

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální chemie



Predikce struktury a studium chování aptameru Mn^{2+} riboswitche

Bakalářská práce

Autor:	Barbora Hoňková
Vedoucí práce:	Mgr. Petra Kührová, Ph.D.
Studijní program:	B 1407 Chemie
Studijní obor:	Aplikovaná chemie
Forma studia:	Prezenční

Olomouc 2021

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala sama pod odborným vedením Mgr. Petry Kührové, Ph.D. Veškeré použité zdroje, které byly pro tuto práci použity jsou řádně citovány v seznamu literatury.

V Olomouci dne

.....

Barbora Hoňková

Poděkování:

Tím to bych ráda poděkovala vedoucí mé bakalářské práce Mgr. Petře Kührové Ph.D. a Mgr. Michalu Janečkovi za cenné připomínky a rady, ale také za čas, který mi věnovali při vypracování této práce. Také děkuji své rodině za podporu při studiu.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Babara Hoňková
Název práce	Predikce struktury a studium chování aptameru Mn ²⁺ riboswitche
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra fyzikální chemie
Vedoucí práce	Mgr. Petra Kührová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2021
Abstrakt	RNA přepínače jsou prvky nacházející se v 5' nepřekládané oblasti, mající schopnost regulovat expresi genu na základě navázání iontu či malé molekuly do své struktury. Tato bakalářská práce se zabývá strukturou aptameru RNA přepínače <i>yybP-ykoY</i> , kdy pomocí počítačových simulací je modelována jeho trojrozměrná struktura, neboť tato struktura zatím nebyla experimentálně připravena.
Klíčová slova	RNA přepínač, RNA, molekulová dynamika,
Počet stran	54
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname:	Barbora Hoňková
Title:	Structure prediction and behavior study of an aptamer of the Mn ²⁺ riboswitch
Type of thesis:	Bachelor
Department:	Department of physical chemistry
Supervisor:	Mgr. Petra Kührová, Ph.D.
Year of presentation:	2021
Abstract:	Riboswitches are elements located in the 5' untranslated region having the ability to regulate gene expression based on the binding of an ion or small molecule to its structure. This bachelor's thesis deals with the structure of the RNA aptamer of the yybP-ykoY riboswitch, where its three-dimensional structure is modeled using computer simulations, as this structure has not yet been experimentally prepared.
Key words:	Riboswitch, RNA, molecular dynamics
Number of pages:	54
Language:	Czech

Obsah

Úvod.....	7
1 Nukleové kyseliny.....	8
1.1 RNA.....	9
1.1.1 Vazby v RNA struktuře	9
1.1.2 Typy RNA	10
2 RNA přepínače.....	12
2.1 Objev RNA přepínačů	12
2.2 Struktura RNA přepínačů a jejich funkce	12
2.3 Identifikace metabolitu	14
2.4 Rozdělení RNA přepínačů.....	14
2.5 RNA přepínač <i>Lactococcus lactis</i> <i>yybP-ykoY</i>	16
3 Počítačové simulace	17
3.1 Molekulární dynamika	17
3.1.1 Potenciální energie.....	18
3.1.2 Silové pole	20
4 Praktická část	21
4.1 Příprava struktur	21
4.2 Analýza struktur	22
5 Výsledky a diskuze.....	24
5.1 Stabilita simulovaných struktur	24
5.2 Flexibilita struktury	27
5.3 Vzdálenost fosfátu	30
5.4 Stabilita simulací	35
Závěr.....	47
Summary	48
Seznam použitých zdrojů	49
Seznam obrázků	52
Seznam tabulek.....	54

Úvod

Nukleové kyseliny DNA a RNA jsou makromolekulární sloučeniny obsaženy v každé živé buňce. Jejich význam spočívá v uchování genetické informace. Ve většině živých organismů je DNA (deoxyribonukleová kyselina) uchovatelkou genetické informace, zatímco RNA tuto informaci přenáší. Existují i výjimky, jako jsou určité typy virů, kdy RNA (ribonukleová kyselina) uchovává genetickou informaci.

Ribonukleová kyselina se nachází ve virech, bakteriích a cytozomech. Podle její funkce se dělí na tři typy: mRNA, tRNA a rRNA. U bakterii v 5' netranslatované oblasti byly objeveny nekódující prvky. Tyto prvky jsou označeny jako RNA přepínače. RNA přepínače poskytují důležitou roli v regulaci exprese genů. Na základě navázání iontu do struktury RNA přepínače, dochází k dřívějšímu ukončení transkripce nebo translace. Jedním z RNA přepínačů je RNA přepínač *Lactococcus lactis* *yybP-ykoY*. Tato struktura byla vybrána pro mou bakalářskou práci na základě přidružených genů *yybP* a *ykoY*, které nejsou zcela prozkoumány.

