikální twist výrazně koreluje s velkým žlábkem (-0,62), propellerem (-0,34) či slidem (0,27).

Mezipárový parametr slide značně koreluje s úhly χ (0,78), α (0,33), γ (-0,32), parametr roll s úhly χ (0,62) a γ (-0,29). Parametr tilt koreluje s shiftem (0,65), parametr slide s rollem (0,50) a amplitudou pseudorotace t_m (-0,29).

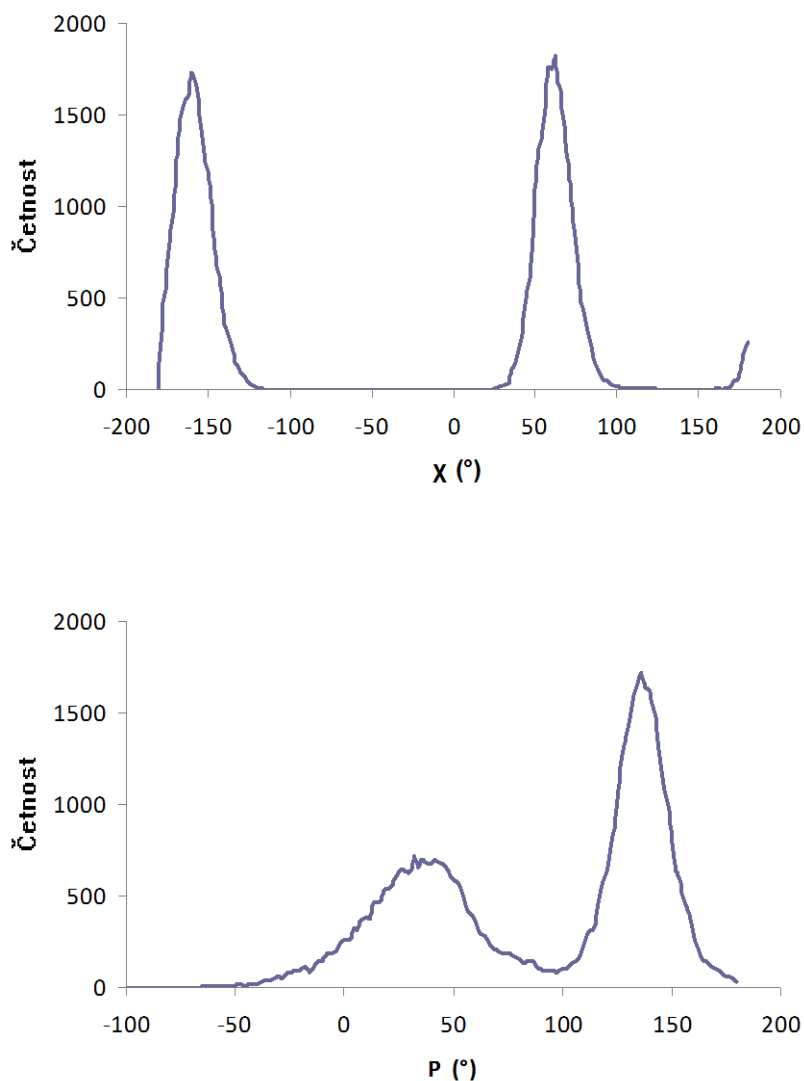
Mezibázové parametry korelují málo. V tabulce vidíme korelaci parametru stagger s úhlem χ (-0,30) a korelaci openingu se stretchem (0,35).

Mezipárové a mezibázové parametry spolu opět i v případě A-RNA korelují. Jedná se o korelaci parametru stagger s parametrem rise (-0,52), roll (-0,33) a dále pak o korelaci buckle s shiftem (-0,41) a tilem (-0,31).

5.1.3 Z-DNA

Korelační tabulky pro Z-DNA neuvádím, protože tato forma není častá a nebývá většinou při návrhu silových polí uvažována. Některé hodnoty této makromolekuly mají bimodální rozdělení, protože guanin se v ní nachází v syn konformaci a cytosin v anti konformaci. Jedná se například o úhly α , γ a χ nebo konformace cukru. V Obrázku 24 ukazují rozdělení pro úhel χ a pseudorotační úhel P získané z molekulárně dynamické simulace s parametry parmbse0 v explicitní vodě TIP3P.

Obrázek 24. Bimodální rozdělení úhlu χ (nahore) a pseudorotačního úhlu P (dole) v Z-DNA.



5.1.4 Korelační tabulky a tabulky směrnic

Předešlé tabulky (Tabulka 12, 13, 14) ukazovaly, které parametry korelují se kterými. Následující tabulky (Tabulka 15, 16, 17, 18) budou charakterizovat závislosti parametrů blíže pomocí směrnic závislostí v lineárním přiblížení, takže umožňují kvantifikovat, do jaké míry se změní ostatní strukturní parametry, změníme-li vybraný parametr. Data pro získání těchto tabulek jsem použila ze simulace DNA v implicitním roztoku bez jakékoli změny parametrů silového pole. Menší rozdíly mezi korelačními tabulkami a tabulkami směrnic mohou být způsobeny tím, že při určování směrnic jsem

použila data s odfiltrovanými α/γ přesmyky. Do tabulek uvádím pro porovnání výrazné závislosti, ale také závislosti zanedbatelné.

Tabulka 15 udává směrnice závislostí, úseky a korelační koeficienty. Při výpočtu směrnice jsem vycházela z průměrných hodnot úhlů cukrfosfátové páteře a úhlu χ pro všechny nukleotidy v daném snímku.

Tabulka 15. Tabulka směrnic (první číslo), úseků (druhé číslo) a korelačních koeficientů (třetí číslo) pro úhly cukrfosfátové páteře a úhel χ .

	α	β	γ	δ	ϵ	ζ	χ
		-0,1026	-0,1101	-0,1305	-0,1934	0,1148	-0,088
α		- 53,886	- 64,472	- 55,58	- 103,23	- 59,352	- 81,669
		0,0192	0,0316	0,0261	0,1259	0,0717	0,0137
			-0,0003	0,0601	-0,2784	0,1396	0,0708
β			171,21	163,88	125,46	185,92	179,41
			1E-07	0,003	0,1431	0,0582	0,0048
				-0,1002	-0,109	0,0726	-0,0851
γ				75,627	45,518	71,086	53,558
				0,0059	0,0154	0,011	0,0049
					0,245	-0,3399	0,5276
δ					161,95	85,843	182,91
					0,1319	0,4106	0,3203
						-0,6613	0,3601
ϵ						- 234,02	- 122,5
						0,7076	0,0679
							-0,7874
ζ							- 196,82
							0,2008
χ							

Z Tabulky 15 vyplývá, že největší korelaci lze pozorovat u úhlů ε a ζ , δ a ζ , a δ a χ . Výraznější korelace jsou zakresleny červeně. Největší směrnice (nejstrmější závislosti) můžeme pozorovat dvojic úhlů ε a ζ , ε a χ , δ a χ , δ a ζ . Hodnoty výraznějších korelací jsem pro přehlednost zaznačila v tabulce modře. Významná korelace úhlů ε a ζ je důsledkem ε/ζ přesmyků (použitá trajektorie obsahovala i ε/ζ přesmyky). Významná korelace úhlů δ a χ potvrzuje domněnku, že konformační chování cukru je provázáno s hodnotou úhlu χ . Ve většině případů jsou korelační koeficienty doprovázeny strmou závislostí korelovaných parametrů.

Pokud porovnáme významné korelace v Tabulce 13 s hodnotami korelací vyznačenými červeně v Tabulce 15, dojdeme k závěru, že se výrazné korelace shodují.

Tabulka 16 vyjadřuje korelaci průměrných hodnot mezipárových parametrů, které popisují orientaci párů dusíkatých bází DNA vůči sobě buď pod určitým úhlem (tilt, roll, twist) nebo s posunem (shift, slide, rise).

Tabulka 17 vyjadřuje korelaci průměrných hodnot mezibázových parametrů, které popisují orientaci jednotlivých dusíkatých bází DNA vůči sobě buď pod určitým úhlem (buckle, opening, propeler) nebo posunem (shear, stagger, stretch).

Tabulka 16. Tabulka směrnic (první číslo), úseků (druhé číslo) a korelačních koeficientů (třetí číslo) pro mezipárové strukturní parametry.

	Rise	Roll	Shift	Slide	Tilt	Twist
		-0,008	0,1286	0,0092	-0,0136	0,0051
Rise		3,4849	3,4408	3,4521	3,4631	3,2787
		0,0535	0,0347	0,0003	0,0448	0,0049
			2,9326	-0,299	-0,2154	-0,3717
Roll			2,9153	2,9362	3,348	15,283
			0,0298	0,0006	0,0135	0,0418
				0,0389	0,0466	0,0244
Shift				0,0726	0,0468	- 0,7468
				0,0028	0,1524	0,052
					-0,0162	0,0904
Slide					- 0,4582	- 3,4358
					0,0088	0,2952
						-0,2621
Tilt						8,9416
						0,0741
Twist						

Z Tabulky 16 lze vyčíst, že závislosti nejsou nikterak výrazné až na závislost parametru slide na parametru twistu a parametru shift na parametru tilt. Tyto významné korelační koeficienty jsou zakresleny červeně. Opět po porovnání těchto červeně zakreslených hodnot s korelačními koeficienty v Tabulce 13 vidíme schodu. Modře jsou označeny největší směrnice.

Tabulka 17. Tabulka směrnic (první číslo), úseků (druhé číslo) a korelačních koeficientů (třetí číslo) pro mezibázové strukturní parametry.

	Buckle	Opening	Propeller	Shear	Stagger	Stretch
		0,004	-0,1581	-2,9785	-1,6449	-2,8708
Buckle		- 0,0033	- 1,6619	0,2649	- 0,0322	- 0,1342
		4E-06	0,0117	0,0067	0,0037	0,0013
			-0,0588	3,8787	0,994	14,655
Opening			0,0966	0,3684	0,7331	1,0257
			0,0065	0,0457	0,0055	0,1581
				0,134	-4,9049	-4,6932
Propeller				- 10,519	- 10,601	- 10,606
				3E-05	0,0714	0,0073
					0,0692	0,0646
Shear					0,0904	0,0913
					0,0088	0,001
						-0,0581
Stagger						- 0,023
						0,0004
Stretch						

Z tabulky 17 vyplývá, že korelační koeficienty jednotlivých parametrů dusíkatých bází DNA nejsou zdaleka tak výrazné, jako korelační koeficienty ve výše uvedených tabulkách. Mezi nejvýraznější patří pouze korelace parametru opening s parametrem stretch. Tato korelace je opět zaznamenána červeně a největší směrnice jsou zaznačeny modře.

