

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální chemie



## **Interakce RNA s uhlíkovými nanomateriály**

Bakalářská práce

Autor práce:	Andrea Nedělníková
Vedoucí práce:	Mgr. Markéta Paloncýová, Ph.D.
Studijní program:	B 1407 Chemie
Studijní obor:	Aplikovaná chemie
Forma studia:	Prezenční

**Olomouc 2023**

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité zdroje informací a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Olomouci dne \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

podpis

## **Poděkování**

Tímto bych ráda poděkovala vedoucí mé bakalářské práce Mgr. Markétě Paloncýové, Ph.D. za všestrannou pomoc, množství cenných a inspirativních rad, podnětů, připomínek a zároveň za velkou ochotu při konzultacích poskytnutých ke zpracování této práce.

Taktéž bych chtěla poděkovat Mgr. Petře Kührové, Ph.D. za vstřícnost, ochotu a pomoc při získání potřebných informací a podkladů pro popis a simulaci RNA.

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora:	Andrea Nedělníková
Název práce:	Interakce RNA s uhlíkovými nanomateriály
Typ práce:	bakalářská
Pracoviště:	Katedra fyzikální chemie
Vedoucí práce:	Mgr. Markéta Paloncýová, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2023

## Abstrakt

Každému třetímu člověku bývá během života zjištěn nádor. Pro úspěšnou léčbu je důležité nádor včas odhalit, správně jej diagnostikovat a zvolit účinný způsob léčby. Ve všech třech oblastech se jeví jako vhodní kandidáti zejména uhlíkové nanomateriály díky svým vlastnostem. Uhlíkové tečky mají potenciál zejména ve zkvalitnění zobrazovacích metod. Nicméně uhlíkové tečky mohou být využity k cílenému transportu léčiv, kde např. ribonukleová kyselina RNA může být jak přenášenou látkou (siRNA v genovém umlčování), tak cílem pro uhlíkové tečky v organismu. Nicméně před praktickým použitím těchto látek je nutné pečlivě prozkoumat interakce uhlíkových nanomateriálů s organismem počínaje nejhojněji zastoupenými biomolekulami. Zde řadíme i RNA vyskytující se ve všech buňkách, která hraje klíčovou roli v překlada genetického kódu.

Tato práce se zaměřila na studium interakcí dvou motivů sekundární struktury ribonukleové kyseliny (dvoušroubovice a smyčky) s uhlíkovými tečkami s navázanými funkčními skupinami pomocí počítačových simulací. Na základě výsledků bylo možné posoudit, jak vliv motivu a typu bází RNA, tak vliv funkční skupiny na povrchu uhlíkové tečky na vzájemné interakce. Duplex RNA poskytuje pro možné interakce své terminální báze, velký a malý žlábek, smyčka navíc umožňuje interakci s volnými bázemi. Jako nejpreferovanější interakce duplexu se ukázala patrová interakce krajní vrstvy uhlíkové tečky na terminální báze. Pro smyčku byla preferovanější patrová interakce uhlíkové tečky s volnou bází smyčky. Uhlíková tečka bez funkčních skupin v simulacích s duplexem nejčastěji zaujala polohu v malém žlábků, kde interagovala s ribózami. Téměř ve všech simulacích došlo k interakci mezi uhlíkovými tečkami a RNA. Tato interakce však nevedla k degradaci struktury RNA, což můžeme považovat za pozitivní výsledek.

Klíčová slova:	uhlíkové tečky, kvantové tečky, RNA
Počet stran:	47
Počet příloh:	2
Jazyk:	český

## Bibliographical identification

Author's first name and surname:	Andrea Nedělníková
Title:	Interaction of RNA with carbon nanomaterials
Type of thesis:	bachelor
Department:	Department of Physical Chemistry
Supervisor:	Mgr. Markéta Paloncýová, Ph.D.
The year of presentation:	2023

## Abstract

One in three people will be diagnosed with a tumour in their lifetime. Successful treatment depends on early detection, correct diagnosis and effective treatment. In all three areas, carbon nanomaterials appear to be suitable candidates due to their properties. Carbon dots have the potential to improve imaging methods, as well as in targeted drug delivery. Ribonucleic acid RNA can act as a carrier (siRNA in gene silencing) or as a target for carbon dots in the organism. However, before practical application, the interactions of carbon nanomaterials with the organism must be carefully studied, starting with the most abundant biomolecules, including the RNA, which is present in all cells and plays a key role in the translation of the genetic code.

This work was focused on the study of the interactions of two RNA structure motifs (duplex and hairpin loop) with carbon dots with functional groups using computer simulations. We were able to discuss the influence of the motif and the type of RNA bases, as well as the influence of the functional group on the carbon dot surface on the interactions. Duplex RNA provides terminal bases, major and minor grooves for the interaction. The hairpin loop allows the carbon dot to interact with unpaired bases. The most preferred interaction for the duplex was the  $\pi$ - $\pi$  stacking interaction of the carbon dot layer on the terminal bases. In simulations containing the carbon dot and the hairpin loop, stacking of the carbon dot on the unpaired base of the loop occurred most frequently. The carbon dot without functional groups in simulations with one of the duplexes most often occupied a position in the minor groove where it interacted with ribose.

In almost all simulations, there was an interaction between the carbon dots and the RNA. However, this interaction did not lead to degradation of the RNA structure, which can be considered a positive result.

Key words:	carbon dots, quantum dots, RNA
Number of pages:	47
Number of appendices:	2
Language:	Czech

# Obsah

## Teoretická část

1	Úvod .....	1
2	Ribonukleová kyselina .....	2
2.1	Funkce RNA.....	2
2.2	Primární, sekundární a terciální struktura RNA.....	2
2.3	Popis struktury RNA .....	4
2.4	Stabilita RNA.....	5
3	Uhlíkové nanomateriály .....	6
3.1	Uhlíkové tečky .....	6
4	Výpočetní chemie.....	10
4.1	Molekulová mechanika .....	10
4.2	Molekulová dynamika .....	12

## Praktická část

5	Popis simulací.....	13
5.1	Simulované struktury.....	13
5.2	Analýza MD trajektorií.....	17
6	Výsledky .....	18
6.1	Přehled výsledků simulací.....	18
6.2	Přehled typů a četností interakcí RNA.....	26
6.3	Přehled typů a četností interakcí CD .....	27
6.4	Zhodnocení.....	30
7	Závěr .....	31
8	Summary .....	32
9	Použité zdroje.....	33
10	Přílohy .....	37
10.1	Příloha 1 – Přehled simulovaných modelů .....	37
10.2	Příloha 2 - Simulační protokoly.....	39

# 1 Úvod

Nanomateriály k sobě přitahují pozornost v mnoha odvětvích díky svým výjimečným vlastnostem. Mnohé nanomateriály mají unikátní vlastnosti, ale nejsou vhodné pro všechny aplikace. Například kvantové tečky na bázi kadmia vykazují skvělé optické vlastnosti, ale kvůli své toxicitě nejsou vhodné pro medicínské aplikace. Naproti tomu uhlíkové tečky, které sice ve srovnání s kvantovými tečkami na bázi kovů nemají tak dobré optické vlastnosti, jsou pro lidský organismus téměř netoxické.

Uhlíkové tečky patří z hlediska dimenzionality mezi 0D nanomateriály, skládají se zpravidla z několika málo vrstev grafenu, které jsou drženy pohromadě patrovými interakcemi. Z hlediska medicínských aplikací je zajímavá nejen jejich nízká toxicita, ale také vynikající optické vlastnosti. Mnohé vědecké skupiny se zabývají vlastnostmi a možnými aplikacemi uhlíkových teček v prevenci (senzory apod.), diagnostice (CT, magnetická rezonance apod.) i samotné léčbě různých onemocnění (fototermální terapie, fotodynamická terapie, cílený transport léčiv apod.). Do popředí se dostává také využití uhlíkových teček v teranostice, která efektivně propojuje diagnostiku s přímou možností léčby.

Před reálnými aplikacemi je nicméně potřeba podrobně prozkoumat interakce uhlíkových teček s látkami běžně se v organismu vyskytujícími. Mezi základní biomolekuly bezpochyby patří RNA, která se nachází ve všech buňkách a hraje nezastupitelnou roli v proteosyntéze.

V současné době jsou uhlíkové tečky studovány především experimentálně v laboratořích. Počet teoretických prací, které se věnují interakcím uhlíkových teček s látkami běžně se v těle vyskytujícími nebo interagujícími konkrétně s RNA, je však nízký.

Cílem této práce bylo na základě provedení molekulových simulací zanalyzovat a popsat interakce a změny chování struktur RNA a uhlíkových teček. Molekulové simulace umožňují pohled na chování struktur a jejich interakce v atomárním měřítku, čímž velmi napomáhají lepšímu pochopení mechanismů interakcí či reakcí.

RNA se v těle vyskytuje jak ve formě krátkých vláken, tak v komplexních strukturách jako jsou ribozomy, kde plně spárované části jsou střídány místy, kde báze nejsou plně spárované se svými komplementárními bázemi. Simulace s takovým počtem atomů, jako mají ribozomy, není v současné době v atomárním rozlišení výpočetně možná. Proto byly pro simulace vybrány tři duplexy, které představují plně spárované části, a smyčka, která obsahuje nespárované báze. Vlastnosti a chování uhlíkových teček jsou podmíněné jejich nábojem a přítomností funkčních skupin, proto byly v simulacích použity tři různé typy uhlíkových teček – dvě jsou pokryté nabitými funkčními skupinami a jedna uhlíková tečka nemá na svém povrchu žádnou funkční skupinu a ani náboj.

# Teoretická část

## 2 Ribonukleová kyselina

Ribonukleová kyselina RNA (z angl. *ribonucleic acid*) patří spolu s DNA (z angl. *deoxyribonucleic acid*) mezi nukleové kyseliny (NA), což jsou makromolekulární látky, které se skládají z několika opakujících se základních jednotek – nukleotidů. Nukleotid je tvořen fosfátem, pětiuhlíkatým cukrem a bází. V nukleových kyselinách se mohou objevovat pyrimidinové (cytosin C, thymin T, uracil U) a purinové báze (adenin A, guanin G). Struktura RNA a DNA se liší ve vyskytujícím se cukru a jedné z pyrimidinových bází. Zatímco v molekule RNA najdeme ribózu a uracil, v DNA se setkáme s deoxyribózou a thyminem. Adenin, guanin, cytosin i fosfát jsou přítomny v obou molekulách.

### 2.1 Funkce RNA

RNA má nezastupitelnou roli v syntéze proteinů – během transkripce je informace z DNA přepsána do mediátorové RNA (mRNA), která putuje cytoplazmou do ribozomu. Ribozom je ribonukleoprotein obsažený ve všech buňkách, který je tvořený zejména ribozomální RNA (rRNA) a proteiny. V ribozomu dochází k translaci sekvence mRNA do pořadí aminokyselin, ze kterých vzniká protein. Ke třem po sobě jdoucím bázím mRNA je přiřazen antikodon nesoucí konkrétní aminokyselinu. Antikodon, který svým tvarem připomíná jetelový list, je tvořen transferovou RNA (tRNA). RNA u některých virů zastupuje funkci DNA jako nositele genetické informace, tyto viry jsou proto také označovány jako RNA viry. RNA má oproti deoxyribóze na uhlíku C2' navázanou hydroxylovou skupinu, která stojí za zvýšenou reaktivitou RNA oproti DNA, snadno podléhá hydrolýze a je tedy méně stabilní. Na stranu druhou, tato hydroxylová skupina umožňuje RNA vykonávat i některé enzymatické funkce nebo vstupovat do interakcí s proteiny.<sup>1</sup>

### 2.2 Primární, sekundární a terciální struktura RNA

Molekula RNA může být charakterizována na základě primární, sekundární a terciální struktury, přičemž celková konformace RNA má vliv na její vlastnosti, stabilitu a chování.

#### 2.2.1 Primární struktura

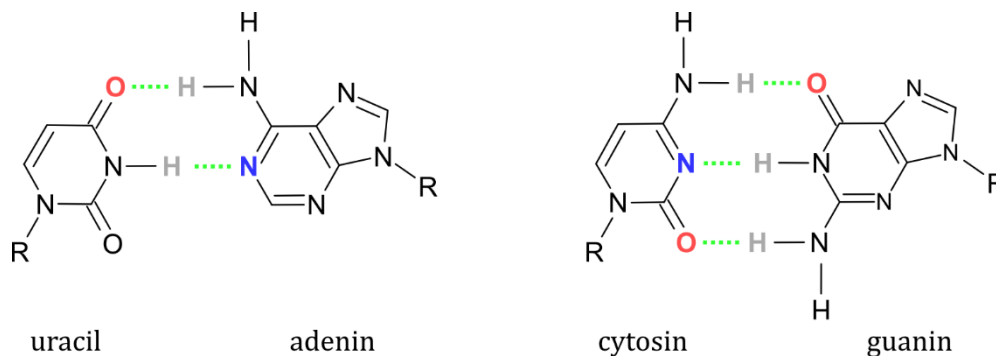
Primární struktura RNA, také označována jako sekvence, je dána pořadím navázání jednotlivých nukleotidů. Sekvenci popisujeme na základě toho, jak je RNA syntetizována v buňce, tedy od 5' k 3' konci. Nukleotid je tvořen fosfátem, ribózou a jednou z bází vyskytujících se v RNA, tedy adeninu, guaninu, cytosinu nebo uracilu. Fosfát, zbytek kyseliny trihydrogenfosforečné, je s ribózou propojen fosfodiesterovou vazbou, a vzhledem k tomu, že je v deprotonované formě, nese záporný náboj. Ribóza je cyklický monosacharid skládající se z pěti uhlíků. Báze je připojena k uhlíku C1' glykosidickou



vazbou. Cukr-fosfátová páteř nese záporný náboj a má polární charakter, zatímco báze mají charakter nepolární.

## 2.2.2 Sekundární struktura

Sekundární struktura RNA je založena především na kanonickém, tzv. Watson – Crickově (WC) párování bází, kdy se uracil páruje s adeninem pomocí dvou vodíkových vazeb a cytosin s guaninem pomocí tří vodíkových vazeb (Obrázek 1).



Obrázek 1 Watson-Crickovské párování bází

WC párování výrazně napomáhá stabilizaci struktury RNA. Párováním bází v rámci vlákna dochází ke vzniku plně spárovaných částí (anglicky označováno *stem*) a smyček (anglicky označováno *loop*), kde některé báze zůstávají nespárované.

**Dvoušroubovice RNA** je tvořena dvěma k sobě komplementárními vlákny ribonukleové kyseliny. Tato struktura, která nepatří mezi běžně samostatně se vyskytující konformace RNA, se také nazývá *duplex*.

**Vlásenky**, smyčky umístěné na konci stemu, jsou dále klasifikovány podle počtu nukleotidů ve smyčce (triloopy, tetraloopy, apod.). Počet nukleotidů ve smyčce se pohybuje od 3 do 8 nukleotidů, nejčastější jsou tetraloopy (4 nukleotidy ve smyčce), jelikož díky svému kompaktnímu tvaru mají vysokou tepelnou stabilitu a zvyšují odolnost vůči nekleázám.<sup>2</sup> Nespárované báze ve smyčce mohou vstupovat do dalších interakcí či se podílet na terciální struktuře RNA.

V sekundární struktuře se také vyskytuje nekanonické párování. V nekanonickém párování hraje důležitou roli vodík v hydroxylové skupině na ribóze, který může tvořit vodíkové můstky a vstupovat do dalších interakcí. Navíc každá báze může k interakci pomocí vodíkových vazeb nabídnout kromě Watson-Crickovské hrany své zbývající hrany, tj. Hoogsteenovskou hranu a hranu na straně cukru. Což v kombinaci s hydroxylovou skupinou na cukru přináší celou škálu dalších možností párování pro báze – báze, báze – cukr a cukr – cukr.

## 2.2.3 Terciální struktura













Na terciální struktuře NA, tedy uspořádáním v trojrozměrném prostoru, se podílí kanonické i nekanonické párování bází. Mezi motivy terciální struktury patří různé formy dvoušroubovice (A-formy, B-forma, Z-forma), ale také např. G - kvadruplex, pseudouzle atp. Podobně jako i u dalších biologických struktur hraje právě prostorové uspořádání klíčovou roli v biologickém rozpoznávání.

## 2.3 Popis struktury RNA

Strukturu NA lze popsat pomocí dihedrálních úhlů v torzním prostoru, helikálních parametrů, šířky žlábků a tuhosti. Další část bude podrobněji zaměřena na parametry, které byly ovlivněny interakcí RNA s uhlíkovými tečkami.

### 2.3.1 Helikální parametry

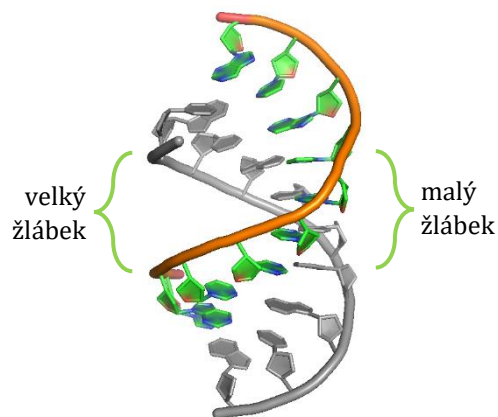
Konformace dvoušroubovice, spárované části RNA, popisujeme helikálními parametry na základě geometrie párování bází. Zajímá nás translace a rotace bází v páru vůči sobě, celého páru bází vůči ose dvoušroubovice a dvou pater vůči sobě navzájem. Tyto parametry jsou shrnuty na obrázku 2, kde jsou pro jednotlivé parametry použity anglické názvy, jelikož ani v české odborné literatuře se neuzívá českých ekvivalentů.

Přehled	Translační parametry	Rotační parametry	Pohyb vůči ose
Báze v páru vůči sobě	shear 	buckle 	X
	stagger 	propeller 	Y
	stretch 	opening 	Z
Pár vůči ose	X displacement Y displacement	inclination tip	X Y
Dvě patra vůči sobě	shift 	tilt 	X
	slide 	roll 	Y
	rise 	twist 	Z

Obrázek 2 Přehled helikálních parametrů (ilustrace převzaty z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10822-016-0007-0>)

### 2.3.2 Žlábký

Ve dvoušroubovici NA jsou vlákna na jedné straně blíže k sobě než na straně druhé – tím vzniká velký a malý žlábek (Obrázek 3). Geometrie obou typů purin-pyrimidinových párů jsou podobné v jejich relativních polohách bází, proto nemá sekvence vláken vliv na tvar žlábků. Změřením hloubky a šířky žlábků lze získat informace o různých konformacích, které může NA nabývat. Zatímco dvoušroubovice DNA zaujímá většinou B-formu dvoušroubovice, duplex RNA se vyskytuje hlavně v A-formě. A-forma dvoušroubovice je ve srovnání s B-formou širší, má hlubší velký žlábek a méně hluboký malý žlábek.<sup>3,4</sup>



Obrázek 3 Velký a malý žlábek duplexu RNA

## 2.4 Stabilita RNA

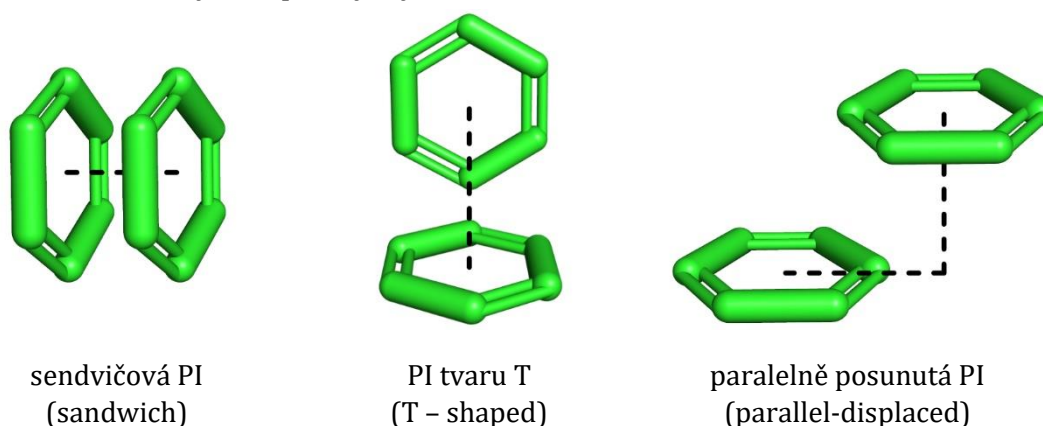
Na stabilitu struktury RNA má zásadní vliv párování bází, patrové  $\pi$ - $\pi$  interakce a rozpouštědlo.<sup>3</sup>

### 2.4.1 Párování bází

Jak bylo uvedeno již dříve, ve struktuře RNA dochází ke kanonickému a nekanonickému párování. Vyskytující se báze mají značný vliv na stabilitu struktury RNA. S rostoucím počtem spárovaných bází vzrůstá stabilita struktury.<sup>5</sup>

### 2.4.2 Patrové interakce

Patrové interakce (PI), také označované  $\pi$ - $\pi$  *stacking*, patří mezi nekovalentní intermolekulární interakce mezi aromatickými molekulami. Na základě vzájemné polohy aromatických částí molekul rozlišujeme tři typy patrových interakcí, jejichž schematické znázornění je na obrázku 4. Mezi komplexnějšími strukturami s aromatickým charakterem, které mají dynamické chování, často nelze jednoznačně rozlišit, zda se primárně jedná o sendvičovou nebo paralelně posunutou PI, proto tyto typy PI nebudou v této práci rozlišovány. Naopak výskyt PI tvaru T bude zdůrazněn.



Obrázek 4 Ukázka typů patrových interakcí mezi aromatickými molekulami  
(inspirováno z [https://en.wikipedia.org/wiki/Pi-Stacking\\_%28chemistry%29](https://en.wikipedia.org/wiki/Pi-Stacking_%28chemistry%29))

### 2.4.3 Rozpouštědlo

Zatímco páteř NA má záporný náboj a hydrofilní charakter, báze NA mají charakter hydrofobní. Tyto opačné vlastnosti se projevují na chování struktury v závislosti na charakteru rozpouštědla. Ve vodném prostředí je kontaktu s molekulami vody vystavena především polární cukr-fosfátová páteř. V nevodném prostředí dochází ke změnám ve struktuře NA, která se odráží např. na teplotě tání. Nezanedbatelný vliv má také přítomnost iontů v rozpouštědle. Záporný náboj páteře je kompenzován kationty, které se shromažďují zejména ve velkém žlábků a napomáhají stabilizaci struktury.<sup>6</sup>

### 3 Uhlíkové nanomateriály

Nanomateriály jsou obecně definovány jako materiály, které mají alespoň jeden rozměr v rozmezí 1–100 nm. Uhlíkovými nanomateriály rozumíme nanomateriály, které jsou celé nebo z větší části tvořeny atomy uhlíku. Mezi základní uhlíkové nanomateriály patří grafen, uhlíkové tečky, uhlíkové nanotrubičky, fullereny, nanodiamanty apod. V derivátech těchto materiálů může být uhlík nebo vodík nahrazen dalšími prvky či jinými skupinami.<sup>7,8</sup>

Uhlík jako makrobiogenní prvek je základem všech organických sloučenin, tedy i nás. Materiály na bázi uhlíku hrály významnou roli v dějinách celého lidstva. Mezi nejvýznamnější formy uhlíku v přírodě patří diamant (alotrop uhlíku v  $sp^3$  hybridizaci), grafit (vrstvený alotrop uhlíku v  $sp^2$  hybridizaci) a uhlí (amorfní forma uhlíku). Ač diamant a grafit jsou alotropy stejného prvku, jejich vlastnosti jsou diametrálně odlišné. Zatímco diamant patří k nejtvrdějším nerostům, je průhledný a není vodivý, tak grafit se v Mohsově stupnici tvrdosti minerálů nachází na opačném konci než diamant, je černý, neprůhledný a z hlediska vedení elektrického proudu patří mezi vodiče. Nanomateriály na bázi uhlíku mají mnohem širší spektrum vlastností a možných forem. Právě díky svým unikátním vlastnostem, biokompatibilitě a nízkému dopadu na životní prostředí se uhlíkové nanomateriály dostávají více do popředí např. v medicínských aplikacích.<sup>9</sup>

#### 3.1 Uhlíkové tečky

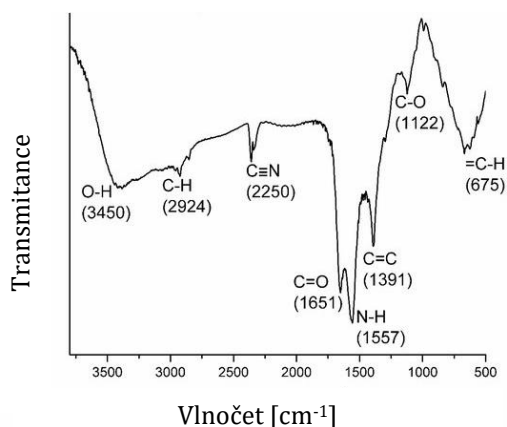
Uhlíkové tečky CD (z angl. *carbon dots*) patří z hlediska dimenzionality mezi 0D nanomateriály, což znamená, že všechny rozměry mají menší než 100 nm, zpravidla se jejich velikost pohybuje v rozmezí 2-3 nm.<sup>8</sup>

##### 3.1.1 Struktura, vlastnosti a příprava

Uhlíkové tečky se skládají z několika málo vrstev (plátů) grafenu nad sebou. Uhlík se zde nachází v  $sp^2$  hybridizaci, jeden elektron zůstává volný a díky tomu mají vrstvy aromatický charakter. Patrové interakce mezi vrstvami společně s hydrofobním charakterem vrstev hrají klíčovou roli v zachování přibližně kulovitého tvaru uhlíkových teček v polárním prostředí, na kterém se také podílí elektrostatické interakce. Jednotlivé vrstvy nejsou propojeny chemickou vazbou, proto může docházet k rotování a klouzání vrstev po sobě.

**Struktura**, a z ní vyplývající vlastnosti, je z velké části ovlivněna zvoleným způsobem přípravy (vybraný prekurzor, typ syntézy, teplota, atmosféra atd.). Četné analýzy prvkového složení prokázaly, že CD obsahují kromě uhlíku a vodíku také kyslík a dusík. Tyto prvky mohou být přímo zabudovány do struktury CD nebo ve formě funkční skupiny na povrchu CD. Mezi typické funkční skupiny pokrývající CD patří hydroxylová, karboxylová skupina nebo aminoskupina. Tyto skupiny jsou často přítomny v disociované

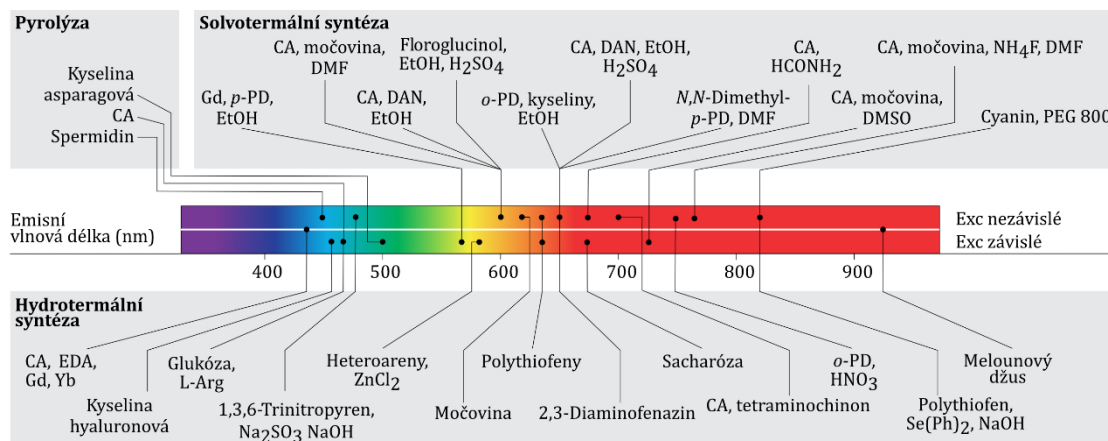
formě. Pro příklad složení CD slouží spektrum uhlíkových teček (Obrázek 5) získané pomocí infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací FTIR.<sup>10,11</sup>



Obrázek 5 Spektrum CD získané pomocí FTIR (převzato a upraveno z 52)

**Vlastnosti** uhlíkových teček jsou determinovány jejich strukturou. CD vykazují fotochemickou a tepelnou stabilitu. Funkční skupiny na povrchu ovlivňují jejich rozpustnost, povrchový náboj, optické i další vlastnosti. Pro medicínské aplikace je zajímavá především jejich luminiscence, biokompatibilita, možnost povrchové modifikace a schopnost pronikání např. do nádorových tkání, za kterou stojí malá velikost CD a odlišná architektura nádorových a zdravých tkání. Vlastnosti a chování uhlíkových teček se nedají jednoznačně shrnout, jelikož se odvíjí od rozměrů, tvaru, velikosti povrchu a modifikace povrchu. Znalost vzájemných závislostí je mocným nástrojem, který umožňuje připravit nanomateriál s požadovanými vlastnostmi pro konkrétní aplikaci.<sup>10,11</sup>

**Příprava CD** je také klíčovým faktorem ovlivňujícím výsledné vlastnosti CD. Roli hraje jak zvolený prekurzor, tak i způsob chemické syntézy. Uhlíkové tečky se dají připravit metodou *top-down* (zhora dolů) nebo *bottom-up* (zdola nahoru). Mezi časté prekurzory pro přípravu CD *bottom-up* metodami (např. pyrolýza, solvotermální a hydrotermální syntéza atp.), které využívají polymeraci molekulárních prekurzorů, patří látky přírodního původu (např. kyselina citronová, močovina, glukóza, ale i odpad z kávy). Na obrázku 6 jsou pro příklad uvedeny prekurzory a typy *bottom-up* syntézy, kterými byly připraveny CD emitující v téměř celé škále viditelné části spektra.<sup>11</sup>



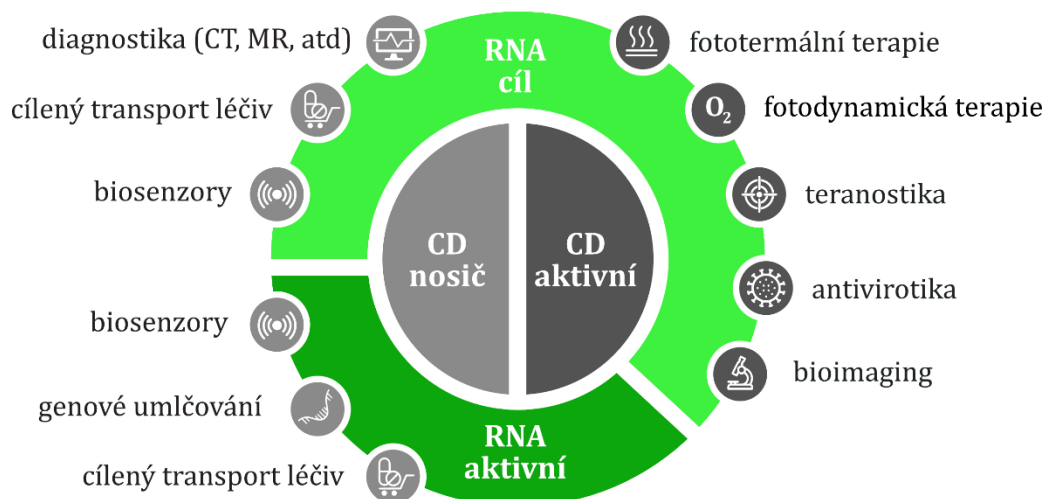
Obrázek 6 Přehled prekurzorů používaných metodami *bottom-up* syntézy CD (převzato a upraveno z 12)

### 3.1.2 Potenciál medicínských aplikací CD v kombinaci s RNA

U každého onemocnění je důležité včas jej zjistit, správně diagnostikovat a účinně léčit. V každé zmíněné oblasti mají uhlíkové nanomateriály velký potenciál pro zkvalitnění již využívaných metod a také umožnit metody nové. Studium interakcí CD s RNA má svůj význam hned z několika důvodů. CD i RNA mohou v závislosti na konkrétní aplikaci hrát různé role. CD může vystupovat jako nosič léčiva nebo přímo aktivně působit. RNA může být jak cílem pro CD v organismu (může se jednat o zdravou RNA, poškozenou RNA nebo cizí RNA (např. virovou RNA)), tak může být přenášenu látkou (Obrázek 7).

#### 3.1.2.1 Prevence a detekce onemocnění

Prevence musí být jednoduchá, co nejméně invazivní a levná, aby se dala realizovat ve velkém měřítku. Pro tento účel se začínají využívat především **senzory** na bázi grafenu<sup>13</sup>, nicméně v poslední době se do hledáčku výzkumných skupin dostaly i uhlíkové tečky. Již byly *in vivo* testovány CD, které mění své optické vlastnosti v závislosti na teplotě nebo na pH prostředí.<sup>14</sup> Některé typy senzorů využívají pouze uhlíkové tečky, častější jsou však např. enzymatické senzory, biosenzory antigen-protilátka nebo biosenzory nukleových kyselin, kdy na principu komplementarity bází je možné detekovat specifickou sekvenci NA tak, že po navázání NA dojde ke změně elektrochemického signálu<sup>15</sup> nebo změně optických vlastností (např. zhášení luminiscence<sup>16</sup>).



Obrázek 7 Aplikace CD v medicíně s ohledem na roli CD a RNA v závislosti na konkrétní aplikaci

#### 3.1.2.2 Diagnostika

Pro správné vyhodnocení rozsahu onemocnění, ale i studium onemocnění jako takového, jsou nezbytné **zobrazovací metody**. Uhlíkové tečky mají potenciál pro široké uplatnění právě v této oblasti díky malé velikosti (vysoké pronikavosti), nízké toxicitě a schopnosti fluorescence. Fluorescence uhlíkových teček může být kombinována s již používanými zobrazovacími technikami v medicíně, např. s magnetickou rezonancí nebo výpočetní tomografií CT (z angl. *computed tomography*), kde zvyšují rozlišovací schopnost a poskytují detailnější výsledky.<sup>17,18</sup>

### 3.1.2.3 Léčba

Z hlediska léčby mohou CD i RNA hrát různou funkci. První možností je **cílený transport léčiv**<sup>19,20</sup>, kde CD slouží jako nosič aktivní látky. Role RNA v cíleném transportu léčiv může být dvojitá. První možností je přizpůsobení CD tak, aby vyhledávaly specifický typ RNA. Může se jednat o zdravou RNA, RNA pozměněnou v důsledku onemocnění nebo RNA cizí pro organismus. CD se také mohou shromažďovat v místech bohatých na RNA. CD na místě určení po aktivaci uvolní léčivo (např. chemoterapii).<sup>20,21</sup> Další možností je využití RNA jako látky přenášené pomocí CD. Většinou se jedná o krátká vlákna RNA, toho využívá např. **genové umlčování**.<sup>22</sup> Cílený transport léčiv představuje mnohem efektivnější alternativu k tradičnímu podání léčiva, které je distribuováno v rámci celého organismu. Pro dosažení účinného množství léčiva v zasažené oblasti je potřeba podat několikanásobně větší množství léčiva, které často způsobuje negativní vedlejší účinky.<sup>23</sup>

Fototermální i fotodynamická terapie využívají optických vlastností CD a jejich vysoké pronikavosti do tkání (např. nádorové tkáně). V obou případech dochází ke kumulování CD v určitém místě v organismu (např. místo s vysokým obsahem RNA, což je typické pro nádorové tkáně), a jejich následnému ozáření zářením. **Fototermální terapie** využívá jevu, že CD se v důsledku ozáření zahřívají a tím zahřívají i okolní prostředí, což vyvolává apoptózu (buněčnou smrt) buněk v bezprostřední blízkosti CD, nikoliv v celé tkáni.<sup>24</sup> **Fotodynamická terapie** funguje na principu excitace CD zářením, které následně způsobí přeměnu kyslíku na jeho mnohem reaktivnější formy ROS (z angl. *reactive oxygen species*). Silné oxidační vlastnosti vznikajících ROS způsobují smrt buněk.<sup>25</sup> Výhodou obou terapií je jejich neinvazivnost a možnost kombinovat léčbu s jinými druhy terapie, např. chemoterapií.