Tabulka 18 znázorňuje závislost průměrných hodnot významných parametrů DNA jako je malý a velký žlábek, rise, twist a propeller na úhlech cukr-fosfátové páteře a úhlu χ .

Tabulka 18. Tabulka směrnic (první číslo), úseků (druhé číslo) a korelačních koeficientů (třetí číslo).

	α	β	γ	δ	ϵ	ζ	χ
Malý žlábek	-0,0302	0,0383	0,0065	-0,1199	-0,0518	0,0698	-0,0419
	10,522	6,1174	12,263	27,269	4,1725	20,036	7,8188
	0,0063	0,0186	0,0008	0,1529	0,0626	0,1839	0,0215
Velký žlábek	-0,0034	0,0065	-0,0103	-0,0822	-0,0042	0,0213	-0,1139
	19,652	18,788	20,552	29,896	19,204	22,137	6,6771
	7E-05	0,0005	0,0017	0,0617	0,0004	0,0147	0,1365
Rise	0,0013	0,0001	-0,0003	-0,0006	0,0013	0,0007	-0,0022
	3,5393	3,4274	3,464	3,5219	3,6621	3,5253	3,193
	0,0009	1E-05	9E-05	0,0003	0,0032	0,0016	0,0047
Twist	0,0189	-0,0189	0,0229	0,1823	0,0496	-0,071	0,0953
	34,19	36,071	31,385	10,651	40,987	25,347	43,896
	0,0011	0,002	0,0041	0,1536	0,025	0,0829	0,0483
Propeller	-0,0636	0,0881	0,0035	0,0706	-0,0237	0,0034	-0,0891
	- 15,05	- 25,59	- 10,726	- 19,105	- 14,392	- 10,15	- 20,846
	0,0033	0,0115	3E-05	0,0062	0,0015	5E-05	0,0114

Podle hodnot z Tabulky 18 je zřejmé, že z uvedených parametrů nejvíce koreluje s úhly cukrfosfátové páteře a úhlem χ malý žlábek DNA (výrazná závislost na úhlu δ a úhlu ζ), dále velký žlábek DNA (výraznější korelace s úhlem χ) a helikální parametr twist (výraznější závislost na úhlu δ). Tyto signifikantní korelace jsou pro přehlednost označeny červeně. Tyto výrazné korelační koeficienty souhlasí s výraznými korelacemi v Tabulce 13.

Ze směrnic v Tabulce 18 bychom mohli pro korekci malého a velkého žlábků doporučit změnu parametru δ , ζ nebo χ , pro korekci helikálního twistu úhel δ a pro korekci propelleru úhly β a χ . Závislosti ale nejsou dost strmé na to, aby bylo možné dosáhnout opravy parametrů změnou pouze jednoho parametru.

Tyto tabulky mohou být použity pro cílené úpravy silových polí, protože umožňují předpovídat, jaký bude mít změna jednoho parametru vliv na změnu ostatních. Příkladem takového použití je Tabulka 19, ve které je naznačeno, jak by se velikosti velkého a malého žlábků, twistu a propelleru v DNA změnily, pokud bychom upravili úhly δ a χ na hodnoty, které odpovídají krystalovým datům. Protože δ a χ jsou častým cílem modifikací silového pole, uvádím pouze tyto dva parametry. Tabulka 19 ukazuje hodnoty naměřené metodou krystalové difrakce a hodnoty získané pomocí silového pole parm99bsc0. Pokud by se podařilo opravit hodnoty δ a χ , aby byly ve schodě s experimentálními daty, výsledná hodnota strukturních parametrů za předpokladu použití směrnic z Tabulky 19 by byla taková, jako je uvedena v posledním sloupci Tabulky 19. V případě velkého žlábků a propelleru hodnotu získanou pomocí silového pole parm99bsc0 snižují a v případě malého žlábků a twistu zvyšují. Červeně vyznačená čísla tabulky ukazují posunutí správným směrem při zdokonalování silového pole. Je vidět, že tímto způsobem nelze dosáhnout úplné korekce, proto bude potřeba změnit i další parametry (např., jak plyne z korelačních tabulek, hodnotu úhlu ζ).

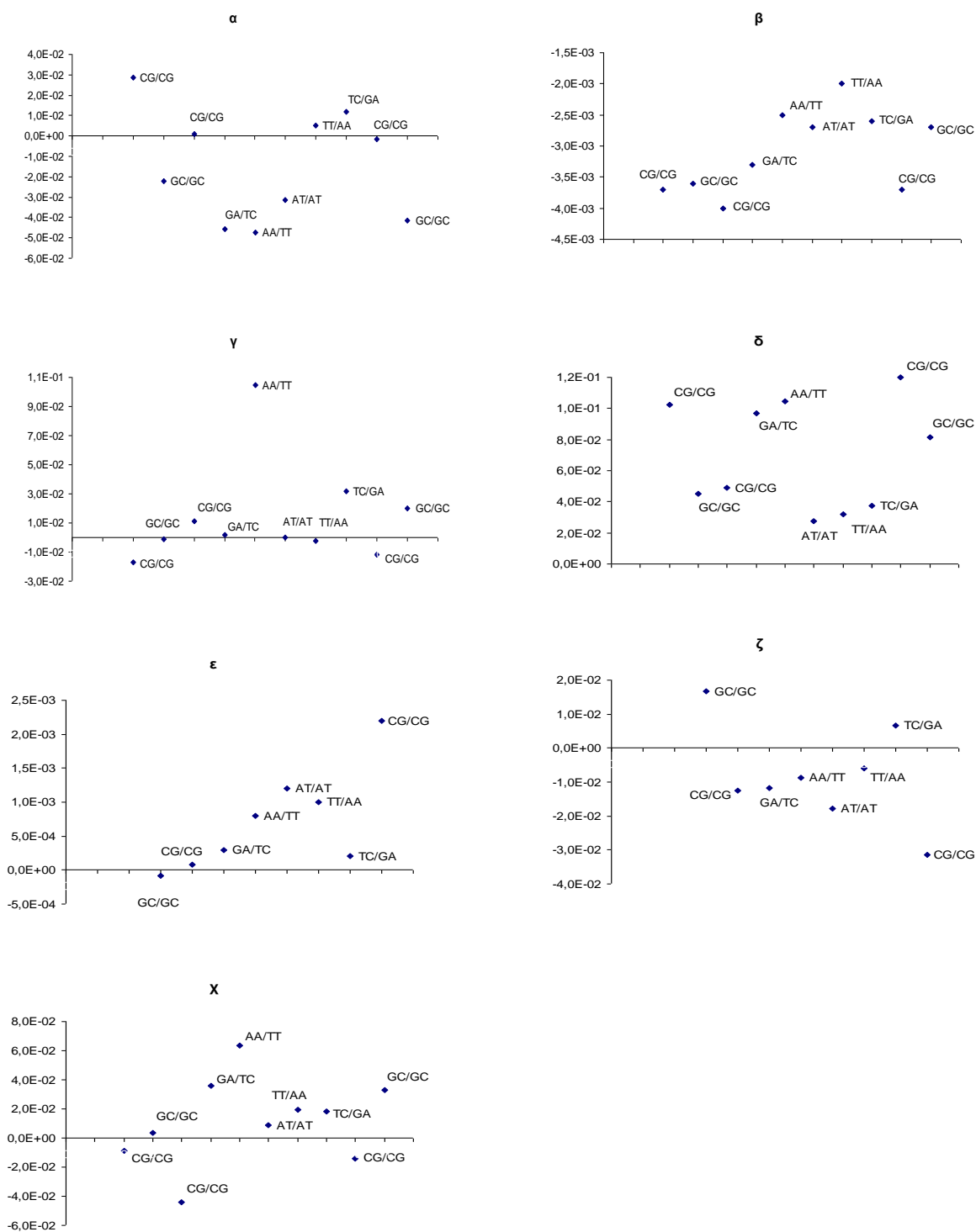
Tabulka 19. Směrnice závislostí velkého a malého žlábků, twistu a propelleru pro dodekamer DNA (1BNA TIP3P) na úhlech δ a χ .

	Úhel δ	Úhel χ	X-ray	Parm99bsc0	Předpovězená hodnota
Velký žlábek	-0,07	-0,04	17,51	19,54	19,41
Malý žlábek	-0,06		10,93	12,16	12,20
Twist	0,09	0,03	35,58	32,62	32,74
Propeller		-0,08	-12,33	-12,62	-12,46

5.1.5 Variabilita korelací v závislosti na sekvenci

Tabulky uvedené v předešlém textu ukazovaly korelace mezi parametry zprůměrovanými pro celou simulovanou molekulu (např. u B-DNA šlo o průměr ze všech 24 úhlů χ v dodekameru 1BNA). Je ale pravděpodobné, že míra korelace bude závislá na sekvenci. Proto jsem pro parametr helikální twist provedla analýzu v závislosti na sekvenci pro jednotlivé bázové stepy. Graf 1. Ukazuje směrnice závislostí twistu na jednotlivých úhlech α , β , γ , δ , ϵ , ζ a χ , které se v cukrfosfátové páteři nacházejí mezi bázemi tvořícími step charakterizovaný daným helikálním twistem. Úhly jsou brány pouze z řetězce 1.

Graf 1. Směrnice závislostí twistu na úhlech cukrfosfátové páteře a úhlu χ v závislosti na typu báze.



Z grafů je vidět, že směrnice závislosti helikálního twistu na úhlech cukřofosfátové páteře je výrazně ovlivněna druhem báze a jejím okolím. Podobné závislosti jsou ale z literatury známy a nejsou překvapením (viz např. [39]). Pozorovaný rozptyl strukturních parametrů bude pravděpodobně dále komplikovat systematický návrh nových silových polí.

Hlavním zjištěním této kapitoly věnující se korelacím je, že provázanost parametrů empirického potenciálu se strukturou DNA a RNA je velmi komplikovaná. To znamená, že pokud bychom chtěli cílenou změnou jednoho parametru empirického potenciálu dosáhnout konkrétní opravy struktury makromolekuly v MD simulaci, pravděpodobně neuspějeme. Změna zvoleného parametru totiž zároveň vyvolá změny velkého množství dalších strukturních parametrů, z velké části pravděpodobně nežádoucí. Právě tato provázanost a složitost zřejmě způsobuje, že nebyl dosud vyvinut potenciál, který by uspokojivě popisoval všechny strukturní parametry nukleových kyselin zároveň. Korelační tabulky uvedené v této kapitole mají za cíl zpřehlednit a částečně kvantifikovat existující závislosti a tím ulehčit proces návrhu budoucích silových polí.