**Teranostika**, neboli propojení diagnostiky přímo s terapií, je velmi žádoucí, neboť znamená pro pacienta méně zásahů do organismu a lékaři poskytuje lepší obraz o pacientově stavu a možnost přímo reagovat na zjištěnou situaci.<sup>17,26</sup> Výzkumy potvrdily, že CD se dají současně využít k více diagnostickým metodám, např. fluorescenčnímu a fotoakustickému zobrazování pro lokalizaci a distribuci *in vitro* a také *in vivo*. Následně mohou být CD ozářeny zářením o specifické vlnové délce a být použity k fototermální nebo fotodynamické terapii.

### 3.1.2.4 Rizika využití CD v medicínských aplikacích

CD se v organismu nevyhnutně dostanou do kontaktu s RNA, která se vyskytuje ve všech buňkách. Na vlastnosti CD a jejich interakce s RNA se dá nahlížet dvojitým způsobem. Na jedné straně je z hlediska mnoha aplikací jejich vzájemná interakce výhodná, na straně druhé může být nežádoucí až riziková. Pro medicínské aplikace jsou vhodné zejména CD připravené v přírodních prekurzorů (např. kurkuminu) kvůli vyšší biokompatibilitě, které jsou pokryté kladnými hydrofilními skupinami, které zjednodušují pohyb CD v krevním řečišti a často samy o sobě vykazují pozitivní terapeutický účinek na organismus.<sup>27,28</sup>

Vlastnosti CD a jejich interakce nejen s RNA je důležité celistvě prozkoumat, umět správně a prakticky využít, ale také znát rizika a eliminovat je. Zatím chybí rozsáhlejší studie zabývající se dlouhodobými nežádoucími účinky CD či jejich toxicitou *in vivo*. Mnohé důležité faktory můžeme prozkoumat pomocí počítačových simulací *in silico*.



## 4 Výpočetní chemie

Velká část vývoje vědy je založena na teoriích a experimentech. S rozvojem výpočetní techniky se na scéně objevily počítačové simulace, které se snažily napodobit výsledky získané experimenty. S raketovým rozvojem techniky a výpočetními možnostmi počítačů se role postupně mění. Simulace mají oproti experimentům hned několik výhod. Mnohé experimenty by byly finančně a časově náročné, jiné nebezpečné. Počítačové simulace také umožňují sledovat biologické děje na atomární úrovni, což je rozlišení, které je experimentálně v této době velmi těžko dosažitelné nebo úplně nedosažitelné.

Simulace se používají nejen u systémů, které nelze nyní experimentálně pozorovat, ale mohou nám poskytnout i doplňující informace o známých a již popsaných dějích. Pro simulaci složitějších biologických systémů můžeme pro popis atomů použít klasickou tzv. molekulovou mechaniku nebo kvantovou mechaniku. Zatímco molekulová mechanika pracuje s atomy jako s hmotnými body s konstantním parciálním nábojem, kvantová mechanika zahrnuje do výpočtů i elektrony a elektronové orbitály. Kvantová mechanika nám sice umožňuje získat informace o pohybu a vzájemných interakcích atomů, ale výpočetně je příliš náročná, proto se používá především pro malé systémy. Molekulárně dynamické simulace nám umožňují vhled do dění v atomárním rozlišení v systémech o velikosti stovek až milionů atomů, což nám pomáhá lépe pochopit jejich chování bez složitých a náročných experimentů s drahým vybavením. Simulace však zatím nejsou bezchybné a jejich výsledky musíme porovnávat s experimentálně měřenými daty.<sup>29</sup>

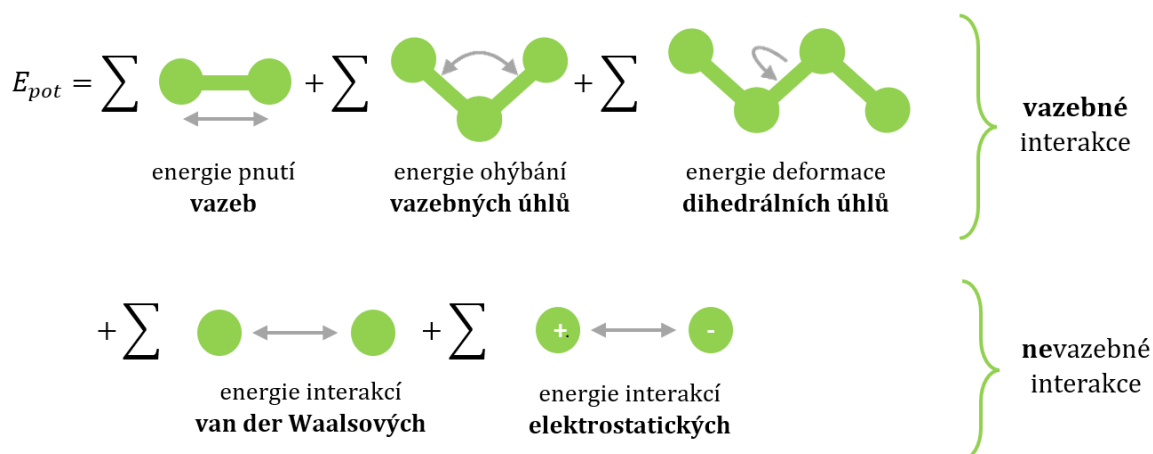
### 4.1 Molekulová mechanika

Molekulová mechanika MM popisuje potenciální energii atomů v systému jako funkci polohy těchto atomů a je vyjádřena jako součet energií vazebných a nevazebných interakcí. Parametry definující členy pro výpočet potenciální energie se dohromady nazývají silové pole. K charakterizaci systému využívá MM klasickou mechaniku.



### 4.1.1 Členy potenciální energie v MM

Potenciální energii v MM můžeme vypočítat jako sumu příspěvků energie jednotlivých složek. Příspěvky energie jsou vazebné (kovalentní) a nevazebné (nekovalentní). Mezi vazebné příspěvky patří energie pnutí vazeb, energie ohýbání vazebných a dihedrálních úhlů. Do nevazebných příspěvků řadíme energii van der Waalsových (vdW) a elektrostatických interakcí (Obrázek 8).



Obrázek 8 Vazebné a nevazebné interakce

Výpočet potenciální energie harmonického oscilátoru, resp. pružiny, je použitý pro výpočet **potenciální energie chemické vazby**. Tuhost pružiny  $k$  je nahrazena silovou konstantou chemické vazby  $k_{vaz}$ , délku pružiny v rovnovážné poloze  $x_0$  a okamžitě poloze  $x$  nahradíme délkou chemické vazby ideální  $r_0$  a okamžitě  $r$ . Po takové úpravě dostáváme vztah pro výpočet energie vazeb  $E_{vaz}$ :

$$E_{pružina} = \frac{1}{2} \cdot k \cdot (-x_0)^2 \rightarrow E_{vaz} = \frac{1}{2} \cdot k_{vaz} \cdot (r - r_0)^2 \quad \text{Rov. 4.1}$$

**Potenciální energii vazebných úhlů**  $E_{úhel}$  počítáme obdobně jako energii vazeb, tedy pomocí harmonického oscilátoru, resp. pružiny, upravené do rovnice 4.2, kde  $k_{úhel}$  je silová konstanta vazebného úhlu,  $\theta$  je aktuální velikost vazebného úhlu a  $\theta_0$  je rovnovážná velikost vazebného úhlu.

$$E_{pružina} = \frac{1}{2} \cdot k \cdot (-x_0)^2 \rightarrow E_{úhel} = \frac{1}{2} \cdot k_{úhel} \cdot (\theta - \theta_0)^2 \quad \text{Rov. 4.2}$$

**Potenciální energii dihedralních úhlů**  $E_{dih}$  vypočítáme podle rovnice 4.3, kde  $V_n$  je výška potenciálové bariéry,  $\omega$  představuje velikost dihedralního úhlu,  $n$  periodu a  $\gamma$  fázový posun.

$$E_{dih} = \frac{1}{2} \cdot V_n \cdot [1 + \cos(n\omega - \gamma)]^2 \quad \text{Rov. 4.3}$$

**Potenciální energii van der Waalových interakcí** popisujeme Lennard-Jonesovým potenciálem, který je uveden v rovnici 4.4, kde  $\varepsilon_{ij}$  je hloubka potenciálového minima,  $\sigma_{ij}$  popisující vzdálenost jader a  $r_{ij}$  je vzdálenost dvou atomů.

$$E_{vdw} = 4\varepsilon_{ij} \left[ \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad \text{Rov. 4.4}$$

**Potenciální energii elektrostatických interakcí**  $E_{el}$  se počítá pomocí Coulombova zákona, který je uveden v rovnici 4.5, kde  $\varepsilon_0$  je permitivita vakua,  $\varepsilon_r$  je relativní permitivita prostředí,  $q_i$  a  $q_j$  jsou parciální náboje na atomech  $i$  a  $j$  a  $r_{ij}$  je jejich vzájemná vzdálenost.

$$E_{el} = \frac{1}{4\pi\varepsilon_0\varepsilon_r} \cdot \frac{q_i q_j}{r_{ij}} \quad \text{Rov. 4.5}$$

## 4.2 Molekulová dynamika

Molekulová dynamika (MD) spolupracuje s MM tak, že z gradientu potenciální energie vypočítá sílu, která působí na jednotlivé atomy. Na základě druhého Newtonova zákona můžeme tuto sílu převést na zrychlení, které ovlivní rychlost daného atomu. V počítačových simulacích ale není možné vypočítat zcela spojitou trajektorii. V simulacích nastavujeme délku kroku, kdy se v každém kroku vyhodnotí síly působící na atom a počítá se s tím, že mezi kroky zůstávají síly působící na atom konstantní. Délka kroku je tudíž limitována rychlostí nejrychlejší vibrace v systému, obvykle vibrací vodíku. Různé simulační programy používají různé algoritmy. Mezi běžně používané simulační balíčky patří AMBER<sup>30</sup> a GROMACS<sup>31</sup>, které zahrnují více programů umožňující uživatelům připravovat simulace systémů se stovkami až miliony částic na základě Newtonových pohybových rovnic. Skvěle se hodí pro simulace biologických molekul, mezi které patří proteiny, nukleové kyseliny, lipidy a právě i nanomateriálů. Simulační balíčky také obsahují soubory silových polí pro MM.<sup>32</sup>

# Praktická část

## 5 Popis simulací

Cílem této práce bylo podrobněji prozkoumat vzájemné interakce dvou motivů sekundární struktury ribonukleové kyseliny (duplexu a smyčky) s uhlíkovými tečkami s navázanými funkčními skupinami pomocí molekulových simulací. Na základě výsledků bylo možné posoudit, jak vliv motivu a typu bází RNA, tak vliv funkční skupiny na povrchu uhlíkové tečky na vzájemnou interakci.

### 5.1 Simulované struktury

V následující části jsou popsány jednotlivé studované struktury RNA a CD. Pro každou strukturu byla provedena simulace nejdříve samostatně, aby bylo možné posoudit změnu chování v důsledku vzájemné interakce. Struktury RNA a CD byly připraveny pomocí různých simulačních balíčků (RNA v AMBER, CD v GROMACS), proto byly připravené struktury CD nejdříve minimalizovány samostatně a následně převedeny do formátu, který využívá AMBER.

#### 5.1.1 RNA

V simulacích jsou použity čtyři struktury RNA – 1 smyčka a 3 duplexy. **Smyčka** GAGA patří do rodiny tetraloopů GNRA, kde N představuje libovolnou purinovou bázi (adenin, guanin) a R představuje libovolnou bázi. Smyčky z rodiny GNRA patří mezi nejčastěji se vyskytující rodiny smyček. **Duplexy** se liší svojí délkou i typem vyskytujících se bází. Na základě této různorodosti bude možné studovat, zda má vliv na chování uhlíkové tečky vyskytující se báze v duplexu či délka duplexu. V tabulce 1 jsou uvedeny podrobné informace o studovaných strukturách.

Tabulka 1 Přehled simulovaných struktur RNA

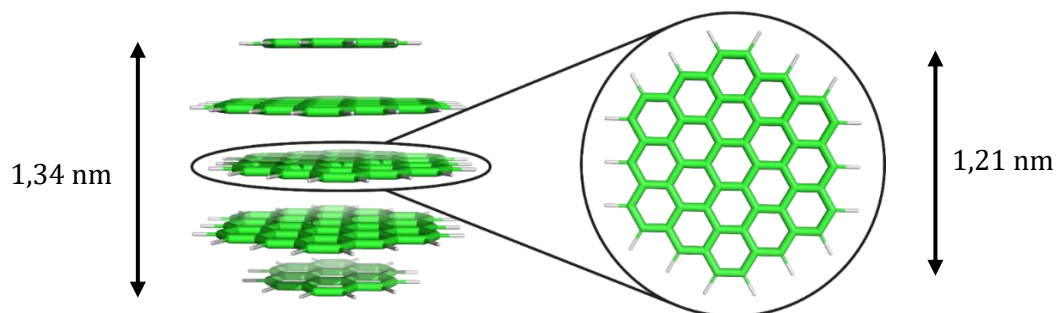
Označení	PDB ID	Vyskytující se báze	Počet nukleotidů (vlákno)	Počet nukleotidů (celkem)
smyčka GAGA	1Q9A <sup>I</sup>	A, C, G, U	8	8
AU duplex	1RNA	A, U	14	28
CG duplex	žádné <sup>II</sup>	C, G	10	20
MIX duplex	1QC0	A, C, G, U	19	38

<sup>I</sup> Z uvedeného PDB ID byla použita rezidua 2658-2663 a byl přidán C-G terminální pár bází (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6169534/>).

<sup>II</sup> CG duplex byl vystaven pomocí programu NAB (Nucleic Acid Builder).

### 5.1.2 Uhlíkové tečky

Pro účely simulací byly připraveny tři různé CD – dvě jsou z 10 % pokryté funkčními skupinami, jedna není pokrytá žádnou funkční skupinou. Všechny uhlíkové tečky byly připraveny pomocí Carbon Dot Builderu<sup>33</sup> (externího rozšíření pro vizualizační program VMD<sup>34</sup>). Skládají se z pěti vrstev, tři prostřední vrstvy mají na své hraně tři aromatická jádra, dvě krajní vrstvy mají na své hraně pouze dvě aromatická jádra. Vzdálenost dvou krajních vrstev je 1,34 nm a průměr prostřední vrstvy je asi 1,21 nm (Obrázek 9). Experimentálně používané CD mají nejčastěji průměr pohybující se v rozmezí 2-3 nm.



Obrázek 9 Uhlíková tečka se zobrazenou prostřední vrstvou

V praxi se nesetkáme s uhlíkovými tečkami, které by se skládaly pouze z uhlíku a vodíku, hojně je zastoupen také dusík a kyslík. Mezi nejčastěji se vyskytují skupiny patří hydroxylová, karboxylová skupina a aminoskupina. Při neutrálním pH, které má i např. krev, jsou tyto skupiny převážně v disociované formě. K tomuto bylo přihlédnuto při volbě funkčních skupin. Pro možnost hodnocení vlivu funkční skupiny a náboje na interakci CD s RNA byly pro modifikaci CD vybrány dvě různé funkční skupiny s různými náboji. Z kladných funkčních skupin byla zvolena CD pokrytá kladnou protonovanou aminoskupinou (dále označena jako CD\_NH3), která může vstupovat do vodíkových vazeb jako donor protonu. Díky kladnému náboji může docházet k přitažlivé elektrostatické interakci se záporně nabitou páteří RNA. Při volbě záporné funkční skupiny padl výběr na deprotonovanou karboxylovou skupinu (dále jako CD\_COO), která se může účastnit vodíkových vazeb jako akceptor protonu, resp. donor volného elektronového páru. Pro srovnání byla připravena i CD bez pokrytí funkčními skupinami (dále jako CD\_pure), jenž slouží jako referenční, jelikož v praxi se nesetkáme s CD tvořenými pouze uhlíkem a vodíkem. Kvůli absenci funkčních skupin nemůže tvořit vodíkové vazby. Přehled typů CD a jejich základních parametrů je uveden v tabulce 2.

Tabulka 2 Přehled simulovaných struktur CD a možných významných interakcí

	CD_COO	CD_NH3	CD_pure
typ funkční skupiny	karboxylová	aminoskupina	žádná
počet funkčních skupin	11	9	0
náboj	-11	+9	0
patrové interakce	ano	ano	ano
vodíkové vazby	ano (akceptor protonu)	ano (donor protonu)	ne
elektrostatické interakce	ano	ano	ne

### 5.1.3 Přehled simulovaných modelů

#### 5.1.3.1 Zavedení pojmů

Pojmem **system** v dalším textu bude označována kombinace jedné ze struktur RNA a jedné ze struktur CD. Jelikož bylo pracováno se čtyřmi strukturami RNA a třemi typy CD, celkem bylo získáno 12 různých systémů. Pro každý systém byly připraveny čtyři simulace (modely), přičemž se navzájem lišily ve výchozí vzájemné poloze RNA a CD. Pojmem **model** tedy rozumíme konkrétní simulaci RNA a CD v konkrétní výchozí vzájemné poloze. Jednotlivé modely jsou označovány názvem, který sestává z typu RNA, CD a čísla. Během přípravy modelů docházelo ke vkládání CD pomocí nástroje *insert molecules*, který patří do simulačního balíčku GROMACS, do boxu opakovaně na stejné místo. Jelikož cílem bylo nachystat pro každý systém čtyři různé modely, tedy lišící se vzájemnou výchozí polohou RNA a CD, byla během vkládání CD do simulačního boxu použita funkce *seed*. Funkce *seed* po zadání různých přirozených čísel umístila CD na různá místa v simulační boxu. Výchozí poloha po zadání čísel 1 i 2 si byla podobná, proto nebyla použita čísla 1-4, ale 1, 3, 4 a 5.

Například označení modelu AU\_CD\_NH3\_1 tedy znamená, že model se skládá z duplexu obsahující pouze A a U, uhlíkové tečky pokryté aminoskupinami a během vkládání CD do boxu bylo použito přirozeného čísla 1 pro definování funkce *seed*. Stejný princip je použitý u všech označení modelů skládajících se z RNA a CD.

Pokud se jednalo o model pouze CD nebo pouze RNA, pak má označení *solvate*. AU\_solvate je tedy označení simulace modelu sestávajícího pouze z AU duplexu, vody a iontů. Tyto samostatné simulace sloužily pro možnost porovnání změny chování struktur.

#### 5.1.3.2 Příprava modelů

Každý model sestává z jedné ze struktur RNA a jedné CD umístěné do PBC boxu (z angl. *periodic boundary condition* = periodické okrajové podmínky). Rozměry boxu se liší kvůli různé velikosti struktur RNA. Box musel být dostatečně velký na to, aby byla vyloučena interakce s periodicky se opakující strukturou RNA, a zároveň ne zbytečně velký, aby výpočet neprobíhal příliš dlouho. Následně byl box plně solvatován explicitním modelem vody OPC (z angl. *optimal point charge*)<sup>35</sup>. Počet přidávaných draselných a chloridových iontů byl stanoven tak, aby kompenzoval náboj RNA a CD a zároveň výsledná koncentrace iontů v boxu odpovídala koncentraci fyziologického roztoku (0,154 mol·dm<sup>-3</sup>). Přehled rozměrů jednotlivých boxů a počtu přidávaných iontů pro jednotlivé modely je přiložen v příloze 1. V simulacích byly kombinovány 4 typy struktur RNA a 3 typy CD, celkem bylo připraveno 12 systémů. Pro každý systém RNA a CD byly celkem provedeny 4 simulace, v každé simulaci se lišila výchozí vzájemná poloha RNA a CD. Celkem bylo spuštěno 48 simulací modelů RNA a CD. Aby bylo možné stanovit odchylku parametrů RNA nebo CD od jejich standardního chování, byla pro každou strukturu RNA i CD spuštěna samostatná simulace. Přehled všech provedených simulací je uveden v příloze 1.

### 5.1.3.3 Minimalizace

Před spuštěním simulace byla každá struktura, včetně iontů a molekul vody, minimalizována a ekvilibrována za použití standardního ekvilibračního protokolu.<sup>36</sup> Nejprve proběhla minimalizace vodíkových atomů molekuly RNA, poté následovala minimalizace iontů a molekul vody, zatímco pozice molekuly RNA zůstala zafixována. Následně byl pohyb molekule RNA omezen a molekulám vody s ionty byl umožněn pohyb během krátké simulace o délce 500 ps za NpT podmínek (konstantního tlaku, teploty a počtu částic). Pro udržení konstantní hodnoty tlaku (1 bar = atmosférický tlak) a teploty (298,16 K = 25,01°C) byl použit Berendsenův barostat a termostat. V rámci této krátké simulace došlo k ustálení hustoty vody v systému. Po ustálení následovala ekvibrace molekuly RNA několika ekvilibračními cykly, přičemž pohyb atomů cukr-fosfátové páteře byl omezen použitím silové konstanty. Po úplném uvolnění systému byl systém zahříván. Nejprve byl systém zahříván za NVT podmínek po dobu 100 ps, tedy za konstantního objemu, teploty a počtu částic. V rámci druhého kroku došlo k vyrovnání hustoty za NpT podmínek po dobu dalších 100 ps.

### 5.1.3.4 Simulace

Simulace probíhaly za konstantního tlaku, teploty a počtu částic. Pro udržení konstantní hodnoty tlaku (1 bar = atmosférický tlak) a teploty (298,16 K = 25,01°C) byl stejně jako v rámci ekvibrací použit Berendsenův barostat a termostat. V simulaci proběhlo 500 000 000 kroků s délkou simulačního kroku 0,002 ps, celková délka jedné simulace odpovídá 1  $\mu$ s. V simulacích byl použit HMassRepartition<sup>37</sup>, což i přes použití 4 fs integračního kroku nemělo vliv na průběh simulace. Další parametry jsou uvedeny v příloze 2. Některé simulace byly prodlouženy, aby došlo k ověření stability vzájemné polohy. Analýzy vychází z posledních 200 ns, kdy CD již byla navázána, a nedocházelo ke konformačním změnám v modelu.

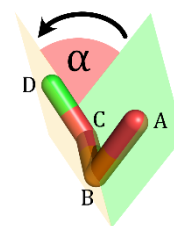
Výpočty byly provedeny s využitím simulačního balíčku AMBER16. Pro RNA bylo použito silové pole ff99bsc0 $\chi_{OL3}$ <sup>38,39</sup> a přidaným HBfix potenciálem pro posílení vodíkových vazeb u RNA<sup>40</sup> s využitím zpřesněného popisu alfa/gama konformerů<sup>41</sup> a parametrů fosfátů<sup>42</sup>. Uhlíkům CD byly přiřazeny Cheng a Steele interakční parametry.<sup>43</sup> RNA a CD byly solvatovány OPC modelem vody a doplněny ionty dle Joung a Cheatham<sup>44</sup>. Během přípravy modelů byly použity konformační energie vyvinuté pro organické a biologické molekuly s využitím přístupu omezeného elektrostatického potenciálu (RESP) k odvození dílčích nábojů.<sup>45</sup>

## 5.2 Analýza MD trajektorií

Výsledné trajektorie byly hodnoceny vizuálně i pomocí analytických nástrojů. Vizuálně bylo hodnoceno, zda došlo k interakci a k jakému typu interakce došlo. U RNA byla dále sledována změna ve tvaru, pro CD bylo sledováno zachovávání kulovitěho tvaru a vzájemná rotace sousedních vrstev. Tyto i další parametry byly charakterizovány především pomocí analyzačního programu CPPTRAJ<sup>46</sup>, který je součástí balíčků programů AMBER<sup>47</sup>, a dány do kontextu vizuálního hodnocení.

### 5.2.1 RNA

Stabilitu struktury RNA lze popsat pomocí konformace cukr-fosfátové páteře, nejčastěji pomocí **dihedrálních úhlů**. Dihedrální úhel popisuje konformaci jednoduché vazby mezi atomy B a C jakožto úhel svíraný rovinami, v nichž leží atomy ABC a BCD (Obrázek 10). Dihedrální úhly označujeme řeckými písmeny. Pro všechny simulace byla provedena analýza hodnot všech dihedrálních úhlů. Jelikož nedocházelo vlivem interakcí RNA a CD k zásadním změnám ve velikostech dihedrálních úhlů, nebudeme se jimi podrobněji zabývat. **Ribóza**, která se v RNA vyskytuje pouze v cyklické formě, jako pětičlenný kruh sestávající ze 4 atomů uhlíku v  $sp^3$  hybridizaci a 1 atomu kyslíku, nezaujímá planární podobu, ale nabývá různé prostorové konformace odchylovající se od roviny cyklu (angl. *sugar puckering*). Tyto odchylky byly popsány na základě vnitřních torzních úhlů  $\tau$  metodou Altona & Sundarlingam.<sup>48</sup> **Helikální parametry** byly popsány již výše.



Obrázek 10  
Ukázka měření  
dihedrálního úhlu

Pro všechny simulace byla provedena analýza všech dihedrálních úhlů, konformací ribózy, helicálních parametrů, počtu vodíkových vazeb mezi bázemi a velikosti žlábků pomocí nástroje *nastruct* patřícího do analyzačního balíčku CPPTRAJ AMBER Tools.

### 5.2.2 Uhlíkové tečky

Uhlíkové tečky mají vrstvenou kulovitou strukturu. Vrstvy CD se po sobě mohou pohybovat. Rotace může být snížena přítomností funkčních skupin v důsledku sterického efektu nebo repulze náboje, pokud nese funkční skupina náboj. Náboj na funkční skupině může ovlivnit tvar CD, kdy dochází ke klouzání vrstev po sobě a ztrátě kulovitěho tvaru. Tvar CD byl hodnocen vizuálně. Při zachování kulovitěho tvaru byla pomocí dihedrálního úhlu mezi vrstvami měřena vzájemná rotace vrstev.

### 5.2.3 Vzájemná interakce RNA a CD

Analyzačními nástroji byl také stanoven **počet vodíkových vazeb** a **počet kontaktů** mezi RNA a CD. Pro určení nejvyššího výskytu CD vůči RNA byla využita **radiální distribuční funkce** RDF. Tato funkce popisuje změnu hustoty systému částic (v našem případě atomů) na vzdálenosti od referenční částice. RDF byla určena výpočtem vzdáleností mezi dvojicemi atomů a následně rozdělením do histogramu. Ke stanovení RDF bylo použito posledních 200 ns ze simulace, jelikož v tomto stádiu již všechny modely dospěly do stabilní polohy (pokud došlo k interakci CD s RNA). Z programu VIAMD<sup>49,50</sup> byly získány **hustotní mapy**, které stejně jako většina obrázků byly zpracovány v programu PyMOL<sup>51</sup>.

## 6 Výsledky

V této části je uveden přehled výsledků simulací, tedy vzájemných interakcí RNA a CD. Pro přehlednost jsou interakce rozděleny do čtyř kategorií podle toho, ve které části RNA došlo k interakci: terminální báze (1), malý žlábek (2), volné báze smyčky (3) a velký žlábek (4). Kategorie jsou seřazeny podle celkové četnosti interakce v dané části RNA. Číselného označení je použito dále v textu i na obrázku 11, kde je uvedený celkový přehled výsledků simulací, v nichž je zohledněn i výskyt interakcí s více částmi RNA současně.

### 6.1 Přehled výsledků simulací

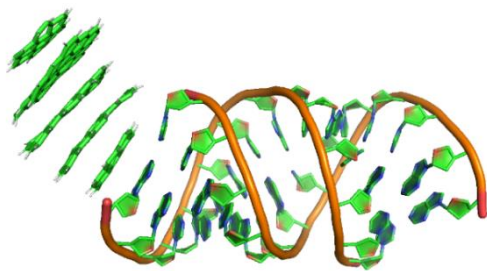
K žádné interakci nedošlo celkem ve čtyřech simulacích z celkových 48 simulací a ani v jednom případě se nejednalo o stejný systém RNA a CD. S těmito simulacemi není tudíž dále pracováno. V následující části bude popsán mechanismus vzniku dané interakce mezi RNA a CD, poté bude popsáno chování RNA a CD v rámci dané interakce. Nebude-li uvedeno jinak, je hodnoceno chování v rámci posledních 200 ns, kdy bylo chování modelu stabilní. Ač pro každý systém byly spuštěny čtyři simulace, nikdy nedošlo pokaždé ke stejné interakci.

	CD_PURE	CD_COO	CD_NH3
smyčka			
CG duplex			
AU duplex			
MIX duplex			
Legenda	<b>Místo interakce</b> 1 terminální báze 2 malý žlábek 3 volné báze smyčky 4 velký žlábek		<b>Četnost výskytu</b> 1x 2x 3x

Obrázek 11 Přehled stabilních struktur RNA a CD, kde barevný kruh označuje místo, kde CD interagovala s RNA, číslo/a v kruhu znamená typ dominantní interakce a intenzita výplně kruhu vyjadřuje četnost výskytu v dané poloze CD v rámci simulací



### 6.1.1 Terminální báze (1)

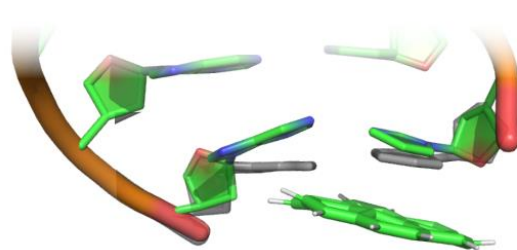


Obrázek 12 Stabilní AU\_CD\_pure\_1

Nejčastější interakcí RNA a CD byla patrová interakce na terminální báze (Obrázek 12). Je umožněna aromatickou strukturou bází RNA i vrstev CD. K interakci docházelo zpravidla velmi rychle, rychlost závisela na výchozí vzájemné poloze RNA a CD. K interakci docházelo později mezi RNA a CD<sub>COO</sub>.

**Duplexy** poskytují na obou svých koncích pár terminálních bází, kde může dojít k patrové interakci. Ve výběru konce hrála roli často výchozí vzájemná poloha struktur. Typ CD neměl vliv na mechanismus nasednutí CD na terminální báze RNA. Během patrové interakce CD na terminální báze nedocházelo k zásadnímu ovlivnění dihedrálních úhlů cukr-fosfátové páteře.

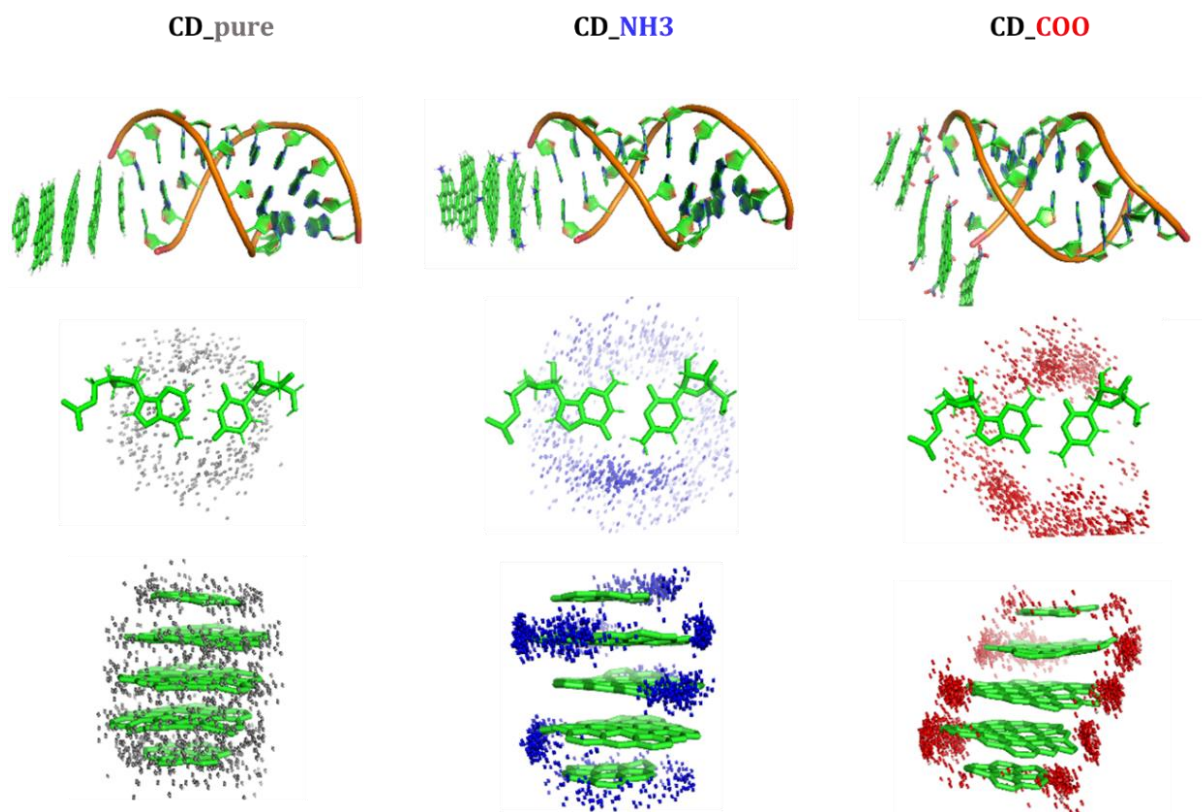
Patrová interakce krajní vrstvy CD měla za následek změnu helikálních parametrů pouze terminálního páru bází. Interakce duplexu s CD<sub>pure</sub> byla nejčastěji doprovázena změnou helikálního parametru *buckle*, který popisuje vzájemnou rotaci bází vůči sobě v ose x. Na obrázku 13 je šedou barvou znázorněna vzájemná poloha terminálních bází duplexu před interakcí s CD, v barevném provedení je zobrazena změna polohy terminálních bází v důsledku jejich interakce s krajní vrstvou CD<sub>pure</sub>. Odchýlení terminálních bází od původní roviny vedlo k tomu, že poloha CD se změnila, protože krajní vrstva CD nemohla interagovat s oběma terminálními bázemi současně, ale pouze s jednou z nich.



Obrázek 13 Porovnání výchozí vzájemné polohy terminálních bází a změny parametru buckle vyvolán nasednutím CD<sub>pure</sub>

Na průběh nejčastěji se vyskytující interakce měl zásadní vliv typ tečky. **CD<sub>pure</sub>** a **CD<sub>NH3</sub>** natočily svoji krajní vrstvu k terminálním bázím duplexu. Zatímco vrstvy tečky bez náboje volně rotovaly vzájemně mezi sebou i vůči terminálním bázím, **CD<sub>NH3</sub>** vykazovala nízkou rotaci vrstev mezi sebou i vůči RNA, jak je patrné z hustotních map na obrázku 14. Vrstvy CD<sub>NH3</sub> jsou natočené tak, aby souhlasně nabitě funkční skupiny měly mezi sebou co největší vzdálenost. Vrstva, která byla druhá nejbližší k terminálním bázím, se snažila o maximalizaci počtu vodíkových vazeb.