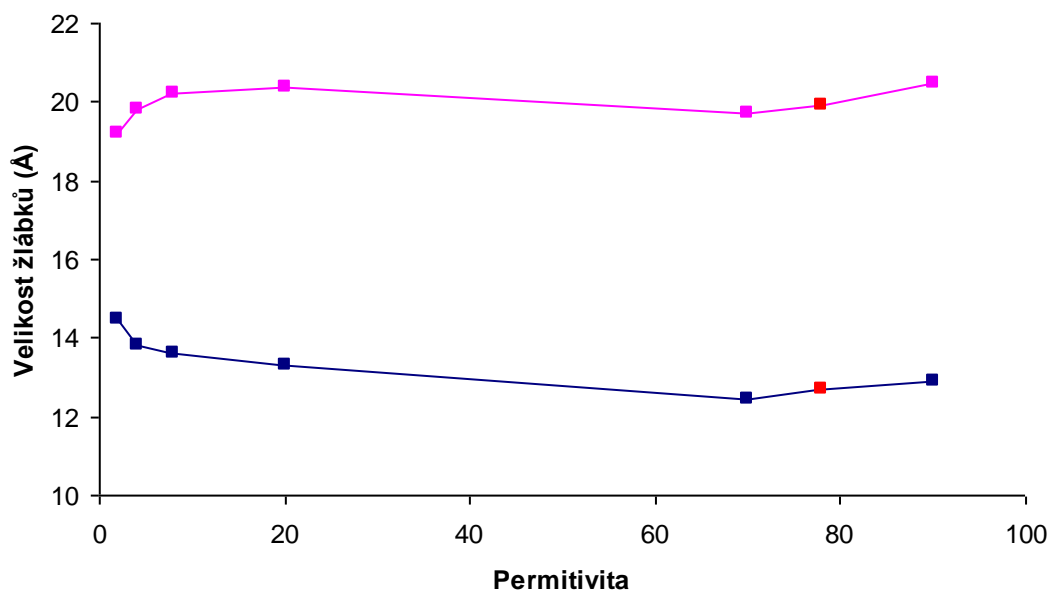
5.2 Modifikace parametrů silového pole

5.2.1 Permittivita

Hodnota permitivity různých explicitních modelů vody kolísá v určitém rozmezí okolo hodnoty $\epsilon = 78$ (viz Tabulka 10). Proto jsem se rozhodla prozkoumat, jaký mají tyto malé změny permitivity vliv na strukturní parametry dvojšroubovice DNA. Změny permitivity zároveň nepřímo ukazují, jaký vliv na strukturu budou mít malé změny hodnot použitých bodových nábojů. Protože plynulá změna permitivity v explicitním rozpouštědle není možná, rozhodla jsem se použít implicitní rozpouštědlo, ve kterém může být permitivita nastavena libovolně. Dá se předpokládat, že alespoň trendy změn strukturních parametrů budou v implicitním a explicitním rozpouštědle podobné. Bylo tedy spuštěno osm počítačových simulací v implicitním rozpouštědle, ve kterých byla tato hodnota změněna. Jednalo se o hodnoty ϵ 2; 4; 8; 20; 70; 78; 90 a 1000.

Zaměřila jsem se na závislost velkého žlábků, malého žlábků a twistu na permitivitě.

Graf 2. Závislost malého žlábků (modrá křivka) a velkého žlábků (růžová křivka) na permitivitě, červený bod představuje $\epsilon = 78,4$.



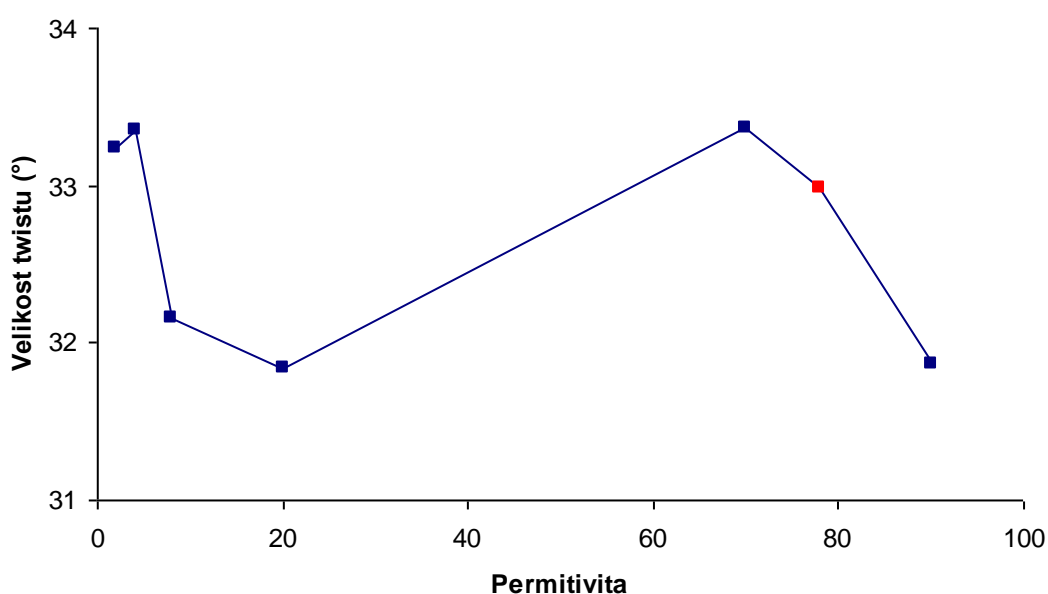
Z Grafu 2 vyplývá, že velikost malého ani velkého žlábků není v okolí hodnoty permitivity vody ($\epsilon = 78,4$) na permitivitě nijak výrazně závislá. Jediná strmější závislost je pozorována pro velmi malé hodnoty permitivity, kdy se vlivem elektrostatického odpuzování velikosti žlábků přibližují. Ve strukturách, které těmto hodnotám náleží, ale došlo k poruše párování posledního páru bází. Bod pro permitivitu 1000 jsem do grafu nekládala, neboť došlo k poruše párování u více bází.

Nejvíce nás zajímá oblast permitivity kolem defaultní hodnoty (hodnoty 78,4) a to tedy body 70, 78 a 90. Rovnice regrese pro tyto body v případě malého žlábků je $y = 0,023x + 10,87$ a korelační koeficient $R^2 = 0,9641$. V případě velkého žlábků $y = 0,037x + 17,08$ a korelační koeficient $R^2 = 0,9681$. V této pro nás nejzajímavější oblasti permitivity jsou tedy hodnoty směrnic relativně malé, z čehož můžeme usoudit, že nejsou na změně permitivity výrazně závislé. Dá se tedy předpokládat, že struktura dvojšroubovice nebude příliš citlivá ani k malým změnám v hodnotách bodových

nábojů v okolí fosfátů. To ale platí pouze pro změny nábojů způsobující podobné změny elektrostatické interakční energie, jako změny permitivity v rozmezí 70-90.

Graf 3 ukazuje závislost helikálního twistu na permitivitě rozpouštědla. Z dat v grafu je zřejmé, že změna velikosti hodnota twistu se při změně permitivity pohybuje v rozmezí asi jen 2°, proto lze tvrdit, že pokud ovlivňujeme velikost permitivity neovlivňujeme nikterak výrazným způsobem velikost twistu. Pro hodnotu permitivity vody vykazuje graf maximum (hodnoty permitivity nižší než 20 jsem nebrala v úvahu, protože docházelo k rozpadu struktury dvojšroubovice).

Graf 3. Závislost twistu na permitivitě, červený bod představuje $\epsilon = 78,4$.



Rovnice regrese pro body, které nás zajímají tj. body 70, 78 a 90 je $y = -0,0763x + 38,792$ a korelační koeficient $R^2 = 0,9726$. Permitivita tedy není parametrem, který by ve velké míře ovlivňoval velikost malého a velkého žlábků ani twistu makromolekuly DNA, a tím i vzdálenost fosfátů v cukrfosfátové páteři.

5.2.2 Úhel χ

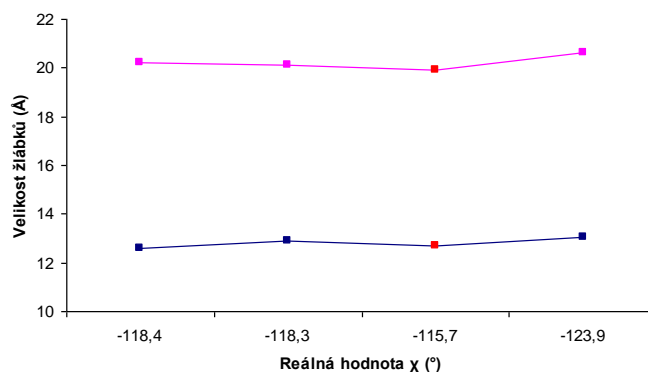
Z korelací v Tabulce 13 plyne, že velikost žlábků závisí na hodnotě úhlu χ . Proto jsem se rozhodla modifikovat tento úhel a sledovat změnu, která z této modifikace

vyplyne. Úhel χ můžeme měnit tak, že pozměníme jeho fázi nebo amplitudu. Obě tyto možnosti změny jsem vyzkoušela.

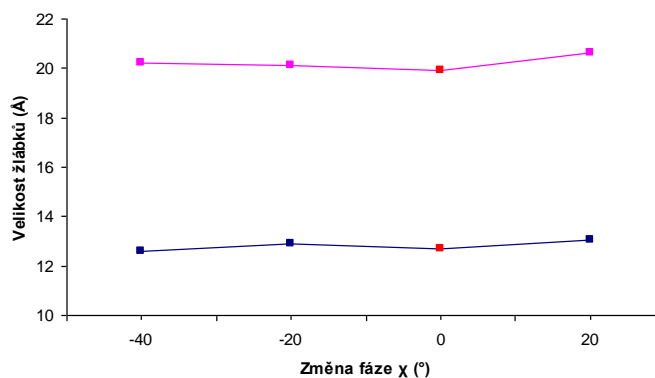
5.2.2.1 Změna fáze úhlu χ

Při simulacích úhlu χ jsem testovala, jak mění velikost žlábků a helikálního twistu DNA, jestliže měním fáze tohoto úhlu. Byly tedy spuštěny 4 simulace v implicitním rozpouštědle, kdy se měnila tato fáze o -40° , -20° , $+20^\circ$ a $+40^\circ$. Uvádím vždy tři grafy; v prvním je vynesena sledovaná závisle proměnná (např. velikost žlábků) na průměrné hodnotě úhlu χ ze simulace, ve druhém závislost závisle proměnné na měněném parametru a ve třetím závislost průměrného úhlu χ ze simulace na měněném parametru. V následujících grafech neuvádím hodnoty pro $\chi + 40^\circ$, protože tato struktura nebyla během simulace stabilní a došlo k poruše párování u více bází.