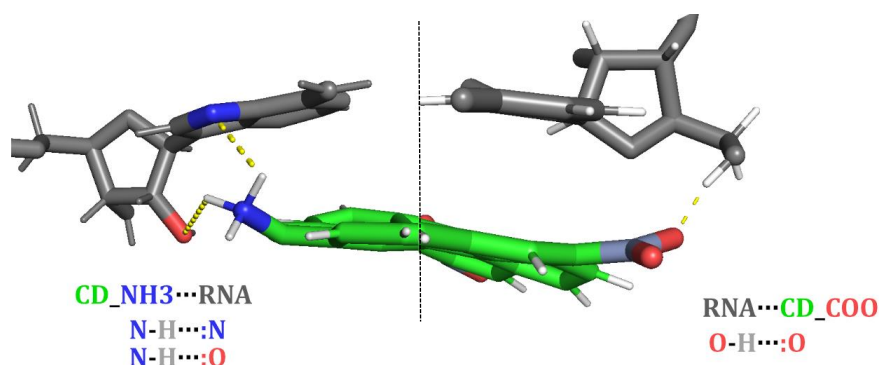
Naproti tomu vrstvy **CD<sub>COO</sub>** po sobě sklouzly, a i přes odpudivou elektrostatickou interakci funkčních skupin došlo k natočení vrstev CD tak, že na dvou protilehlých stranách se funkční skupiny vůbec nevyskytovaly. Tyto strany s absencí funkčních skupin můžeme označit za hydrofobní. S cílem minimalizace hydrofobní plochy vystavené polárním prostředí se CD<sub>COO</sub> přiblížila k terminálním bázím jednou z těchto hydrofobních stran. Strany pokryté funkčními skupinami se natočily tak, aby maximalizovaly vzdálenost od záporně nabitě páteře a zároveň mohly tvořit vodíkové vazby s RNA.



Obrázek 14 Hustota výskytů vodíků, resp. funkčních skupin, vůči terminálním bázím duplexu nebo CD

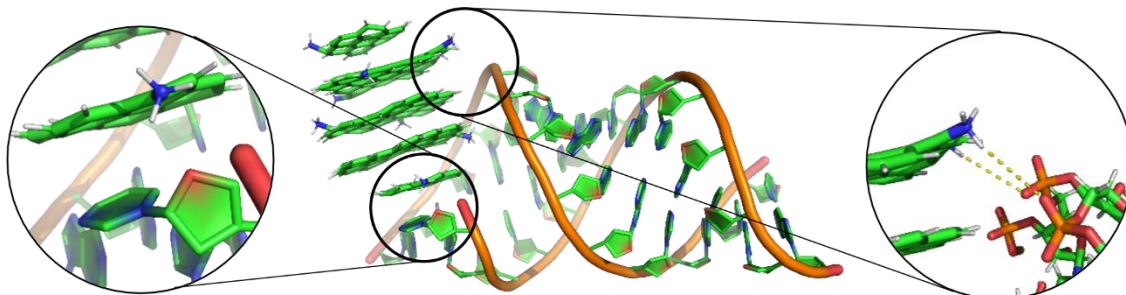
CD s funkčními skupinami s RNA kromě patrových interakcí tvořily i **vodíkové vazby**. Protonované aminoskupiny CD\_NH3 vystupovaly jako donor vodíku a akceptor volného elektronového páru od RNA, který nejčastěji poskytovaly kyslíky cukr-fosfátové páteře, méně často dusík terminální báze (Obrázek 15 vlevo).

Pro CD\_COO byla situace opačná – deprotonovaná karboxylová skupina byla donorem volného elektronového páru, jehož akceptorem byl nejčastěji vodík hydroxylové skupiny cukr-fosfátové páteře, méně často vodík vázaný na dusík terminální báze (Obrázek 15 vpravo).



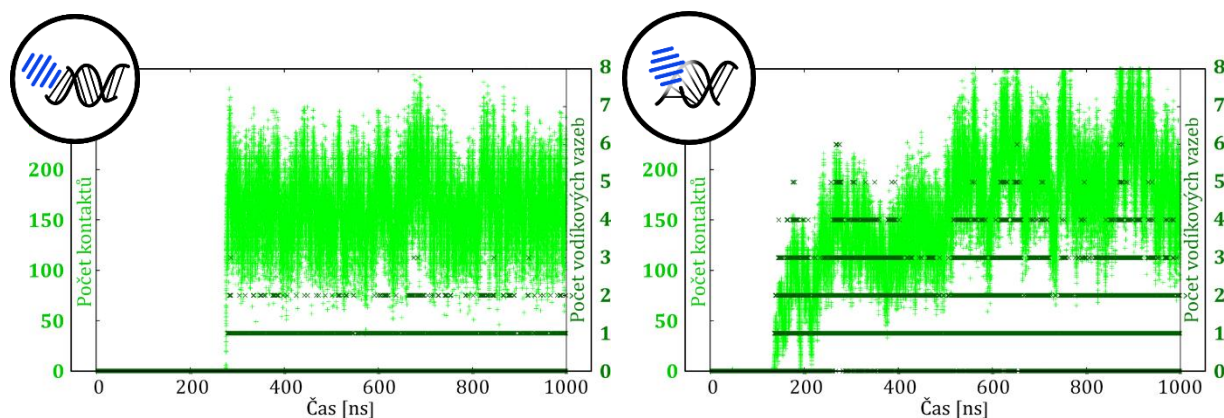
Obrázek 15 Porovnání vodíkových vazeb tvořených mezi terminálními bázemi duplexu a krajní vrstvy CD. Levá část obrázku zachycuje část CD\_NH3, pravá část obrázku zachycuje CD\_COO

Ve třech simulacích došlo nejprve k přiblížení CD\_NH3 k páteři RNA a vzniku vodíkových vazeb. Poté se CD posunula až ke konci duplexu, kde způsobila rozpojení terminálního páru bází s tím, že s jednou bází tvořila patrovou interakci a zároveň její funkční skupiny tvořily vodíkové vazby s páteří (Obrázek 16).



Obrázek 16 Stabilní AU\_CD\_NH3\_5 (vlevo patrová interakce, tvorba vodíkových vazeb s páteří vpravo)

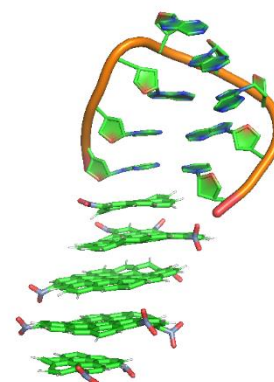
Kombinace patrové interakce s vodíkovými vazbami s páteří se odrazily ve vyšším počtu vodíkových vazeb i počtu kontaktů, jak je patrné z grafů na obrázku 17, kde graf vlevo uvádí počet kontaktů a vodíkových vazeb modelu AU\_CD\_NH3\_3 a graf vpravo uvádí počet kontaktů a vodíkových vazeb modelu AU\_CD\_NH3\_5.



Obrázek 17 Grafy počtu kontaktů a vodíkových vazeb pro modely AU\_CD\_NH3\_3 (vlevo) a AU\_CD\_NH3\_5 (vpravo)

U CD\_COO došlo ve čtyřech případech k částečnému odsunutí krajní vrstvy, což poskytlo větší plochu pro patrovou interakci. V dalších čtyřech simulacích bylo pozorováno úplné odsunutí krajní vrstvy. Tato odsunutá krajní vrstva ve dvou případech tvořila patrovou interakci s ribózyami přilehlých nukleotidů a ve zbytku případů se díky hydrofobní interakci odsunutá vrstva sklouzla na boční stranu CD\_COO.

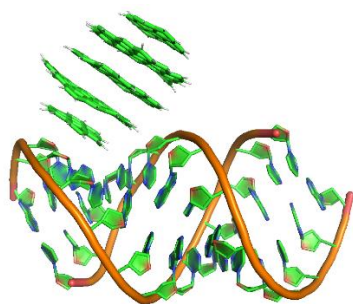
**Smyčka** na rozdíl od duplexu disponuje nespárovanými bázemi, které se z hlediska vzájemných interakcí ukázaly jako preferovanější. PI na terminální báze smyčky byla pozorována pouze v jedné simulaci s CD\_COO (Obrázek 18). V ostatních simulacích smyčky a CD byly preferovány jiné polohy.



Obrázek 18 GAGA\_CD\_COO\_5



## 6.1.2 Malý žlábek (2)

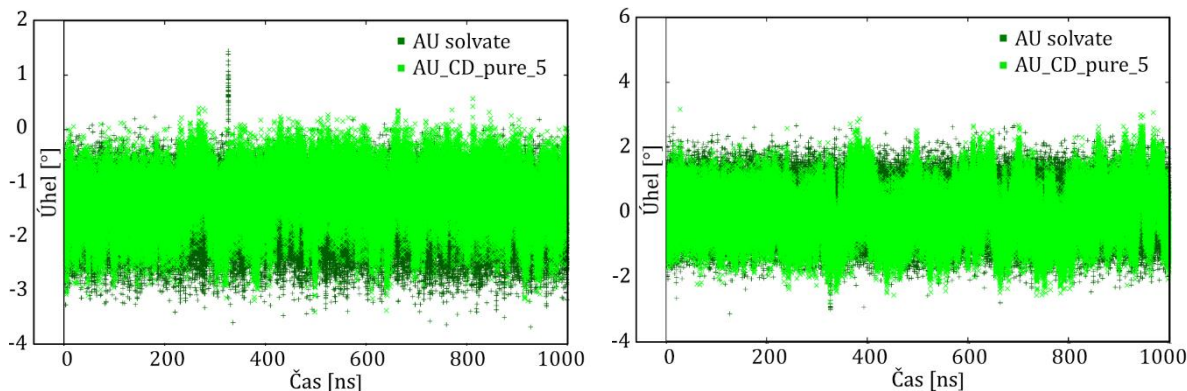


Obrázek 19 Stabilní AU\_CD\_pure\_5

Zatímco vrstvy CD jsou téměř planární, ribóza v důsledku přítomnosti atomů uhlíku v  $sp^3$  hybridizaci není zcela planární. I přesto velmi často docházelo k nasednutí CD do malého žlábků a interakci CD s ribózou či ribózami RNA (Obrázek 19).

**Duplexy** poskytují pro tento typ interakce více poloh. Průměrný počet kontaktů v rámci nasednutí CD na ribózu/y byl v porovnání s PI na terminální bázi vyšší. Mechanismus nasednutí se lišil v závislosti na typu CD.

Polohy v krajní oblasti žlábků byly méně často zastoupené oproti polohám v malém žlábků vzdálenějších od terminálních bází. Interakce významně neovlivnily konformaci ribózy (*sugar pucker*). V důsledku interakce se změnily některé helikální parametry bází v blízkosti CD. Pro příklad slouží porovnání helikálního parametru *slide* (Obrázek 20 vlevo) a *shift* (Obrázek 20 vpravo) pro model AU\_CD\_pure\_5 (světle zelená) a pouze solvatovaný AU duplex (tmavě zelená). Změny nebyly zvláště výrazné.



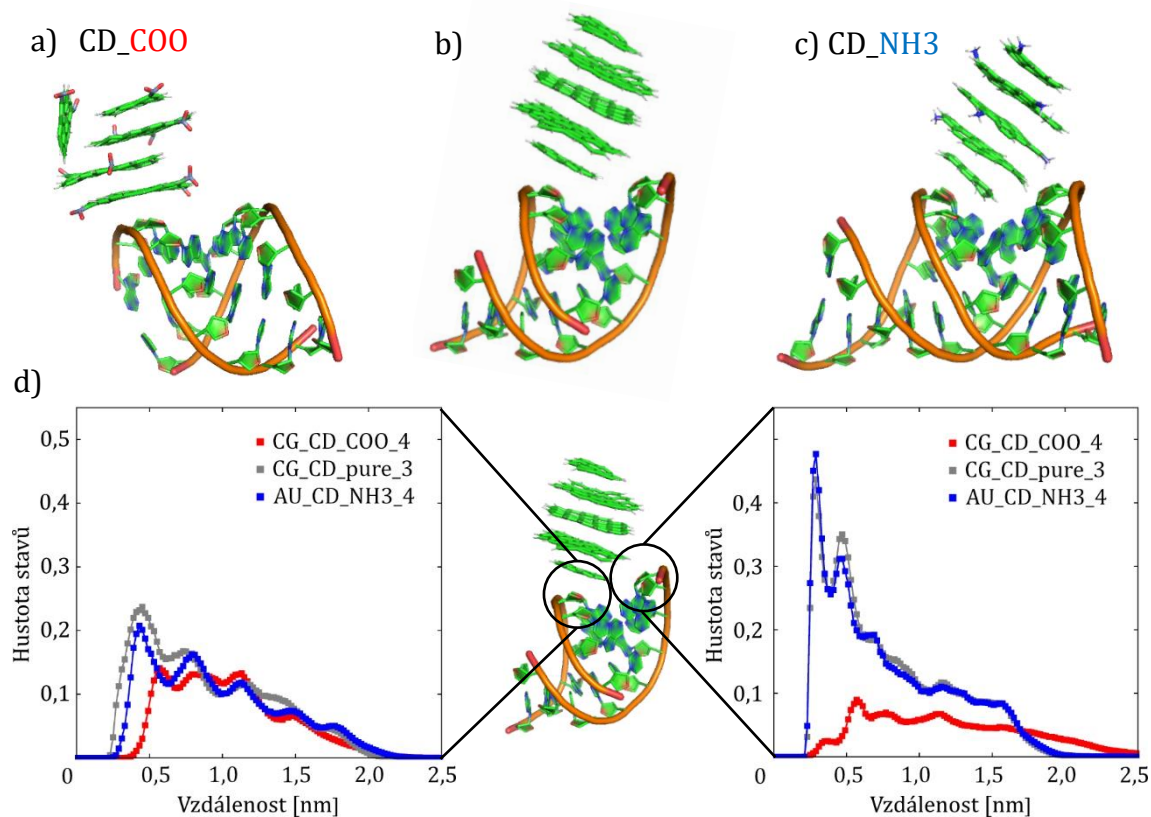
Obrázek 20 Porovnání parametru *slide* (graf vlevo) a *shift* (graf vpravo) pro pár bází 5-24 modelu AU\_CD\_pure\_5 (světle zelená) a solvatovaného AU duplexu bez CD (tmavě zelená)

**CD\_pure** nasedla přímo na ribózu a následně došlo k přiblížení k ribóze na opačné straně žlábků. Poloha CD\_pure ve žlábků ve většině případů nebyla statická a docházelo k pohybu v rámci malého žlábků. **CD\_COO** na rozdíl od CD\_pure neinteragovala s ribózou na opačné straně žlábků, ale docházelo ke sklouznutí vrstev po sobě a interakci s více ribózami v malém žlábků. Tvar ani poloha CD\_COO v rámci simulací nebyly stabilní. **CD\_NH3** se v porovnání s CD\_pure a CD\_COO přiblížila k RNA rychleji, ne vždy byl první kontakt s ribózou, ale v některých simulacích se CD\_NH3 přiblížila k cukr-fosfátové páteři duplexu za vzniku vodíkových vazeb, které nezánikly ani během interakce CD\_NH3 s ribózou v malém žlábků.

Zajímavé bylo sledovat vliv funkční skupiny také na chování CD. CD\_pure, která nemá na povrchu navázanou funkční skupinu, nenese náboj a ani se nepřitahuje ani neodpuje se záporně nabitou páteří, nám v tomto případě poslouží jako referenční (Obrázek 21b). CD\_COO do žlábků ve srovnání s CD\_pure nasedla z menší části (Obrázek 21a), jelikož docházelo k jejímu odpuzování od záporně nabitě páteře. Naopak CD\_NH3 díky kladným protonovaným aminoskupinám na povrchu nasedla do žlábků ve srovnání s CD\_pure částečně více (Obrázek 21c), jelikož navíc byla přitahovaná k záporně nabitě páteři.

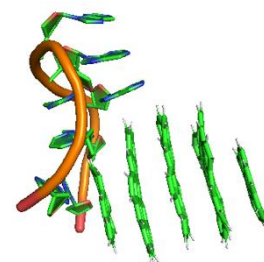
Obě uhlíkové tečky nesoucí funkční skupiny tvořily s RNA vodíkové vazby. Mezi RNA a CD\_pure, resp. CD\_NH3, docházelo k interakci s ribózou v protilehlé části žlábků.

Tato skutečnost nevyplývá pouze z vizuálního hodnocení, ale také z radiálních distribučních funkcí RDF (Obrázek 21d), kdy byl hodnocen počet vodíků, resp. dusíků aminoskupiny nebo uhlíků karboxylové skupiny, pokrývajících uhlíkové tečky v okolí kyslíku ve furanózovém cyklu ribózy. Graf vlevo se týká ribózy, na kterou nasedla uhlíková tečka. Graf vpravo zachycuje RDF v okolí kyslíku ribózy na opačné straně žlábků, která s CD\_pure a CD\_NH3 vstupovala do vzájemné interakce. Hustota stavů CD\_COO byla ve srovnání s hustotou stavů CD\_pure nižší. Hustota stavů atomů CD\_NH3 korelovala s hustotou stavů atomů CD\_pure, můžeme si však povšimnout, že CD\_NH3 má částečně vyšší hustotu stavů v oblasti, kde CD\_NH3 mohla tvořit vodíkové vazby s páteří.



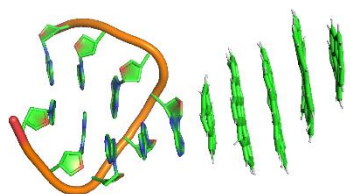
Obrázek 21 Obrázky a-c zachycují uspořádání duplexu a tří typů CD v malém žlábků, které nasedly na ribózu v malém žlábků (a - stabilní CG\_CD\_COO\_4, b - CG\_CD\_pure\_3 a c - AU\_CD\_NH3\_4). V dolní části jsou zachyceny grafy RDF pro hustotu výskytů atomů jednotlivých CD v okolí kyslíku ribózy, na který CD nasedla (graf vlevo), a kyslíku ribózy, který se nacházel na druhé straně žlábků (obrázek vpravo)

**Smyčka** poskytovala možnost interakce v malém žlábků na ribózy předposledního a posledního páru bází. Zatímco ribózy duplexu byly vůči krajní vrstvě CD rovnoběžně, v případě smyčky se ribózy terminálních bází natočily ke krajní vrstvě CD kolmo. Navíc došlo k PI tvaru písmene T mezi nejbližší bází smyčky a uhlíkovou tečkou (Obrázek 22).



Obrázek 22 GAGA\_CD\_pure\_3

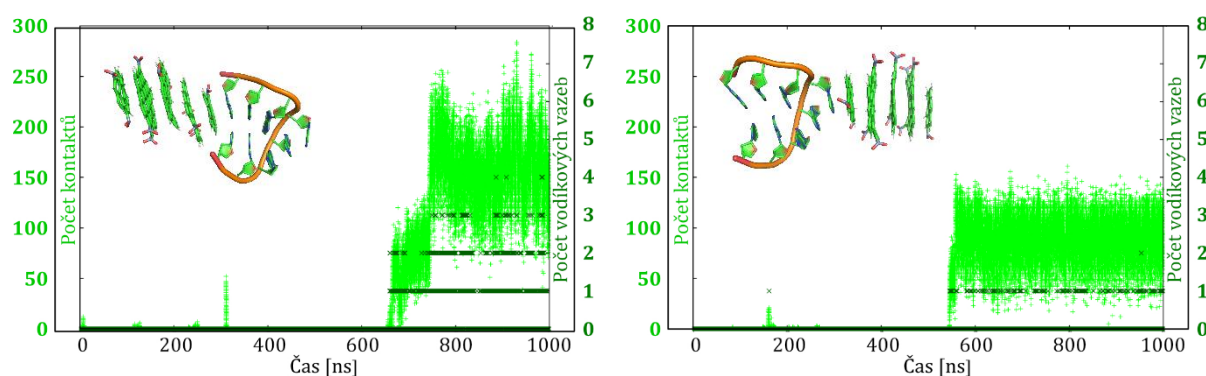
### 6.1.3 Volné báze smyčky (3)



Obrázek 23 GAGA\_CD\_pure\_4

**Smyčka** má na rozdíl od duplexu dvě nespárované báze v prostřední části vlákna, které jsou více vysunuté do prostoru, jsou méně chráněné záporně nabitou páteří a poskytují možnost pro patrové interakce (Obrázek 23). Většina CD\_COO a CD\_pure tvořila patrovou interakci právě s některou volnou bází, resp. volnými bázemi. Naopak CD\_NH3 díky kladnému náboji a možnosti tvořit vodíkové vazby preferovala jiné části smyčky. V simulacích

byly pozorovány dva mechanismy nasednutí CD na volnou bázi. Prvním bylo přímé nasednutí za vzniku PI. Ve druhém způsobu došlo nejdříve k PI tvaru T, která trvala jen zanedbatelnou dobu, a následně došlo k natočení CD tak, že její vrstvy byly rovnoběžné s volnou bází smyčky. Patrová interakce s nespárovanou bází se zásadně neprojevila ve změně chování RNA ani CD. Průměrný počet kontaktů patří mezi nejnižší. Pro porovnání je uveden model GAGA\_CD\_COO\_5 (Obrázek 24 vlevo), ve kterém došlo k PI CD\_COO na terminální bázi smyčky, a model GAGA\_CD\_COO\_3 (Obrázek 24 vpravo), kde došlo k patrové interakci CD\_COO na volnou bázi smyčky. Model GAGA\_CD\_COO\_3 vykazuje naproti modelu GAGA\_CD\_COO\_5 menší počet vodíkových vazeb i kontaktů.

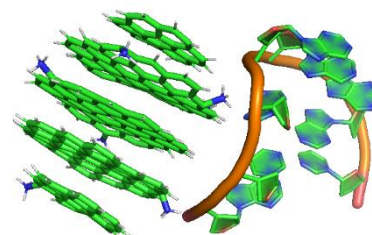


Obrázek 24 Porovnání počtu kontaktů a vodíkových vazeb pro GAGA\_CD\_COO\_5 (PI na terminální bázi – graf vlevo) a GAGA\_CD\_COO\_3 (PI na volnou bázi smyčky – graf vpravo)

Ve dvou simulacích, jedné CD\_COO a jedné CD\_pure, došlo ke změně z patrové interakce na volnou bázi smyčky na patrovou interakci s ribózami nespárovaných nukleotidů. Tato změna byla provázena pro oba typy CD zvýšením počtu kontaktů, pro CD\_COO i zvýšením počtu vodíkových vazeb.

### 6.1.4 Velký žlábek (4)

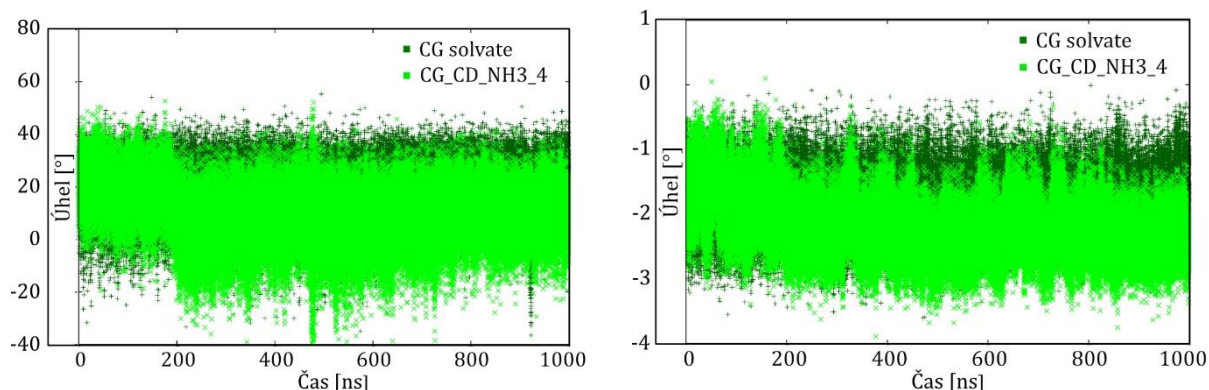
CD\_NH3 a CD\_COO díky funkčním skupinám na svém povrchu tvořily s RNA vodíkové vazby. Zatímco pro CD\_COO byly vodíkové vazby pouze doprovodnou interakcí k jedné z výše uvedených interakcí, CD\_NH3 ve čtyřech simulacích tvořila pouze vodíkové vazby s páteří. **Smyčka** vzhledem k délce vlákna nemohla CD\_NH3 poskytnout velký žlábek tak, jak tomu je u duplexu. CD\_NH3 tvořila vodíkové vazby s páteří RNA (Obrázek 25). Měření vzájemných rotací vrstev CD ukázalo, že tři prostřední vrstvy po přiblížení k RNA a zaujetí výhodné polohy po sobě dále výrazně nerotovaly.



Obrázek 25 GAGA\_CD\_NH3\_5

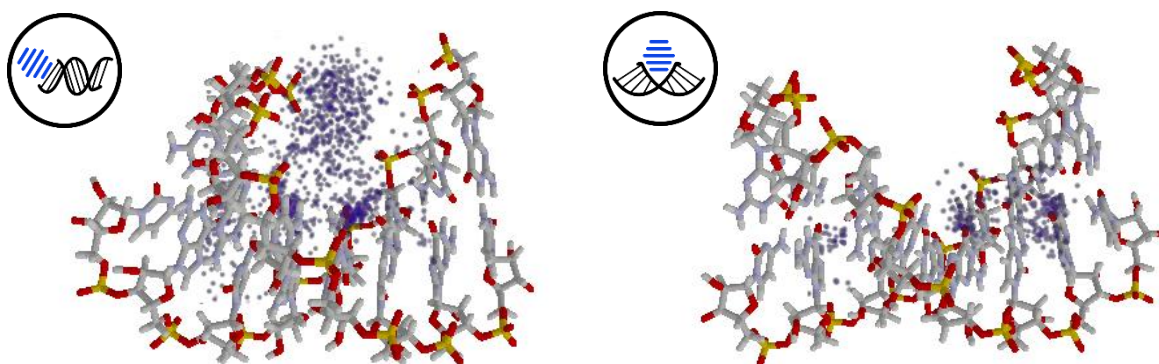


**Duplex** RNA odpovídající svými parametry přibližně A-formě DNA má velký žlábek o menší šířce, než mají CD použité v simulacích. Proto se vsunutí CD\_NH3 do velkého žlábků projevilo v jeho rozšíření (obrázek 27 vpravo), které vedlo ke změně helikálních parametrů (Obrázek 26) i dihedrálních úhlů cukr-fosfátové páteře. Změna se týkala především reziduí v prostřední části duplexu.



Obrázek 26 Porovnání parametrů solvovaného CG duplexu (tmavě zelená) a CG\_CD\_NH3\_4 (světle zelená): inclination páru reziduí 5-16 (vlevo) a slide pro pár reziduí 4-17 (vpravo)

Jak bylo zmíněno již v teoretické části, záporný náboj cukr-fosfátové páteře je kompenzován kationty rozpouštědla, které se vyskytují jak ve velkém, tak v malém žlábků. Přítomnost CD\_NH3 vedla k vytlačení draselných kationtů z velkého žlábků. Pro ukázkou slouží porovnání hustoty výskytů draselných iontů ve velkém žlábků ve dvou modelech sestávajících z CG duplexu a CD\_NH3. V prvním modelu došlo k PI krajní báze CD na terminální báze duplexu (Obrázek 27 vlevo), ve druhém se CD dostala do velkého žlábků duplexu (Obrázek 27 vpravo). Rozdíl v hustotě výskytů draselných iontů i velikosti žlábků je z obrázků zjevný.



Obrázek 27 Porovnání hustotní mapy draselných iontů ve velkém žlábků CG\_CD\_NH3\_3 (PI na terminální báze duplexu) a CG\_CD\_NH3\_4 (HB s páteří duplexu)

Z pohledu CD\_NH3 bylo v rámci tohoto typu interakce vytvořeno nejvíce vodíkových vazeb a došlo ke snížení plochy povrchu, která byla vystavena rozpouštědlu.

## 6.2 Přehled typů a četností interakcí RNA

Následující část popisuje interakce se zaměřením na jednotlivé části RNA. V tabulce 3 je uveden celkový přehled typu a četnosti interakcí, které byly pozorovány v rámci simulací, včetně podrobných údajů pro jednotlivé části RNA.

Tabulka 3 Přehled typů a četnosti interakcí, kterých se účastnily struktury RNA

Typ a četnost interakce RNA	Celkem	CG	AU	MIX	GAGA
0 nedošlo k interakci	4	0	1	2	1
1 terminální báze	<b>18</b>	<b>5</b>	<b>7</b>	<b>5</b>	1
2 malý žlábek	14	4	3	4	3
3 volné báze smyčky	5	0	0	0	<b>5</b>
4 velký žlábek	4	1	0	1	2
1+4 terminální báze + velký žlábek	3	2	1	0	0

### 6.2.1 CG duplex

CG duplex se skládá ze dvou komplementárních vláken o délce 10 nukleotidů ve vlákne obsahující pouze báze cytosin a guanin, které jsou propojeny třemi vodíkovými vazbami. Jedná se o relativně krátký duplex, což se negativně projevilo na rozpojování terminálních bází s tím, že obě terminální báze 5' konců duplexu v simulaci pouze CG duplexu bez přítomnosti CD nasedly do velkého žlábků a vzájemně interagovaly. Preferovanými interakcemi CD s CG duplexem byla interakce s terminálními bázemi nebo ribózami v malém žlábků.

### 6.2.2 AU duplex

AU duplex se skládá ze dvou komplementárních vláken o délce 14 nukleotidů ve vlákne obsahující pouze báze adenin a uracil. Báze propojují pouze dvě vodíkové vazby a mezi páry bází jsou slabší párové interakce než u páru cytosinu a guaninu. Z toho důvodu docházelo k rozpojování terminálních bází. Preferovanou interakcí byla PI na terminální báze.

### 6.2.3 MIX duplex

MIX duplex se skládá ze dvou komplementárních vláken o délce 19 nukleotidů ve vlákne obsahující všechny báze vyskytující se v RNA. Jednalo se o nejdelší použitý duplex. Stejně jako u AU duplexu byla preferovanou interakcí patrová interakce s terminálními bázemi.

### 6.2.4 Smyčka GAGA

Smyčka GAGA je tvořena jedním vláknem o délce 8 nukleotidů, jehož krajní báze tvoří tři páry bází a prostřední dvě báze jsou nespárované. Nejčastější interakce smyčky GAGA byla právě patrová interakce na volný adenin ve smyčce.



### 6.3 Přehled typů a četností interakcí CD

Následující část popisuje interakce se zaměřením na jednotlivé uhlíkové tečky. V tabulce 4 je uveden celkový přehled typu a četnosti interakcí, které byly pozorovány v rámci simulací, včetně podrobných údajů pro jednotlivé struktury CD.

Tabulka 4 Přehled typů a četnosti interakcí, kterých se účastnily CD

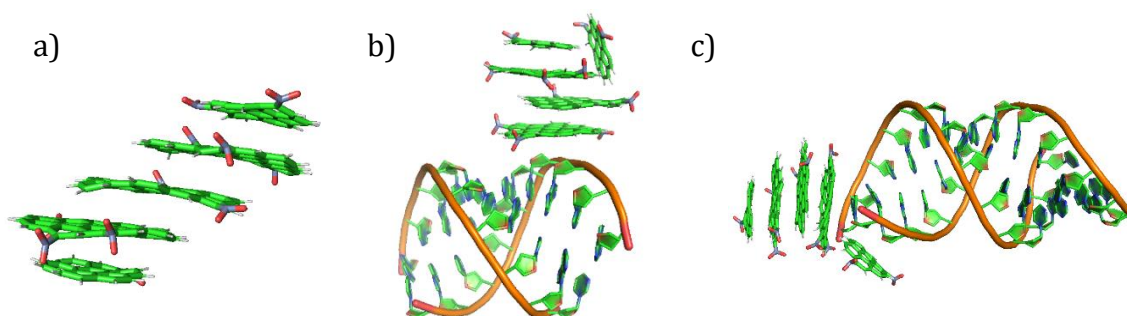
Typ a četnost interakce	Celkem	CD_pure	CD_COO	CD_NH3
0 nedošlo k interakci	4	1	3	0
1 terminální báze	<b>18</b>	4	<b>9</b>	<b>5</b>
2 malý žlábek	14	<b>8</b>	2	4
3 volné báze smyčky	5	3	2	0
4 velký žlábek	4	0	0	4
1+4 terminální báze + velký žlábek	3	0	0	3

#### 6.3.1 CD\_pure

Uhlíková tečka bez funkčních skupin interagovala pouze pomocí patrových interakcí. Zatímco celkově nejpreferovanější interakce přes všechny CD byla patrová interakce na terminální báze, CD\_pure preferovala interakci s ribózami v malém žlábků. CD\_pure si zachovávala kulovitý tvar bez ohledu na to, zda došlo či nedošlo k interakci. Její vrstvy po sobě volně rotovaly.

#### 6.3.2 CD\_COO

Uhlíková tečka pokrytá deprotonovanými karboxylovými skupinami má vzhledem ke svému povrchu relativně velký náboj. V důsledku odpuzování funkčních skupin docházelo ke klouzání vrstev po sobě (Obrázek 28a), kvůli hydrofobní interakci i přes repulzi funkčních skupin zůstávaly vrstvy převážně u sebe. Celkem ve čtyřech simulacích došlo k odsunutí krajní vrstvy. Tato vrstva se ve dvou případech přesunula na boční stranu tečky (Obrázek 28b) a ve dvou případech se přesunula na RNA (Obrázek 28c). Vrstvy CD\_COO ve vodném prostředí byly natočené tak, aby vzdálenosti mezi funkčními skupinami byly maximální.



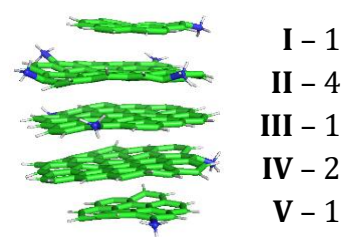
Obrázek 28 Chování CD\_COO

Po odsunutí krajní vrstvy na CD (Obrázek 28b) došlo ke změně vzájemných poloh vrstev tak, aby v okolí odsunuté vrstvy byl minimální počet funkčních skupin.

Dominantní interakcí CD\_COO byla patrová interakce s terminálními bázemi RNA, které byly nejméně stíněny zápornou cukr-fosfátovou páteří RNA, od které byla CD\_COO elektrostaticky odpuzována. I přes to byly zaznamenány vodíkové vazby funkčních skupin s vodíky fosfátů v cukr-fosfátové páteři nebo vodíky navázané na dusíky bází, kde deprotonované karboxylové skupiny vystupovaly jako donor elektronového páru.