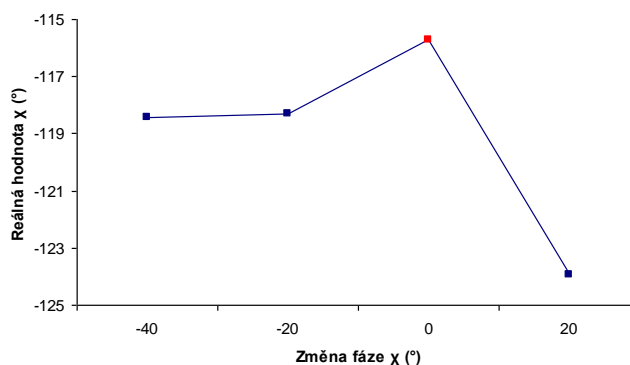
Graf 4. Závislost malého žlábků (modrá křivka) a velkého žlábků (růžová křivka) na hodnotě χ , červený bod představuje nemodifikovanou (původní) hodnotu v silovém poli.



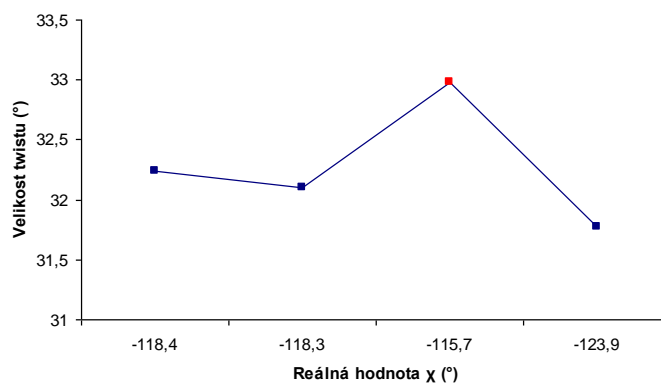
Graf 5. Závislost malého žlábků (modrá křivka) a velkého žlábků (růžová křivka) na změně fázového posunu χ , červený bod představuje nemodifikovanou (původní) hodnotu v silovém poli.



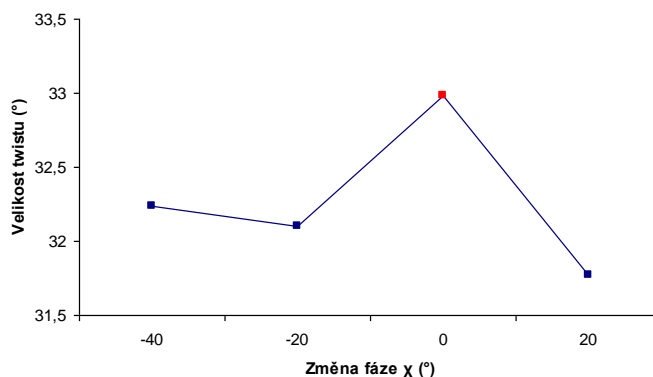
Graf 6. Závislost hodnoty χ na změně fázového posunu úhlu χ , červený bod představuje nemodifikovanou (původní) hodnotu v silovém poli.



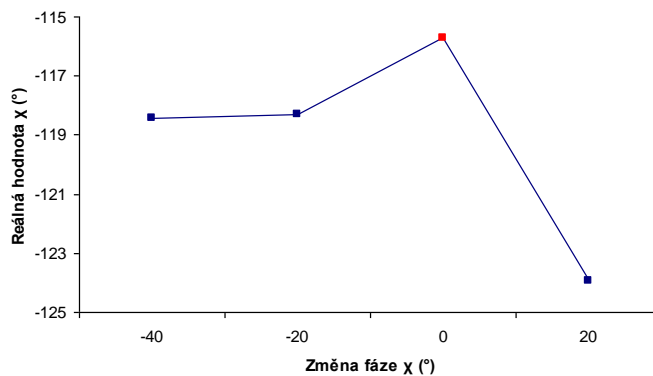
Graf 7. Závislost helikálního twistu na hodnotě χ , červený bod představuje nemodifikovanou (původní) hodnotu v silovém poli.



Graf 8. Závislost helikálního twistu na změně fázového posunu χ , červený bod představuje nemodifikovanou (původní) hodnotu v silovém poli.



Graf 9. Závislost hodnoty χ na změně fázového posunu hodnoty χ , červený bod představuje nemodifikovanou (původní) hodnotu v silovém poli.



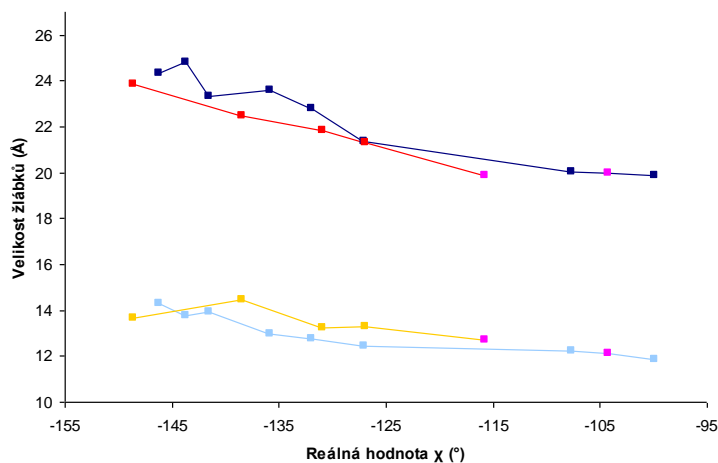
Při simulacích, ve kterých se měnil fázový posun úhlu χ byla snaha přiblížit se co možná nejvíce k hodnotám, které byly získány pomocí experimentu. V případě malého žlábků se nejvíce se této hodnotě přiblížil výsledek simulace, ve které se tento posun měnil o -40° . V případě velkého žlábků byl nejblíže hodnotě z krystalové struktury výsledek simulace změny fázového posunu o -20° . V obou případech byla ale změna velikosti žlábků relativně malá, v souladu se závěry vyvozenými z Tabulky 19. Hodnotě z krystalové struktury pro helikální twist se nejvíce přiblížil výsledek simulace beze změny fáze χ .

5.2.2.2 Amplituda úhlu χ

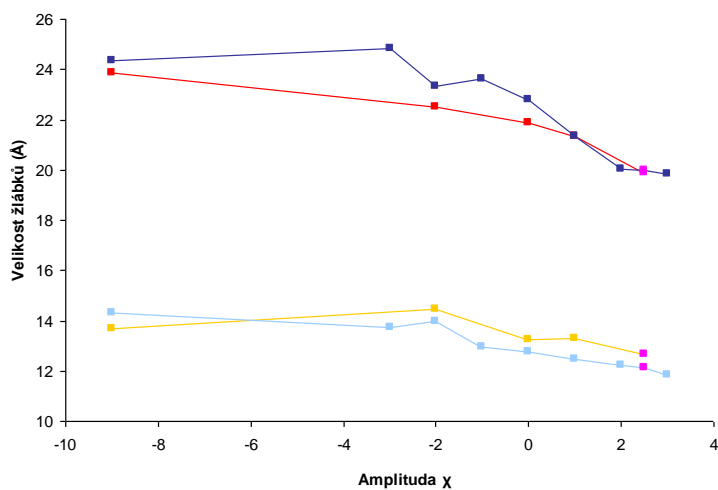
Původní hodnota amplitudy úhlu χ v silovém poli parm99bsc0 je 2,5. Simulace, ve kterých byla tato hodnota změněna, byly spuštěny v explicitním i implicitním roztoku. V implicitním rozpouštědle jsem amplitudu měnila na hodnoty -9, -2, 0, 1, 4 za použití silového pole parm99bsc0, v explicitním rozpouštědle byly amplitudy -9, -3, -2, -1, 0, 1, 2, 3, 4, 5 a silové pole parm99 (tyto výsledky byly převzaty od Mgr. Petra Sklenovského, a protože je použito jiné silové pole, nebudou plně srovnatelné).

Grafy 11, 12 a 13 ukazují, jak se mění velikost žlábků DNA, jestliže měníme amplitudu úhlu χ v implicitním i explicitním rozpouštědle. Hodnoty amplitudy χ 4 a 5 pro malý žlábek v explicitním rozpouštědle a hodnotu 4 v implicitním rozpouštědle jsem do grafu nezahrnula, protože struktury se výrazně odchýlily od kanonické struktury. Opět uvádím vždy tři grafy: v prvním je vynesena hodnota sledované závisle proměnné na průměrné hodnotě úhlu χ ze simulace, ve druhém závislost závisle proměnné na měněném parametru a ve třetím závislost průměrného úhlu χ ze simulace na měněném parametru.

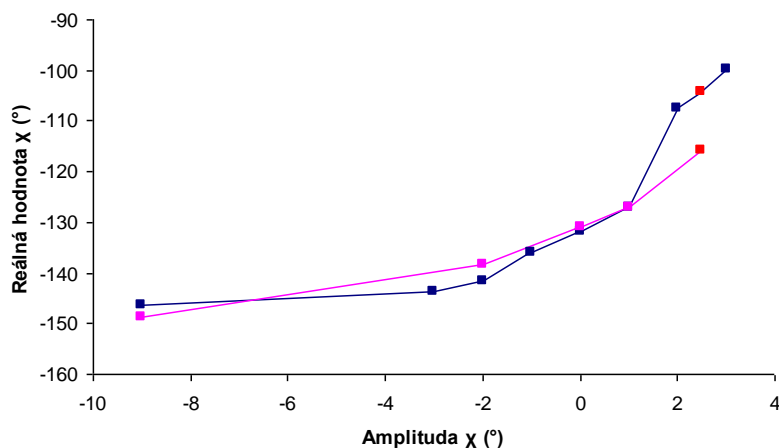
Graf 10. Závislost malého žlábků a velkého žlábků na změně velikosti úhlu χ v explicitním rozpouštědle (malý žlábek: světle modrá křivka, velký žlábek: tmavě modrá křivka) a implicitním rozpouštědle (malý žlábek: světle červená křivka, velký žlábek: tmavě červená křivka), růžový bod odpovídá nezměněné χ .