### 6.3.3 CD\_NH3

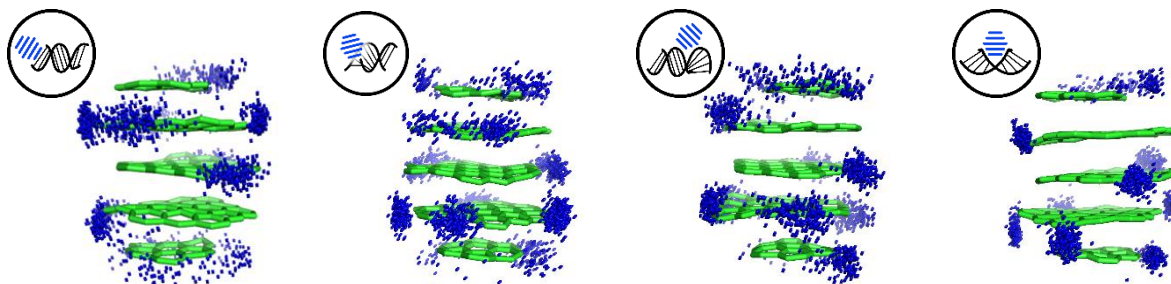
Uhlíková tečka pokrytá protonovanými aminoskupinami zachovávala kulovitý tvar ve všech simulacích. Rozložení funkčních skupin na jejím povrchu nebylo zcela symetrické, jak je patrné z obrázku 29, kde je vedle čísla (římská číslice) vrstvy uveden počet funkčních skupin, které daná vrstva obsahuje. Zatímco obě krajní vrstvy nesly shodný počet funkčních skupin, vrstva II nesla o dvě funkční skupiny více než vrstva IV. Tento rozdílný počet funkčních skupin vedl k tomu, že během interakcí byla ve většině případů CD\_NH3 natočená k RNA vrstvou I, jelikož toto natočení jí umožňovalo tvořit více vodíkových vazeb.



Obrázek 29 Rozložení funkčních skupin CD\_NH3

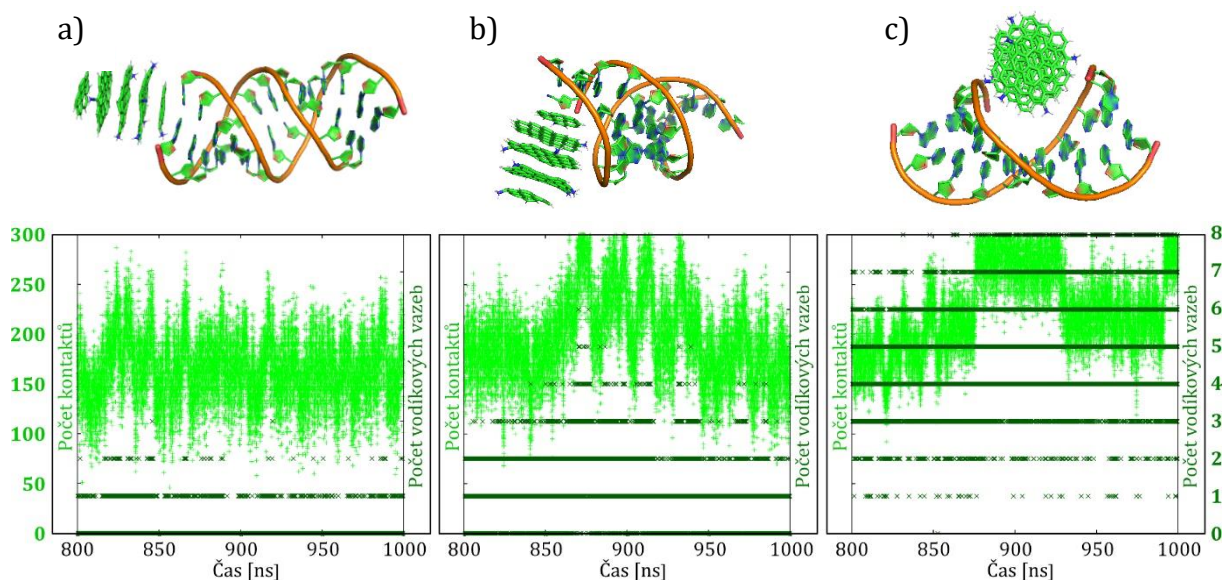
Kladná CD\_NH3 byla v rámci simulací elektrostaticky přitahována k cukr-fosfátové páteři RNA, kde došlo následně k vytvoření vodíkových vazeb se záporně nabitými kyslíky fosfátů. Interakce s cukr-fosfátovou páteří byla preferována i před možností patrové interakce s volnými bázemi smyčky.

Zachování kulovitého tvaru a přítomnost nabitých funkčních skupin vedly ke **snížení volné rotace** vrstev po sobě, zejména prostředních vrstev, a k zaujetí stabilní vzájemné polohy CD\_NH3 již ve vodném prostředí. Typ interakce CD\_NH3 s RNA se projevil jak ve vzájemném natočení vrstev, tak v zafixování poloh některých vrstev. Pro příklad slouží obrázek 30. Krajní dvě vrstvy CD\_NH3 vstupující do patrové interakce s terminálními bázemi RNA se snažily maximalizovat počet vodíkových vazeb, což se odrazilo ve zvýšené rotaci vrstev v porovnání s chováním CD\_NH3 ve vodném prostředí bez RNA. Naopak k výraznému snížení rotace vrstev CD došlo během tvorby vodíkových vazeb s RNA, když se CD\_NH3 nacházela ve velkém žlábků RNA.



Obrázek 30 Porovnání hustotních map dusíků aminoskupin CD\_NH3 pro interakce CD s duplexy

V simulacích, kde došlo k PI CD\_NH3 na terminální bázi duplexu, byla v průměru zaznamenána jedna **vodíková vazba** mezi duplexem a CD\_NH3 (Obrázek 31a). PI CD\_NH3 na vytrženou terminální bázi duplexu byla průměrně doprovázena tvorbou tří až čtyř vodíkových vazeb s cukr-fosfátovou páteří (Obrázek 31b). Naproti tomu CD\_NH3 umístěna ve velkém žlábkku tvořila v průměru až sedm vodíkových vazeb (Obrázek 31c). Z grafů je navíc patrné, že počet vodíkových vazeb koreluje také s počtem kontaktů.

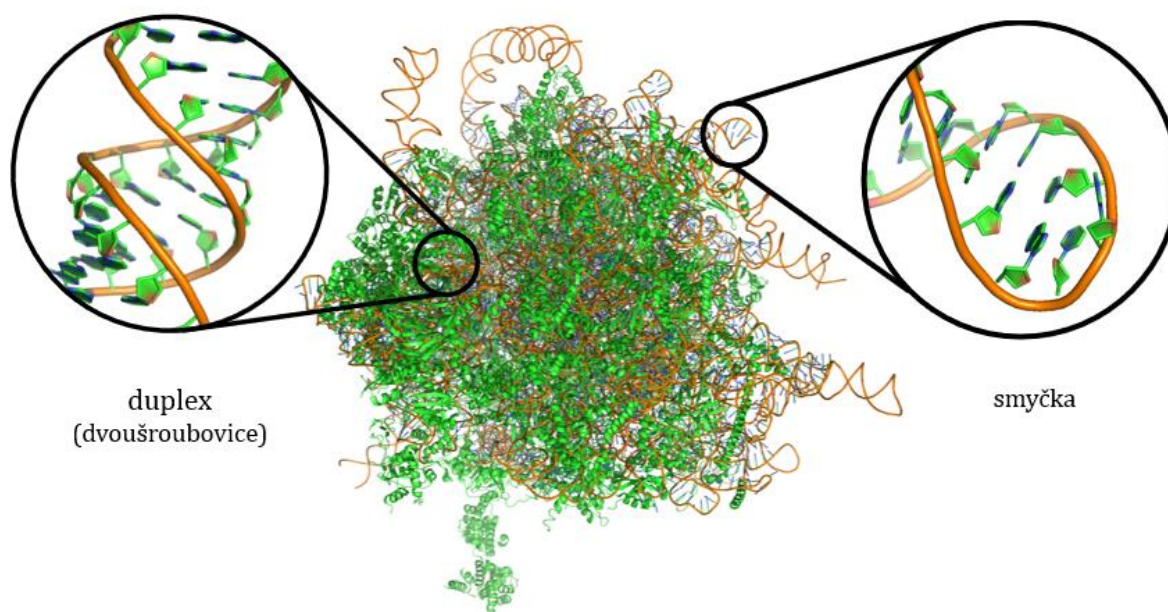


Obrázek 31 Stabilní struktury a grafy zachycující počty kontaktů a vodíkových vazeb pro modely a) AU\_CD\_NH3\_3 b) AU\_CD\_NH3\_5 c) CG\_CD\_NH3\_4

Ač umístění CD\_NH3 ve velkém žlábkku bylo provázeno tvorbou nejvíce vodíkových vazeb, tak tato interakce byla pro CD\_NH3 a duplex zaznamenána pouze ve dvou simulacích. Navíc umístění CD ve velkém žlábkku částečně ovlivnilo dynamiku duplexu, která se projevila ve změně dihedrálních úhlů i helikálních parametrů.

## 6.4 Zhodnocení

V živých organismech se RNA vyskytuje v různých formách – jednak jako jednovláknové struktury mRNA, nebo také ribozomy, které ve své struktuře obsahují kromě rRNA i proteiny. Simulace tak komplexního systému jako je ribozom v atomárním rozlišení, není se současným výpočetním výkonem reálná v rozumných časových škálách. Proto pro účely simulací lze komplexní systém rozdělit na nejčastější motivy – v tomto případě na smyčku a duplex. Také z hlediska uhlíkových teček zatím nejsou experimentálně připravovány CD o přesně definovaném složení. Tyto skutečnosti nesmíme opomenout během interpretace výsledků. Smyčka ani duplex se zpravidla nevyskytují samostatně, proto nemá z praktického hlediska smysl podrobněji studovat interakce s terminálními bázemi RNA. Rovněž z hlediska velikosti by pravděpodobně nedocházelo umístění CD\_NH3 do velkého žlábků, pokud by CD měla značně větší rozměry než modelové CD použité v simulacích, které patří spíše k menším. Při pohledu na ribozomy (Obrázek 32) se setkáme s duplexy, na kterých by mohlo docházet k interakci s ribózy v malém žlábků. Tyto duplexy bývají zakončeny smyčkami, kde by se mohly objevit patrové interakce na volné báze smyčky.



Obrázek 32 Ukázka duplexu a smyčky v ribozomu

Během interakce CD s ribózy v malém žlábků a ani během patrové interakce na volné báze smyčky nedocházelo k dramatické změně dihedrálních úhlů ani helikálních parametrů RNA. Počet vodíkových vazeb mezi páry bází většinou zůstal zachován, nedocházelo k narušení struktury, uhlíkové tečky tedy neměly destruktivní vliv na strukturu RNA, což lze hodnotit jako pozitivní výsledek.

## 7 Závěr

Uhlíkové nanomateriály, mezi které patří i uhlíkové tečky, nachází využití díky svým vlastnostem nejen v medicíně. Vzhledem k faktu, že zatím nebyla prokázána toxicita CD, uvažuje se o jejich uplatnění v různých oblastech medicíny od diagnostiky až po léčbu. Před reálnými aplikacemi uhlíkových nanomateriálů je velice důležité prozkoumat jejich možné interakce s látkami běžně se v organismech vyskytujícími, mezi které bez pochyby patří také RNA.

Cílem této bakalářské práce bylo blíže prozkoumat vzájemné interakce RNA s uhlíkovými nanomateriály pomocí MD simulací. Z RNA byly pro účely simulací použity čtyři struktury RNA – smyčka a tři duplexy, které se lišily svojí délkou i přítomnými bázemi. Při výběru uhlíkových teček bylo zohledněno složení uhlíkových teček připravovaných z přírodních prekurzorů, či chemickou syntézou. Pomocí externího rozšíření programu VMD byly připraveny tři modely CD lišící se nábojem i povrchovou modifikací – kladná CD s protonovanou aminoskupinou, záporná CD s deprotonovanou karboxylovou skupinou a CD bez povrchové modifikace, a tedy i bez náboje. Celkově bylo připraveno 12 kombinací RNA a CD, pro každou kombinaci byly spuštěny čtyři simulace, celkem bylo provedeno 48 simulací modelů RNA s CD. Navíc byly spuštěny simulace každé ze solvatovaných struktur, aby bylo možné hodnotit změny v chování RNA i CD. Jelikož bylo pracováno se čtyřmi strukturami RNA a třemi typy CD, bylo spuštěno sedm simulací samostatných struktur. Ve výsledku bylo provedeno 55 simulací.

Po proběhnutí simulace byly provedeny analýzy zvláště pro RNA, CD a následně mezi strukturami. Pro RNA byly vyhodnocovány změny ve velikosti dihedrálních úhlů a helikálních parametrů. U uhlíkových teček byl sledován tvar a vzájemná rotace vrstev. Pro interakce RNA a CD byl kromě vzájemné polohy určen typ interakce, počet vodíkových vazeb, počet kontaktů, radiální distribuční funkce a hustotní mapy. Interakce byly podle části RNA, na které došlo k interakci, rozděleny do čtyř základních částí - terminální báze, volné báze, malý a velký žlábek. Nejčastější byla interakce s terminálními bázemi. V biologických systémech je počet terminálních bází sice nízký, nicméně tento typ interakcí se může projevit např. se siRNA. Naopak k interakci s ribózy v malém žlábků i volnými bázemi smyček v reálných systémech docházet může běžně. Nasednutí CD do velkého žlábků bylo umožněno jejími malými rozměry. Experimentálně používané CD mají rozměry větší, než je šířka velkého žlábků RNA, reálné CD by tedy do velkého žlábků pravděpodobně nevstupovaly. CD<sub>COO</sub> vstupovala do interakcí s RNA v porovnání se zbývajícími CD pomaleji, nezachovávala kulovitý tvar a preferovala interakci s terminálními bázemi. Ve většině interakcí navíc tvořila vodíkové vazby s hydroxylovými skupiny fosfátů. CD<sub>NH3</sub> díky kladnému náboji a možnosti tvořit vodíkové vazby vstupovala do interakcí i v malém a velkém žlábků. Vodíkové vazby, kterých se účastnila jako donor protonu, tvořila především s deprotonovanými kyslíky fosfátů cukr-fosfátové páteře nebo s dusíky bází. Během pozorovaných interakcí RNA s uhlíkovými tečkami zpravidla nedocházelo k výraznému ovlivnění dihedrálních úhlů ani helikálních parametrů, což by mohlo potvrdit biokompatibilitu uhlíkových teček s RNA. Nicméně simulace provedené v rámci této bakalářské práce jsou jen začátek studia vlivu CD na strukturu RNA a již jsou vybrány a simulovány další biologicky více relevantní systémy, které se již do této práce nevešly, a budou sloužit jako základ publikace.



## 8 Summary

In this work, the interactions of RNA with carbon nanomaterials were studied. Interaction always occurred except in two simulations. The most common interactions were  $\pi$ - $\pi$  stacking and hydrophobic interactions. In addition, carbon dots with functional groups were involved in electrostatic interactions and formed hydrogen bonds with the RNA. Depending on where on the RNA the interaction occurred, the interactions were divided into four types: terminal bases, unpaired loop bases, major and minor grooves. The most common type of interaction was the  $\pi$ - $\pi$  stacking interaction with terminal bases. The least common position of the carbon dot towards the RNA was the position of the carbon dot of the major groove. Only carbon dot covered with amino groups entered the major groove, and a large number of hydrogen bonds were formed. In general, the interactions did not significantly affect the helical parameters and dihedral angles of the RNA. The stable interactions between RNA and CD are essential for their applications, but we observed that they did not lead to degradation of the RNA structure. However, the systems used in the simulations are only part of the study and further simulations of more biologically relevant structures will be carried out.

## 9 Použité zdroje

1. Hynek, R., Valentová, O. & Kodíček, M. *Biochemie - chemický pohled na biologický svět*. (VŠCHT, 2018).
2. Varani, G. Exceptionally stable nucleic acid hairpins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **24**, 379–404 (1995).
3. Nowakowski, J. & Tinoco, I. RNA structure and stability. *Semin Virol* **8**, 153–165 (1997).
4. Bonner, G. & Klibanov, A. M. Structural stability of DNA in nonaqueous solvents. *Biotechnol Bioeng* **68**, 339–344 (2000).
5. Yakovchuk, P., Protozanova, E. & Frank-Kamenetskii, M. D. Base-stacking and base-pairing contributions into thermal stability of the DNA double helix. *Nucleic Acids Res* **34**, 564–574 (2006).
6. Buzea, C., Pacheco, I. I. & Robbie, K. Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases* **2**, MR17–MR71 (2007).
7. Niazvand, F. *et al.* Application of carbon allotropes composites for targeted cancer therapy drugs: A review. *Journal of Composites and Compounds* **3**, 140–151 (2021).
8. Georgakilas, V., Perman, J. A., Tucek, J. & Zboril, R. Broad Family of Carbon Nanoallotropes: Classification, Chemistry, and Applications of Fullerenes, Carbon Dots, Nanotubes, Graphene, Nanodiamonds, and Combined Superstructures. *Chem Rev* **115**, 4744–4822 (2015).
9. Liu, J., Li, R. & Yang, B. Carbon Dots: A New Type of Carbon-Based Nanomaterial with Wide Applications. *ACS Cent Sci* **6**, 2179–2195 (2020).
10. Wang, Y. & Hu, A. Carbon quantum dots: synthesis, properties and applications. *J Mater Chem C Mater* **2**, 6921–6939 (2014).
11. Chen, W. *et al.* Synthesis and applications of graphene quantum dots: A review. *Nanotechnol Rev* **7**, 157–185 (2018).
12. Đorđević, L., Arcudi, F., Cacioppo, M. & Prato, M. A multifunctional chemical toolbox to engineer carbon dots for biomedical and energy applications. *Nature Nanotechnology* **2022** **17**, 112–130 (2022).
13. Cruz, S. M. A., Girão, A. F., Gonçalves, G. & Marques, P. A. A. P. Graphene: The Missing Piece for Cancer Diagnosis? *Sensors* **16**, (2016).
14. Ji, C., Zhou, Y., Leblanc, R. M. & Peng, Z. Recent Developments of Carbon Dots in Biosensing: A Review. *ACS Sens* **5**, 2724–2741 (2020).
15. García-Mendiola, T. *et al.* Carbon nanodots based biosensors for gene mutation detection. *Sens Actuators B Chem* **256**, 226–233 (2018).