Graf 11. Závislost malého a velkého žlábků na změně amplitudy úhlu χ v explicitním rozpouštědle (malý žlábek: světle modrá křivka, velký žlábek: tmavě modrá křivka) a implicitním rozpouštědle (malý žlábek: světle červená křivka, velký žlábek: tmavě červená křivka), růžový bod odpovídá nezměněné χ .



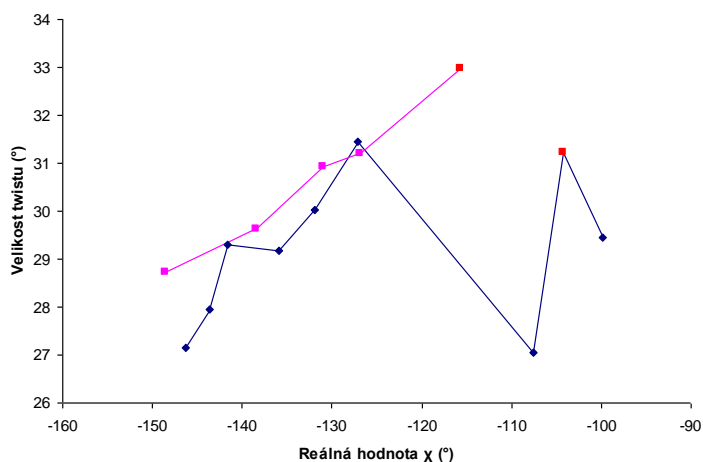
Graf 12. Závislost reálné hodnoty χ na amplitudě χ v explicitním rozpouštědle (modrá křivka) a v implicitním rozpouštědle (růžová křivka), růžový bod odpovídá nezměněné χ .



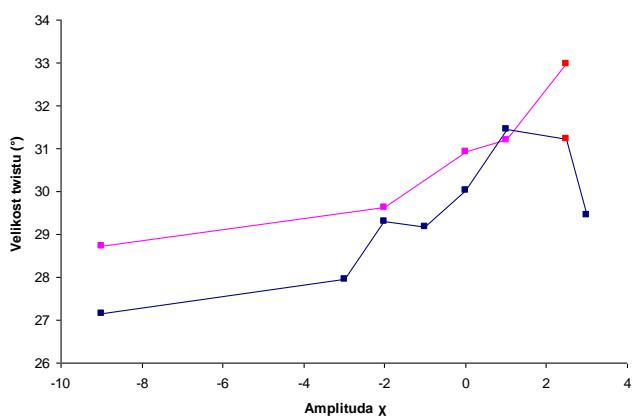
Z Grafu 10 je vidět, že velikosti žlábků vykazují v implicitním i explicitním rozpouštědle stejné trendy, takže implicitní model je v tomto případě použitelný k zrychlenému odhadu chování silového pole. Trendy se zároveň ve znaménku shodují s korelacemi získanými z fluktuací struktury (Tabulky 12 a 13). Korelační analýza tedy může poskytnout velmi podobné výsledky, jako daleko náročnější skenování parametrů. U explicitního rozpouštědle nás nejvíce zajímají hodnoty v oblasti úhlu χ kolem velikosti -100° (hodnota charakteristická pro B-DNA). Pro tyto tři body velkého žlábků je rovnice regrese $y = -0,0241x + 17,458$ a korelační koeficient $R^2 = 0,9998$. Pro tyto tři body malého žlábků je rovnice regrese $y = -0,049x + 6,9723$ a korelační koeficient $R^2 = 0,9819$. Ukazuje se tedy, ve shodě s výsledky vyvozenými z Tabulky 19, že pouze modifikací úhlu χ nelze zcela opravit nadhodnocenou velikost žlábků v DNA.

V následujících grafech (Graf 13 a 14) je znázorněna závislost helikálního twistu na hodnotě úhlu χ a na jeho amplitudě .

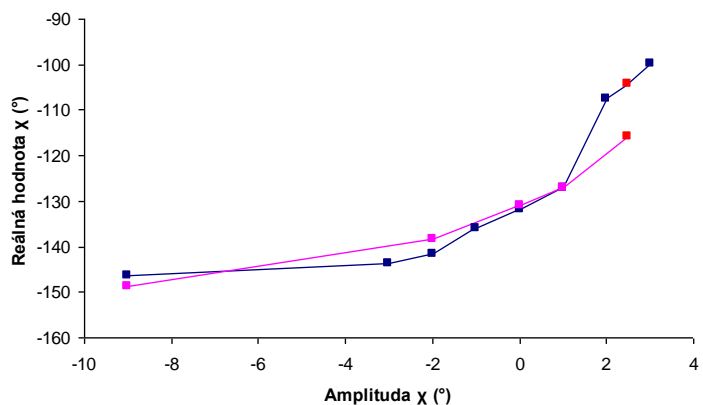
Graf 13. Závislost twistu na hodnotě χ v explicitním rozpouštědle (modrá křivka) a implicitním rozpouštědle (růžová křivka), červený bod odpovídá nezměněné χ .



Graf 14. Závislost twistu na změně amplitudy úhlu χ v explicitním rozpouštědle (modrá křivka) a implicitním rozpouštědle (růžová křivka), červený bod odpovídá nezměněné χ .



Graf 15. Závislost reálné hodnoty χ na amplitudě χ v explicitním rozpouštědle (modrá křivka) a v implicitním rozpouštědle (růžová křivka), červený bod odpovídá nezměněné χ .



Do Grafu 13, 14, 15 opět nebyly zaneseny body hodnot změny amplitudy pro implicitní rozpouštědlo 4 a explicitní rozpouštědlo 4, 5. Přestože data vykazují značný rozptyl, je vidět, že čím vyšší je hodnota úhlu χ , větší je také helikální twist. Úplné korekce velikosti žlábků ani helikálního twistu nedosáhneme pouze pomocí změny úhlu χ , protože závislosti nejsou dostatečně strmé a u krajních hodnot navíc dochází k výrazné deformaci makromolekuly DNA..

5.3 van der Waalsovy parametry

V této kapitole jsem se zabývala testováním vlivu změn van der Waalsových parametrů na helikální twist. Báze nukleových kyselin mezi sebou interagují jednak prostřednictvím vodíkových vazeb, ale také tzv. patrovými interakcemi (angl. stacking). Nejvýraznějším příspěvkem k patrovým interakcím je Londonova disperze, která je v silovém poli popsána Lennard-Jonesovou rovnicí. vdW parametry by tedy měly mít vliv na sílu vzájemného přitahování sousedních párů bází a možná i na helikální (mezipárové) parametry. Proto jsem se rozhodla vliv změny vdW parametrů především na helikální twist prozkoumat. Parametry byly modifikovány tak, aby se měnila pouze hloubka vdW minima, nikoli však poloha minima. Toho lze dosáhnout tak, že jak A tak B koeficienty v Rovnici 5 jsou násobeny stejným škálovacím faktorem. Provedla jsem tedy celkem 11 simulací v implicitním roztoku, ve kterých se změnila hodnota Lennard-Jonesových koeficientů tak, že původní hodnoty byly škálovány faktory 0,7; 0,75; 0,8; 0,85; 0,87; 0,9; 0,95; 1; 1,05; 1,1 a 1,3. Navíc byly také spuštěny 3 simulace v explicitním roztoku, ve kterých byly hodnoty Lennard-Jonesových koeficientů škálovány faktory 0,7; 0,8; 0,9; 1,0. Simulace v explicitním rozpouštědle byly spuštěny jako kontrola výsledků, které byly získány simulacemi v implicitním rozpouštědle.

Postup modifikace vdW parametrů. Při změně vdW parametrů jsem vycházela z standardně připraveného parametrového souboru (topology, .TOP), ve kterém jsem pomocí skriptů změnila hodnoty vybraných Lennard-Jonesových koeficientů. Nejprve jsem v topu v části „FLAG ATOM NAME“ našla číslo pozice pro interagující atomový typ, který jsem hledala. Poté jsem v části „FLAG ATOM TYPE_INDEX“ podle tohoto nalezeného čísla zjistila IAC, ze kterého jsem vypočítala ICO z Rovnice 7

$$\text{Index} = \text{ICO} [\text{NTYPES} \cdot (\text{IAC} (i)-1) + \text{IAC} (j)]$$

Rovnice 7

kdy $i < j$ a $\text{NTYPES} = 15$

Hodnotu, kterou jsem vypočítala jako ICO jsem odpočítala v části „NONBONDED_PARM_INDEX“ a tím zjistila číslo pozice, kterou jsem nakonec v části, která je pojmenována „LENNARD_JONES_ACOEF“ a „LENNARD_JONES_BCOEF“ změnila. Původní hodnoty koeficientů v takto zjištěných místech, které jsem následně měnila, jsou zapsány v Tabulce 20.

Tabulka 20. Původní hodnoty Lennard-Jonesových koeficientů A a B pro interagující atomové typy

	C	CT	O	N
C	A $8,19971662 \cdot 10^5$	A $9,24822270 \cdot 10^5$	A $5,74393458 \cdot 10^5$	A $8,82619071 \cdot 10^5$
	B $5,31102864 \cdot 10^2$	B $5,99015525 \cdot 10^2$	B $5,55666448 \cdot 10^2$	B $6,53361429 \cdot 10^2$
CT		A $1,04308023 \cdot 10^6$	A $6,47841731 \cdot 10^5$	A $9,95480466 \cdot 10^5$
		B $6,75612240 \cdot 10^2$	B $6,26720080 \cdot 10^2$	B $7,36907417 \cdot 10^2$
O			A $3,79876399 \cdot 10^5$	A $6,06829342 \cdot 10^5$
			B $5,64885984 \cdot 10^2$	B $6,77220874 \cdot 10^2$
N				A $9,44293233 \cdot 10^5$
				B $8,01323529 \cdot 10^2$

Tyto hodnoty v „LENNARD_JONES_ACOEF“ a „LENNARD_JONES_BCOEF“ jsem ještě navíc ověřila pomocí vytvořeného skriptu, který mi sloužil jako kontrola. Pokud jsem spouštěla simulace v explicitním rozpouštědle, musela jsem ještě navíc počítat s interakcemi s vodou (atomový typ OW). Tyto hodnoty A a B koeficientů jsou zapsány v Tabulce 21.

Tabulka 21. Hodnoty Lennard-Jonesových koeficientů A a B pro atomové typy interagující s vodou v explicitním rozpouštědle.

	C	CT	O	N
OW	A $6,96790708 \cdot 10^5$	A $7,85890042 \cdot 10^5$	A $4,72934643 \cdot 10^5$	A $7,42364908 \cdot 10^5$
	B $5,64503554 \cdot 10^2$	B $6,36687196 \cdot 10^2$	B $5,81361517 \cdot 10^2$	B $6,90894667 \cdot 10^2$

Takto nalezené hodnoty jsem skriptem zaměnila za škálované A a B koeficienty (v implicitním rozpouštědle byly škálovací faktory 0,7; 0,75; 0,8; 0,85; 0,87; 0,9; 0,95; 1; 1,05; 1,1 a 1,3 a v explicitním rozpouštědle 0,7 ; 0,8 ; 0,9).

Výsledky změn parametrů DNA po použití daných škálovacích faktorů během počítačových simulací s modifikovanými van der Waalsovými parametry jsou zaznamenány pro implicitní rozpouštědle v Tabulce 22 a pro explicitní rozpouštědle v Tabulce 23.

Tabulka 22. Hodnoty parametrů DNA při škálování vdW parametrů v implicitním rozpouštědle.

Parametr	Škálovací faktor vdW											
	X-ray	0,7	0,75	0,8	0,85	0,87	0,9	0,95	1	1,05	1,1	1,3
MŽ	10,93	12,9	13,4	13,4	10,4	13,4	13,1	13,0	12,7	12,9	11,4	9,0
VŽ	17,51	16,7	21,0	21,1	20,2	20,7	20,7	20,5	19,9	20,2	20,5	20,9
χ	-117,24	-118,2	-118,2	-120,2	-117,6	-119,7	-118,7	-119,7	-115,7	-119,4	-119,2	-118,3
α	-57,56	-73,1	-72,0	-70,8	-71,1	-71,0	-71,1	-70,8	-71,3	-70,6	-70,7	-70,5
β	67,07	173,9	171,9	172,8	172,5	172,8	172,3	172,4	171,9	172,2	171,1	168,4
γ	59,51	56,1	56,7	57,3	55,3	56,2	56,5	55,3	56,2	56,0	55,2	55,9
δ	122,72	127,3	121,3	118,8	123,3	119,9	120,6	120,1	121,8	119,9	121,5	124,3
ϵ	25,10	-171,1	-172,1	-172,4	-172,3	-172,4	-172,6	-172,6	-173,2	-172,8	-173,0	-172,6
ζ	-69,41	-92,6	-92,9	-93,4	-92,9	-93,2	-93,0	-93,0	-92,8	-92,9	-92,3	-92,2
P	127,62	139,97	130,30	126,91	134,16	128,67	129,50	128,81	131,20	128,80	131,11	136,46
tm	46,40	38,32	37,48	37,17	37,20	37,20	37,34	37,21	37,35	37,14	37,22	37,29
shift	-0,01	0,07	0,00	0,00	-0,04	-0,01	0,02	0,00	0,05	-0,01	-0,01	0,09
slide	0,11	-0,29	-0,62	-0,70	-0,44	-0,68	-0,60	-0,64	-0,46	-0,60	-0,54	-0,35
rise	3,08	3,50	3,61	3,55	3,63	3,50	3,53	3,47	3,43	3,44	3,49	3,65
tilt	-0,17	2,30	-0,04	0,03	1,72	-0,01	-0,10	0,04	0,87	-0,05	0,01	-0,04
roll	0,02	-2,26	3,49	5,00	0,50	4,99	4,44	4,52	3,19	4,94	1,72	-3,55
twist	32,62	42,5	32,0	31,0	35,9	31,4	32,4	31,8	33,0	32,0	33,6	37,9
shear	0,01	0,37	0,02	0,00	-0,02	-0,01	-0,06	0,01	0,09	0,01	0,05	-0,17
buckle	-0,31	2,74	0,13	0,05	-0,24	-0,13	-0,22	-0,19	0,08	0,10	-0,92	7,46
stretch	-0,22	-0,19	-0,06	-0,03	-0,04	-0,04	0,00	-0,03	-0,02	-0,02	-0,01	0,04
propeller	-12,49	-4,8	-8,8	-9,7	-9,1	-9,7	-11,8	-10,7	-10,3	-11,5	-12,8	-16,5
stagger	0,11	-0,05	-0,04	-0,11	0,00	-0,06	-0,06	-0,03	-0,02	-0,03	0,01	0,13
opening	-0,23	-3,99	0,69	0,46	1,46	0,63	1,57	0,70	0,80	0,81	0,89	0,46

Pozn.

VŽ – velký žlábek

MŽ – malý žlábek

P – pseudorotační úhel

tm – amplituda pseudorotace

Tabulka 23. Hodnoty parametrů DNA při škálování vdW parametrů v explicitním rozpouštědle.

Parametr	X-ray	Škálovací faktor vdW			
		0,7	0,8	0,9	1
MŽ	10,93	12,6	12,6	12,6	12,2
VŽ	17,51	21,6	21,4	21,2	19,5
χ	-117,24	-130,6	-129,7	-130,7	-115,2
α	-57,56	-69,6	-69,9	-68,7	-72,7
β	67,07	172,5	169,0	172,4	168,1
γ	59,51	56,8	57,0	56,9	54,7
δ	122,72	116,5	116,0	114,9	123,4
ϵ	25,10	-172,4	-172,1	-172,8	-172,6
ζ	-69,41	-89,5	-89,0	-89,4	-89,7
P	127,62	121,93	121,27	119,97	133,15
tm	46,40	41,07	40,79	40,79	37,70
shift	-0,01	0,01	-0,06	0,00	0,02
slide	0,11	-1,02	-0,95	-0,95	-0,24
rise	3,08	3,40	3,35	3,36	3,37
tilt	-0,17	-0,02	-0,02	0,06	0,17
roll	0,02	3,34	3,29	3,91	3,54
twist	32,62	31,2	31,3	31,7	32,6
shear	0,01	0,01	0,03	0,00	-0,02
buckle	-0,31	0,27	0,33	-0,16	-0,21
stretch	-0,22	-0,08	-0,08	-0,05	-0,03
propeller	-12,49	-9,2	-9,7	-10,5	-12,6
stagger	0,11	-0,01	0,03	0,03	0,01
opening	-0,23	-0,09	0,00	-0,11	0,82

Pozn.

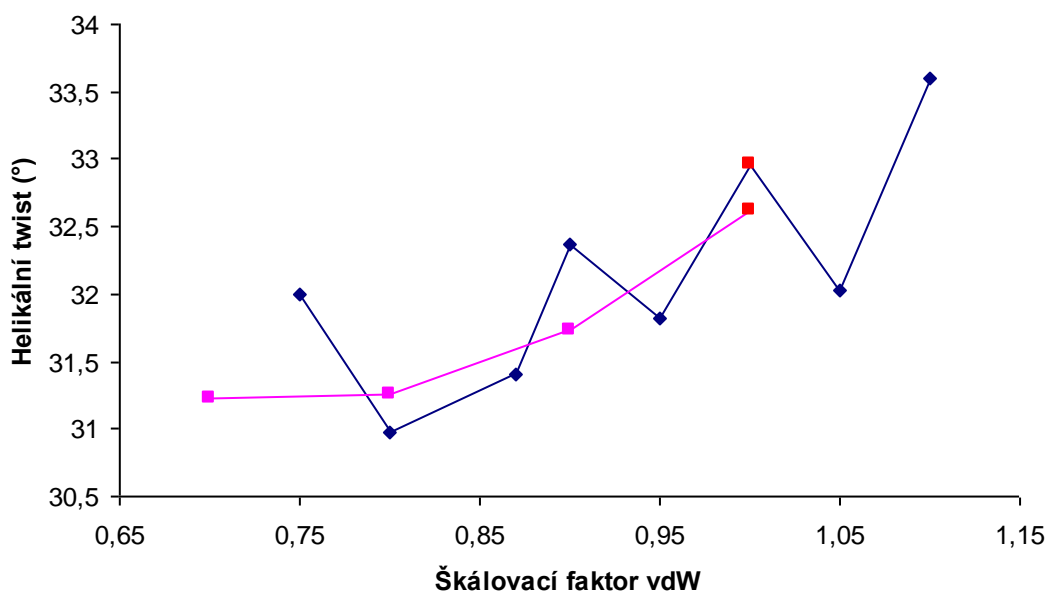
VŽ – velký žlábek

MŽ – malý žlábek

P – pseudorotační úhel

tm – amplituda pseudorotace

Graf 16. Závislost twistu na změně škálování vdW parametrů v explicitním rozpouštědle (růžová křivka) a v implicitním rozpouštědle (modrá křivka).



Na hodnotách v Grafu 16 a Tabulek 22 a 23 je vidět značný rozptyl dat. Do Grafu 16 jsem v případě implicitního rozpouštědla nezahrnula body pro škálování 0,7; 0,85 a 1,3, protože ve struktuře došlo při těchto hodnotách k poruše párování u více dusíkatých bází. Z grafu je ale přesto patrný trend zvětšování helikálního twistu se zesilováním vdW interakcí, a to jak v implicitním, tak v explicitním rozpouštědle. Při zvýšených hodnotách vdW koeficientů však dochází k deformacím struktury, takže ani tímto způsobem nelze velikost helikálního twistu zcela korigovat. Pro úplnost jsou v Tabulkách 22 a 23 uvedeny i hodnoty dalších parametrů struktury DNA.

ZÁVĚR

DNA a RNA jsou i v dnešní době stále záhadné makromolekuly, na jejichž principy se snaží vědci přijít již několik desítek let. Jednou z možností, jak se těmto makromolekulám přiblížit jsou teoretické modelování a MD simulace.

Kvalita a spolehlivost MD simulací závisí především na dokonalosti empirického potenciálu. U současných empirických potenciálů jsou však známy jisté nedostatky v popisu struktury nukleových kyselin, mezi které patří například velikost malého a velkého žlábků, helikálního twistu, propelleru, α / γ a ϵ / ζ torzí atd.

Cílem mé diplomové práce bylo zjistit, jak malé změny parametrů silového pole ovlivňují strukturu nukleových kyselin. Použila jsem pro to dva různé způsoby. Prvním z nich bylo skenování parametrů během MD simulací, při kterých jsem zkoumala vliv permitivity, vliv změny amplitudy úhlu χ a jeho fázového posunu a vliv změn van der Waalových parametrů na strukturní charakteristiky dodekameru B-DNA a dekameru A-RNA. Druhým způsobem byla tvorba korelačních tabulek ze simulací s nemodifikovaným silovým polem, které měly ukázat, jak tyto strukturní charakteristiky korelují s úhly cukrfosfátové páteře. Ze strukturních parametrů jsem se zaměřila na velikosti malého a velkého žlábků, helikální twist a propeller.