16. Mohammadi, S., Salimi, A., Hoseinkhani, Z., Ghasemi, F. & Mansouri, K. Carbon dots hybrid for dual fluorescent detection of microRNA-21 integrated bioimaging of MCF-7 using a microfluidic platform. *J Nanobiotechnology* **20**, 1–15 (2022).
17. Bao, X. *et al.* In vivo theranostics with near-infrared-emitting carbon dots—highly efficient photothermal therapy based on passive targeting after intravenous administration. *Light: Science & Applications* **2018** *7*, 1–11 (2018).
18. Bayoumi, N. A. & Emam, A. N. <sup>99m</sup>Tc radiolabeling of polyethylenimine capped carbon dots for tumor targeting: synthesis, characterization and biodistribution. *Int J Radiat Biol* **97**, 977–985 (2021).
19. Zeng, Q. *et al.* Carbon dots as a trackable drug delivery carrier for localized cancer therapy in vivo. *J Mater Chem B* **4**, 5119–5126 (2016).
20. Calabrese, G. *et al.* Carbon Dots: An Innovative Tool for Drug Delivery in Brain Tumors. *Int J Mol Sci* **22**, (2021).
21. Pardo, J., Peng, Z. & Leblanc, R. M. Cancer Targeting and Drug Delivery Using Carbon-Based Quantum Dots and Nanotubes. *Molecules* **23**, 1 – 20 (2018).
22. Wang, Q. *et al.* Fluorescent carbon dots as an efficient siRNA nanocarrier for its interference therapy in gastric cancer cells. *J Nanobiotechnology* **12**, 1–12 (2014).
23. Qi, L. *et al.* Biocompatible nucleus-targeted graphene quantum dots for selective killing of cancer cells via DNA damage. *Communications Biology* **2021** *4*, 1–12 (2021).
24. Han, Y. *et al.* Near-infrared-II photothermal ultra-small carbon dots promoting anticancer efficiency by enhancing tumor penetration. *J Colloid Interface Sci* **616**, 595–604 (2022).
25. Wu, X. *et al.* F,N-Doped carbon dots as efficient Type I photosensitizers for photodynamic therapy. *Dalton Transactions* **51**, 2296–2303 (2022).
26. Boakye-Yiadom, K. O. *et al.* Carbon dots: Applications in bioimaging and theranostics. *Int J Pharm* **564**, 308–317 (2019).
27. Naik, G. G., Shah, J., Balasubramaniam, A. K. & Sahu, A. N. Applications of natural product-derived carbon dots in cancer biology. *Nanomedicine* **16**, 587–608 (2021).
28. Gedda, G., Bhupathi, A. & Balaji Gupta Tiruveedhi, V. L. N. Naturally Derived Carbon Dots as Bioimaging Agents. *Biomechanics and Functional Tissue Engineering* (2021).
29. Hospital, A., Goñi, J. R., Orozco, M. & Gelpí, J. L. Molecular dynamics simulations: Advances and applications. *Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry* **8**, 37–47 (2015).
30. Case D. A. *et al.* (2016), AMBER 2016, University of California, San Francisco.
31. Abraham, M. *et al.* *GROMACS 2023 Manual*. (2023). doi:10.5281/ZENODO.7588711.



32. Schlick, T. Molecular Dynamics: Basics. *Interdisciplinary Applied Mathematics* **21**, 425–461 (2010).
33. Paloncýová, M., Langer, M. & Otyepka, M. Structural Dynamics of Carbon Dots in Water and N, N -Dimethylformamide Probed by All-Atom Molecular Dynamics Simulations. *J Chem Theory Comput* **14**, 2076–2083 (2018).
34. Humphrey, W., Dalke, A. & Schulten, K. VMD: Visual molecular dynamics. *J Mol Graph* **14**, 33–38 (1996).
35. Izadi, S., Anandakrishnan, R. & Onufriev, A. v. Building water models: A different approach. *J Phys Chem Lett* **5**, 3863–3871 (2014).
36. Berendsen, H. J. C., Postma, J. P. M., Van Gunsteren, W. F., Dinola, A. & Haak, J. R. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J Chem Phys* **81**, 3684 (1998).
37. Hopkins, C. W., Le Grand, S., Walker, R. C. & Roitberg, A. E. Long-Time-Step Molecular Dynamics through Hydrogen Mass Repartitioning. *J Chem Theory Comput* **11**, 1864–1874 (2015).
38. Zgarbová, M. *et al.* Refinement of the Cornell *et al.* Nucleic acids force field based on reference quantum chemical calculations of glycosidic torsion profiles. *J Chem Theory Comput* **7**, 2886–2902 (2011).
39. Bayly, C. I. *et al.* A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules. *J Am Chem Soc* **117**, 5179–5197 (1995).
40. Kührová, P. *et al.* Improving the Performance of the Amber RNA Force Field by Tuning the Hydrogen-Bonding Interactions. *J Chem Theory Comput* **15**, 3288–3305 (2019).
41. Pérez, A. *et al.* Refinement of the AMBER force field for nucleic acids: improving the description of alpha/gamma conformers. *Biophys J* **92**, 3817–3829 (2007).
42. Steinbrecher, T., Latzer, J. & Case, D. A. Revised AMBER parameters for bioorganic phosphates. *J Chem Theory Comput* **8**, 4405–4412 (2012).
43. Vernov, A. V. & Steele, W. A. Computer Simulation Study of the Multilayer Adsorption of Fluid N<sub>2</sub> on Graphite. *Langmuir* **2**, 219–227 (1986).
44. Joung, I. S. & Cheatham, T. E. Determination of alkali and halide monovalent ion parameters for use in explicitly solvated biomolecular simulations. *J Phys Chem B* **112**, 9020–9041 (2008).
45. Wang, J., Cieplak, P. & Kollman, P. A. How well does a restrained electrostatic potential (RESP) model perform in calculating conformational energies of organic and biological molecules? *J Comput Chem* **21**, 1049–1074 (2000).
46. Roe, D. R. & Cheatham, T. E. PTRAJ and CPPTRAJ: Software for processing and analysis of molecular dynamics trajectory data. *J Chem Theory Comput* **9**, 3084–3095 (2013).

47. Case, D. A. *et al.* The Amber biomolecular simulation programs. *J Comput Chem* **26**, 1668–1688 (2005).
48. Altona, C. & Sundaralingam, M. Conformational Analysis of the Sugar Ring in Nucleosides and Nucleotides. a New Description Using the Concept of Pseudorotation. *J Am Chem Soc* **94**, 8205–8212 (1972).
49. Skanberg, R., Falk, M., Linares, M., Ynnerman, A. & Hotz, I. Tracking Internal Frames of Reference for Consistent Molecular Distribution Functions. *IEEE Trans Vis Comput Graph* **28**, 3126–3137 (2022).
50. Skånberg, R. *et al.* Workshop on Molecular Graphics and Visual Analysis of Molecular Data. (2018).
51. Schrödinger, L. L. C. & DeLano, W. PyMOL. Preprint at <http://www.pymol.org/pymol>.
52. Kurdekar, A. *et al.* Comparative performance evaluation of carbon dot-based paper immunoassay on Whatman filter paper and nitrocellulose paper in the detection of HIV infection. *Microfluid Nanofluidics* **20**, 1–13 (2016).

## 10 Přílohy

### 10.1 Příloha 1 – Přehled simulovaných modelů

V tabulce 5 je uveden přehled samostatných simulací pouze solvatovaných struktur RNA a CD. V těchto simulacích nebyl použit krychlový box, v tabulce jsou tudíž uvedeny délky všech hran boxu a také počet doplněných iontů (draselných a chloridových) pro kompenzaci náboje a nastavení koncentrace soli odpovídající fyziologickému roztoku.

Tabulka 5 Přehled samostatných simulací struktur RNA a CD

Model	Rozměry boxu [nm]	Počet K+	Počet Cl-
AU_solvate	5,2 × 5,5 × 5,8	36	10
CG_solvate	4,1 × 4,3 × 5,6	27	9
MIX_solvate	4,2 × 4,6 × 7,6	39	13
GAGA_solvate	4,6 × 4,9 × 5,2	18	11
CD_COO_solvate	5,3 × 5,6 × 6,0	27	16
CD_NH3_solvate	5,5 × 5,6 × 5,6	16	25
CD_pure_solvate	5,3 × 5,5 × 5,6	15	15

V tabulce 6 je uveden přehled simulovaných modelů sestávajících z RNA a CD. Název modelu vychází z toho, jaká struktura RNA a CD byla použita a jaké přirozené číslo bylo použito ve funkci *seed* při vkládání CD do simulačního boxu nástrojem *insert-molecules*. Použitý box měl tvar krychle, v tabulce je uvedena délka hrany boxu, dále počet doplněných iontů (draselných a chloridových) pro kompenzaci náboje a nastavení koncentrace soli odpovídající fyziologickému roztoku. V tabulce 6 je také uvedeno:

- **Interakce** – číselné hodnoty odpovídají části RNA, kde došlo k interakci:
  - 0 žádná interakce,
  - 1 terminální báze,
  - 1+4 terminální báze a velký žlábek,
  - 2 malý žlábek,
  - 3 volná báze smyčky,
  - 4 velký žlábek,
- **Počet HB** – číselná hodnota odpovídá nejvyššímu dlouhodobému počtu vodíkových vazeb v posledních 200 simulace,
- **Tvar CD** – číselná hodnota odpovídá tomu, zda CD měla:
  - 0 kulovitý tvar,
  - 1 tvar protáhlý v důsledku posunutí vrstev po sobě.

Tabulka 6 Přehled simulovaných modelů RNA a CD, legenda je uvedena v úvodním textu

Název modelu	Hrana boxu [nm]	K+	Cl-	Interakce	Počet HB	Tvar CD
AU_CD_COO_1	7	67	30	1	3	1
AU_CD_COO_3	9	103	66	1	2	1
AU_CD_COO_4	9	103	66	1	3	1
AU_CD_COO_5	9	103	66	0	0	1
AU_CD_NH3_1	7	47	30	1	1	0
AU_CD_NH3_3	9	83	66	1	1	0
AU_CD_NH3_4	9	83	66	2	2	0
AU_CD_NH3_5	9	83	66	1+4	4	0
AU_CD_pure_1	7	56	30	1	0	0
AU_CD_pure_3	9	92	66	2	0	0
AU_CD_pure_4	9	66	66	1	0	0
AU_CD_pure_5	9	92	66	2	0	0
CG_CD_COO_1	7	59	30	1	2	1
CG_CD_COO_3	8	75	46	1	2	1
CG_CD_COO_4	8	75	46	2	2	1
CG_CD_COO_5	8	75	46	1	2	1
CG_CD_NH3_1	7	39	30	1+4	3	0
CG_CD_NH3_3	8	55	46	1	1	0
CG_CD_NH3_4	8	55	46	4	8	0
CG_CD_NH3_5	8	55	46	1+4	2	0
CG_CD_pure_1	7	48	30	2	0	0
CG_CD_pure_3	8	64	46	2	0	0
CG_CD_pure_4	8	64	46	1	0	0
CG_CD_pure_5	8	64	46	2	0	0
MIX_CD_COO_1	10	137	90	0	0	1
MIX_CD_COO_3	10	137	90	1	2	1
MIX_CD_COO_4	10	137	90	1	2	1
MIX_CD_COO_5	10	137	90	2	2	1
MIX_CD_NH3_1	10	117	90	1	1	0
MIX_CD_NH3_3	10	117	90	1	1	0
MIX_CD_NH3_4	10	117	90	4	6	0
MIX_CD_NH3_5	10	117	90	2	2	0
MIX_CD_pure_1	10	127	91	2	0	0
MIX_CD_pure_3	10	127	91	0	0	0
MIX_CD_pure_4	10	127	91	1	0	0
MIX_CD_pure_5	10	127	91	2	0	0
GAGA_CD_COO_1	7	49	31	0	0	1
GAGA_CD_COO_3	7	49	31	3	1	1
GAGA_CD_COO_4	7	49	31	3	2	1
GAGA_CD_COO_5	7	49	31	1	2	1
GAGA_CD_NH3_1	7	29	31	4	4	0
GAGA_CD_NH3_3	7	29	31	4	3	0
GAGA_CD_NH3_4	7	29	31	2	1	0
GAGA_CD_NH3_5	7	29	31	2	1	0
GAGA_CD_pure_1	7	38	31	3	0	0
GAGA_CD_pure_3	7	38	31	2	0	0
GAGA_CD_pure_4	7	38	31	3	0	0
GAGA_CD_pure_5	7	38	31	3	0	0

## 10.2 Příloha 2 - Simulační protokoly

### 10.2.1 NpT\_10 Ons\_gpu\_1.in

Všechny simulace probíhaly za NpT podmínek (konstantní počet částic, tlak i teplota) a sestávaly z 10 production. Celkově bylo požadováno, aby délka simulace byla 1  $\mu$ s, proto má každá production nastavenou délku kroku (dt) na 0,002 ps a počet simulačních kroků (nstlim) na 50 000 000.

```
# Production of trajectory. NPT
&cntrl imin=0, ntx=7, irst=1, ntrx=1,ntxo=1, ntr=5000,
      ntwx=5000, ntwr=5000,
      ioutfm=1, ntf=2, ntb=2, igb=0, dielc=1.0, cut=10.0,
      nsnb=10,
      nstlim=50000000,
      t=0.0, dt=0.002, temp0=298.16, tempi= 298.16, ig=-1,
      ntt=1, dtemp=0.0, tautp=0.2,
      ntp=1, pres0=1.0,
      comp=44.6, taup=0.2, npscal=1, ntc=2, tol=0.00001,
      jfastw=0,iwrap=1,nmropt=1,
&end
&wt type='REST', istep1=1,istep2=50000000,value1=1.0,value2=1.0,
&end
&wt type='END', &end
LISTOUT=smd.out
DISANG=SMD.f
```

### 10.2.2 Samostatná minimalizace a krátká simulace CD

Během snah spustit společně minimalizaci a následně simulaci modelu RNA a CD se vyskytly komplikace. Proto byl nejdříve nachystán společný model RNA a CD v boxu, který byl solvatován. Poté byla CD z boxu vyjmuta. Model RNA s vodou byl doplněn o ionty a nástrojem *tleap* byla vytvořena topologie. Pro CD byla samostatně spuštěna minimalizace, zahřívání modelu a následně krátká simulace. Poté CD vrácena do modelu s RNA, vodou a ionty a byla spuštěna společná minimalizace a následně simulace.

#### Energetická minimalizace CD (em.mdp)

```
integrator      = steep
pbc             = xyz
periodic_molecules = no
nsteps         = 100000
nstcgsteep     = 10
emtol          = 10.0
nstxout        = 100
nstlog         = 100
nstenergy      = 100
nstlist        = 5
ns_type        = grid
coulombtype    = PME
vdwtype        = Cut-off
DispCorr       = no
rlist          = 1.0
rvdw           = 1.0
rcoulomb       = 1.0
```

## Zahřívání modelu (tempering.mdp)

```
integrator = md
dt = 0.0002
tinit = 0
nsteps = 50000 ; 50 ps
nstcomm = 10
; Output parameters
nstxout = 0 ; every 10 ps
nstvout = 0
nstfout = 0
nstxtcout = 1000 ; every 2 ps
nstenergy = 500
; Bond parameters
constraint_algorithm = lincs
constraints = none
continuation = yes ; continuing from NPT
; Single-range cutoff scheme
nstlist = 5
ns_type = grid
rlist = 1.0
rcoulomb = 1.0
rvdw = 1.0
; PME electrostatics parameters
coulombtype = PME
fourierspacing = 0.12
fourier_nx = 0
fourier_ny = 0
fourier_nz = 0
pme_order = 4
ewald_rtol = 1e-5
optimize_fft = yes
; Temperature coupling
Tcoupl = Nose-Hoover
tc_grps = System
tau_t = 0.5 ; 0.5
ref_t = 210 ; 310
; Pressure coupling
Pcoupl = Parrinello-Rahman
pcoupltype = semiisotropic
tau_p = 1.0
compressibility = 4.5e-5 4.5e-5
ref_p = 1.0 1.0
refcoord_scaling = com
; Periodic boundary conditions are on in all directions
pbc = xyz
DispCorr = EnerPres
; SIMULATED ANNEALING
; Type of annealing for each temperature group (no/single/periodic)
annealing = single
; Number of time points to use for specifying annealing in each group
annealing-npoints = 2
; List of times at the annealing points for each group
annealing-time = 0 10
```

## Krátká simulace CD (md02.mdp)

```
; Run parameters
integrator = md
dt = 0.002
tinit = 0
nsteps = 5000 ; 10 ps
nstcomm = 10
; Output parameters
nstxout = 0 ; every 10 ps
nstvout = 0
nstfout = 0
nstxtcout = 10 ; every 2 ps
nstenergy = 500
; Bond parameters
constraint_algorithm = lincs
constraints = all-bonds
continuation = yes ; continuing from NPT
; Single-range cutoff scheme
nstlist = 5
ns_type = grid
rlist = 1.0
rcoulomb = 1.0
rvdw = 1.0
; PME electrostatics parameters
coulombtype = PME
fourierspacing = 0.12
fourier_nx = 0
fourier_ny = 0
fourier_nz = 0
pme_order = 4
ewald_rtol = 1e-5
optimize_fft = yes
; Temperature coupling
Tcoupl = Nose-Hoover
tc_grps = System
tau_t = 0.5 ; 0.5
ref_t = 310 ; 310
; Pressure coupling
Pcoupl = Parrinello-Rahman
pcoupltype = semiisotropic
tau_p = 1.0
compressibility = 4.5e-5 4.5e-5
ref_p = 1.0 1.0
refcoord_scaling = com
; Generate velocities is off
gen_vel = no
; Periodic boundary conditions are on in all directions
pbc = xyz
; Long-range dispersion correction
DispCorr = EnerPres
```