Prvním testovaným parametrem byla permitivita rozpouštědla. Citlivost struktury DNA k permitivitě nás informuje o její reakci na výběr modelu vody, ale také o citlivosti na malé chyby v popisu elektrostatických interakcí. Výsledky ukázaly, že malé změny permitivity výrazně neovlivňují ani velikost žlábků ani helikální twist a zpřesněním modelu vody tedy nedosáhneme úplné opravy struktury nukleových kyselin. Dalším parametrem, který jsem zkoumala, byl úhel χ . U tohoto úhlu jsem měnila jak jeho fázový posun, tak i jeho amplitudu. Z výsledků simulací je zřejmé, že úhel χ do jisté míry ovlivňuje velikost žlábků a helikální twist, nicméně úplné korekce těchto parametrů by samotnou změnou úhlu χ nešlo dosáhnout. Posledním studovaným parametrem empirického potenciálu byly van der Waalovy parametry. Zjistila jsem, že změna hloubky Lennard-Jonesova minima v relativním rozsahu 0,7 – 1,1 má jen malý vliv na helikální twist a ukázalo se tedy, že jej není možné opravit jen a pouze korekcí těchto parametrů.

Některé simulace byly spouštěny jak v explicitním, tak i v implicitním rozpouštědle, což mi umožnilo porovnat vliv těchto rozpouštědel na chování

makromolekul DNA a RNA v molekulárně dynamických simulacích. Pro DNA jsou výsledky srovnatelné a vykazují stejné trendy, což znamená, že implicitní rozpouštědlo může být v tomto případě použito pro získání rychlých a hrubých odhadů vlastností systému. To ovšem neplatí v případě RNA, jejíž struktura nebyla v implicitním rozpouštědle stabilní.

V rámci diplomové práce jsem také zkoumala korelace mezi fluktuacemi hodnot úhlů cukrfosfátové páteře a glykosidického úhlu a strukturními parametry nukleových kyselin. Vytvořené korelační tabulky se shodují se známými korelacemi zjištěnými jinými autory. Tyto tabulky odrážejí i korelace ϵ/ζ a α/γ a potvrzují předpokládaný vliv některých úhlů cukrfosfátové páteře na velikost žlábků a helikální twist. Kromě toho obsahují několik dalších významných korelací. Získané tabulky přehledně ukazují souvislosti mezi úhly, které můžeme ovlivnit modifikací empirického potenciálu, a strukturou nukleových kyselin. Proto mohou být užitečné při vývoji nových kvalitnějších empirických potenciálů.

SUMMARY

Nucleic acids (DNA and RNA) play a fundamental role in our lives. One way of approaching the world of nucleic acids is through their theoretical modeling. Growing interest in this field motivated also my diploma thesis.

The rising interest in theoretical modeling of DNA and RNA is mainly due to still more powerful computers which allow for longer molecular dynamics (MD) simulations and for larger biomolecules to be simulated. Reliability of the MD simulations however depends on the quality of the force field used. None of the currently used force fields is perfect and there are known problems with description of certain structural parameters, such as helical twist, propeller, α / γ , ϵ / ζ torsions, size of the small and large grooves of DNA, etc. Much effort is spent on improving the force fields and correcting their deficiencies.

The aim of this work was to study which force field parameters affect the selected structural parameters. Two different approaches are used. First, selected parameters are gradually changed (scanned) and the effect of these changes on simulated DNA and RNA structures is examined (relative permittivity, the torsion angle χ and van der Waals parameters). Second, MD simulations with unmodified force field are run and the correlations between selected force field parameters and structural parameters are examined. I used parm99bsc0 force field (with correction of α/γ flips) for DNA and parm99 force field for RNA, both in AMBER program package. TIP3P explicit water model was used and results are compared with the Generalized Born (GB) implicit solvent.

The first tested parameter was the permittivity of the solvent. Sensitivity of DNA structure to permittivity informs us about its response to the choice of water model, but also about its sensitivity to small errors in electrostatics. Results showed that small variations in solvent permittivity do not significantly affect either the size of the grooves or the helical twist.

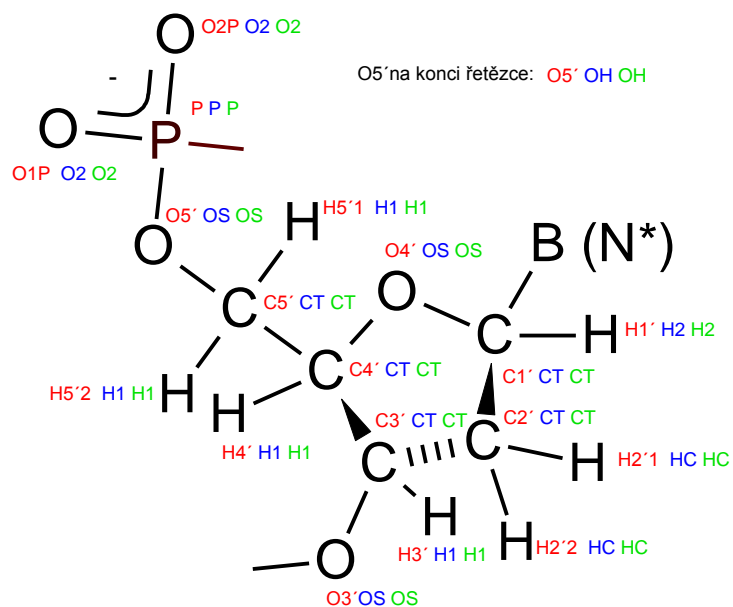
Another tested parameter was glycosidic torsion angle χ , where I systematically changed its phase shift and amplitude. Simulations showed that the angle χ does affect the groove widths and helical twist to some extent, but a complete correction of these parameters could not be achieved solely by modifying the χ angle. Modification of the vdW parameters does influence the helical twist (decrease of vdW well depth decreases

the helical twist), but also here complete correction of helical twist can not be achieved solely through the vdW parameters. Several simulations were performed both in the explicit and implicit solvent and results are in general comparable and exhibit the same trends. This means that when implicit solvent supports stable trajectory, it can be used to obtain quick and rough estimates of the properties of the system under study.

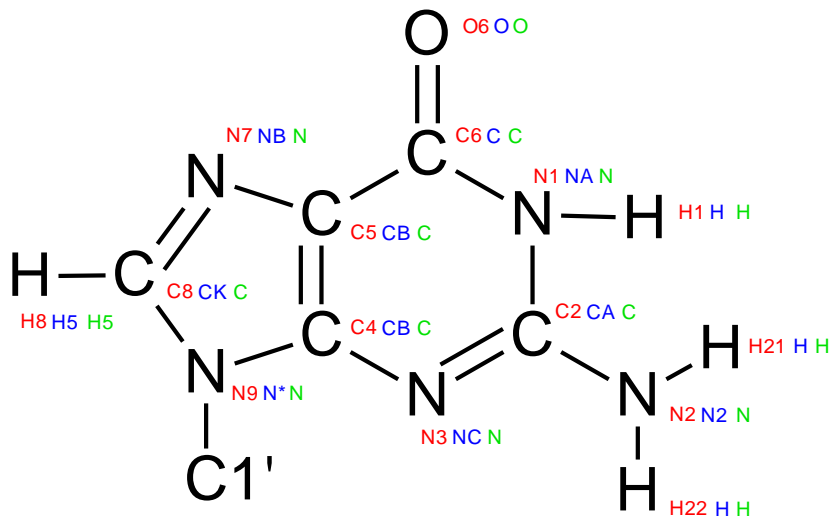
Correlations between the force field parameters (backbone torsion angles) and nucleic acids structural parameters (groove widths, helical parameters etc.) were also derived. For the torsion angle χ the dependencies found are roughly in agreement with the results described above. Correlation tables show the correlations found previously by other authors and describe also several other correlations. These tables may be helpful in a difficult process of construction of the new improved force fields.

PŘÍLOHY

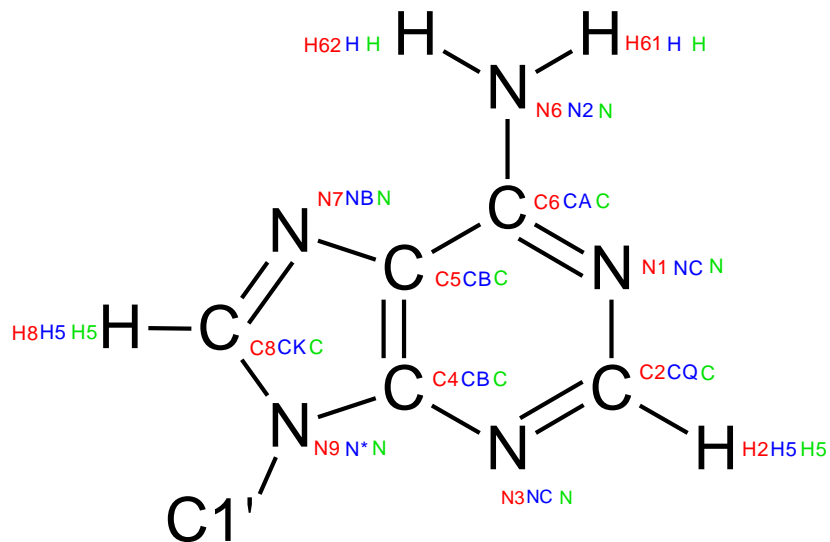
Obrázek P-1. Cukrfosfátová páteř: červeně – atomové jméno, modře – atomový typ, zeleně – konečný atomový typ, B = báze vázaná přes N* dusík.



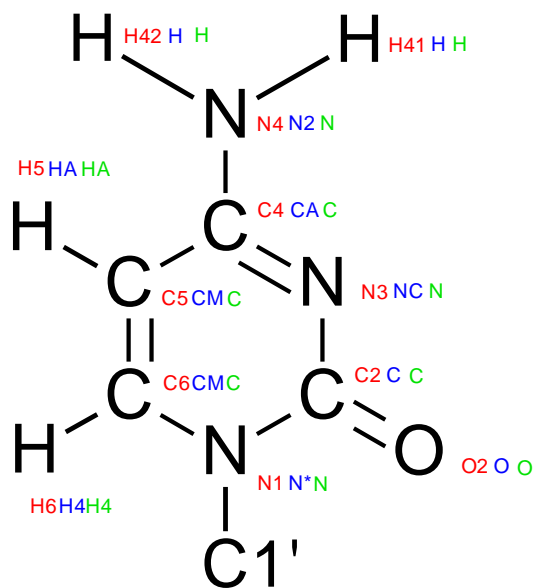
Obrázek P-2. Guanin: červeně – atomové jméno, modře – atomový typ, zeleně – konečný atomový typ.



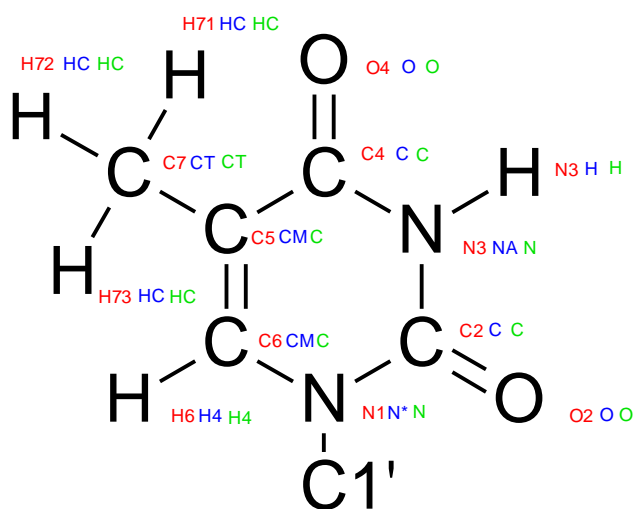
Obrázek P-3. Adenin: červeně – atomové jméno, modře – atomový typ, zeleně – konečný atomový typ.



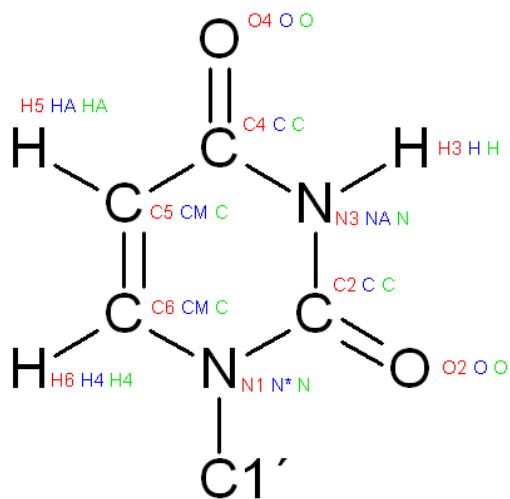
Obrázek P-4. Cytosin: červeně – atomové jméno, modře – atomový typ, zeleně – konečný atomový typ.



Obrázek P-5. Tymin: červeně – atomové jméno, modře – atomový typ, zeleně – konečný atomový typ.



Obrázek P-6. Uracil: červeně – atomové jméno, modře – atomový typ, zeleně – konečný atomový typ.



Použitá literatura

- [1] <http://en.wikipedia.org/wiki/DNA> (dostupné z února 2010).
- [2] Bartoš, M., Bartošová, L. *Základy molekulární biologie pro farmaceuty. Veterinární a farmaceutická Univerzita Brno, Brno 2006.*
- [3] Watson, J.D., Crick, F.H.C. A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* **171**, 737, 1953.
- [4] Murray, R. K. *Harperova biochemie. H & H, Jinočany, 2002*
- [5] Neidle, S. *DNA Structure and Recognition. Oxford University Press, New York 1994.*
- [6] Přednášky Nekovalentní interakce, prof. Ing. Pavel Hobza, DrSc., FRSC.
- [7] Leontis, N. B., Westhof, E. The annotation of RNA motifs. *Komparative and Functional Genomics* **3** (6), 518, 2002.
- [8] Schneider, Ch. *Nucleic Acids Nomenclature and Structure. Jena Library of Biological Macromolecules.*
- [9] Klein, D.J., Schmeing, T.M., Moore, P.B., Steitz, T.A. The kink-turn: a new RNA secondary structure motif. *EMBO Journal* **20**, 4214, 2001.
- [10] Bates, A. D., Maxwell, A. *DNA Topology. Oxford University Press, New York 1993.*
- [11] Noy, A., Pérez, A., Lanka, F., Luque, J.F., Orozco, M. Relative Flexibility of DNA and RNA: a Molecular Dynamics Study. *Journal of Molecular Biology* **343** (3), 627, 2004.
- [12] Neidle, S. *Principles of Nucleic Acid Structure. Oxford University Press, 2002.*
- [13] www.ncbr.chemi.muni.cz/~evaf/c7925/nomenklatura.ppt (dostupné z února 2010).
- [14] Foloppe, N., MacKerell, A. D. Contribution of the Phosphodiester Backbone and Glycosyl Linkage Intrinsic Torsional Energetics to DNA Structure and Dynamics. *Journal of Physical Chemistry*. **103** (49), 10955, 1999.
- [15] Mackerell, A., D. Contribution of the Intrinsic Mechanical Energy of the Phosphodiester Linkage to the Relative Stability of the A, BI, and BII Forms of Duplex DNA. *Journal of Physical Chemistry* **113** (10), 3235, 2009.
- [16] Ode, H., Matsuo, Y., Neya, S., Hostino, T. Force Field Parameters for Rotation Around χ Torsion Axis in Nucleic Acids. *Journal of Computational Chemistry* **29**, 2531, 2008.

- [17] Svozil, D., Kalina, J., Omelka, M., Schneider, B. DNA conformations and their sequence preference. *Nucleic Acids Research* **36**, 3690, 2008.
- [18] Richardson, J.S., Schneider, B., Murray, L.W., Kapral, G.J., Immormino, R.M., Hrade, J.J., Richardson, D.C., Ham, D., Hershkovits, E., Williams, L.D., Kratiny, K.S., Pyle, A.M., Micallef, D., Westbrook, J., Berman, H.M. RNA backbone: Consensus all-angle conformers and modular string nomenclature (an RNA Ontology Consortium contribution). *RNA Society* **14**, 465, 2008.
- [19] [http://ww2.chemistry.gatech.edu/~lw26/bCourse Information/6521/nucleic acid /A B Z/helical parameters.html](http://ww2.chemistry.gatech.edu/~lw26/bCourse%20Information/6521/nucleic%20acid/A%20B%20Z/helical%20parameters.html) (dostupné z února 2010).
- [20] http://cs.wikipedia.org/wiki/V%C3%BDpo%C4%8Detn%C3%AD_chemie (dostupné z února 2010).
- [21] Cheatham, T.E., Young, M.A. Molecular Dynamics Simulation of Nucleic Acids: Successes, Limitations, and Promise. *Biopolymers* **56** (4), 232, 2001.
- [22] Mackerell, A., D. Empirical Force Fields for Biological Macromolecules: Overview and Issues. *Journal of Computational Chemistry* **25**, 1584, 2004.
- [23] Pearlman, D.A., Case, D.A., Caldwell, J.W., Ross, W.S., Cheatham, T.E.III, Debolt, S., Ferguson, D., Seibel, G.L., Kollman, P.A. AMBER, a package of computer programs for applying molecular mechanics, normal mode analysis, molecular dynamics a free energy calculations to simulate the structural and energetic properties of molecules, *Computer Physics Communications* **91**, 1, 1995.
- [24] Cornell, W.D., Cieplak, P., Bayly, C.I., Gould, I.R., Merz, K.M. Jr., Ferguson, D.M., Spellmeyer, D.C., Fox, T., Caldwell, J.W., Kolman, P.A. A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules. *Journal of the American Chemical Society* **117** (19), 5179, 1995.
- [25] <http://en.wikipedia.org/wiki/AMBER> (dostupné z února 2010).
- [26] <http://meta.cesnet.cz/cs/docs/aplikace/software/amber.html> (dostupné z února 2010).
- [27] Brooks, B. R., Bruccoleri, R. E., Olafson, B. D., States, D. J., Swaminathan, S., Karplus, M. CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *Journal of Computational Chemistry* **4**, 187, 1983.

- [28] Pérez, A., Lankaš, F., Luque, F. J., Orozco, M. Towards a molecular dynamics consensus view of B-DNA flexibility. *Nucleic Acids Research* **36**, 2379, 2008.
- [29] Lennard Jones, J. E. On the Determination of Molecular Fields. *Proceedings of the Royal Society* **106**, 463, 1924.
- [30] http://en.wikipedia.org/wiki/Lennard-Jones_potential (dostupné z února 2010).
- [31] Přednášky Molekulové modelování, doc. RNDr. Michal Otyepka, Ph.D.
- [32] Novák, J. Fyzikální chemie. VŠCHT Praha, 2008.
- [33] Jorgensen, W.L., Chandrasekhar, J., Madura, J.D., Impey, R. W., Klein, M.L. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *Journal of Chemical Physics* **112**, 926, 1983.
- [34] Jorgensen, W.L., Madura, J.D. Temperature and size dependence for monte carlo simulations of TIP4P water. *Molecular Physics* **56** 1381, 1985.
- [35] Berendsen, H. J. C., Grubera, J. R., Straatsma, T. P. The missing term in effective pair potentials. *Journal of Physical Chemistry* **91**, 6269, 1987.
- [36] <http://www1.lsbu.ac.uk/water/models.html> (dostupné z února 2010).
- [37] Lu, Q. & Luo, R. A Poisson-Boltzmann dynamics method with nonperiodic boundary condition. *Journal of Chemical Physics* **119**, 11035, 2003.
- [38] Bashford, D., Case, A.D. GENERALIZED BORN MODELS OF MACROMOLECULAR SOLVATION EFFECTS. *Annual Review of Physical Chemistry* **51**, 129, 2000.
- [39] Lankaš, F., Šponer, J., Langowski, J., Cheatham, T.E. DNA Basepair Step Deformability Inferred from Molecular Dynamics Simulations. *Biophysical Journal* **85**, 2872, 2003.

Použité zkratky

DNA ... deoxyribonukleová kyselina

RNA ... ribonukleová kyselina

VŽ ... velký žlábek

MŽ ... malý žlábek

Å ... angström

A ... adenin

G ... guanin

C ... cytosin

T ... tymin

U ... uracil

B ... dusíkatá báze

GB ... Generalized Born

PB... Poisson-Boltzmann

AMBER ... Assisted Model Building with Energy Refinement

CHARMM ... Chemistry at Harvard Molecular Mechanics

VMD ... Visual Molecular Dynamics

MD ... molekulová dynamika

NMR ... nukleární magnetická rezonance

RMS ... Root Mean Square

vdW ... van der Wals