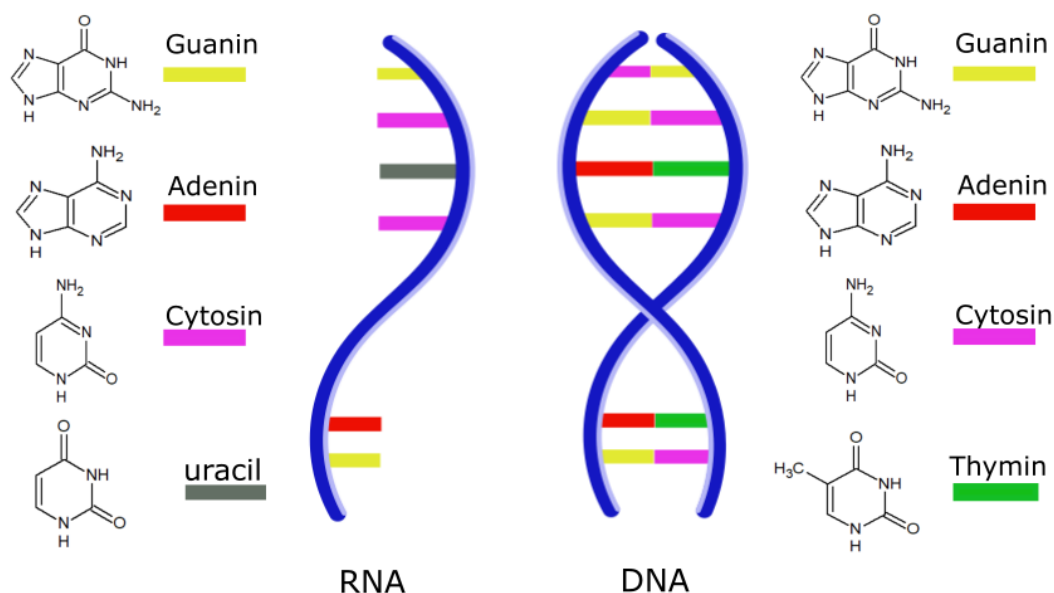
Trojrozměrné struktury RNA přepínače jsou zkoumány za pomoci počítačových simulací. Tato metoda poskytuje zobrazení struktury na atomární úrovni a v daném prostředí, které je námi zvolené. Pro detailnější prozkoumání struktury RNA přepínače je zvolena molekulová dynamika, která využívá principy klasické mechaniky.

Cílem mé bakalářské práce je připravit strukturu aptameru RNA přepínače *Lactococcus lactis* *yybP-ykoY*, pro navázání terminátoru. Pro tuto přípravu se spustí několik simulací, které budou sledovat chování struktury v čase při odebrání určitého množství bází ze struktury RNA přepínače a bude zkoumán vliv ligandů navázaných v aktivním místě, na celkové chování struktury.

1 Nukleové kyseliny

Nukleové kyseliny jsou makromolekulární látky, které se vyskytují ve všech živých organismech. Tyto látky jsou složeny z polynukleotidových řetězců. Jejich úkolem je uchovávat v sobě genetickou informaci, kterou následně zpracovávají a přenášejí. Nukleové kyseliny můžeme dělit na dva typy: RNA (ribonukleová kyselina) a DNA (deoxyribonukleová kyselina). Ve většině případů se v živých organismech nachází DNA. Výjimkou jsou některé typy virů, kde přenos genetické informace zprostředkovává RNA.[1]

Strukturu nukleových kyselin tvoří polynukleotidový řetězec, který je složen ze tří částí: fosfátového zbytku, cukru (pentózy) a dusíkaté báze. Tyto tři části tvoří základ každého řetězce neboli nukleotid. Mezi dusíkaté části patří pyrimidinové a purinové struktury. Pyrimidinové báze vytvářejí šestičlenný heterocyklus tvořen dvěma dusíkovými heteroatomy. Mezi tyto struktury řadíme cytosin (C), uracil (U) a thymin (T). Purinové báze se skládají z heterocyklu, který je tvořen dvěma cykly, zde patří adenin (A) a guanin (G). V obou typech kyselin se objevují cytosin, guanin a adenin. Thymin se objevuje ve struktuře DNA a uracil pak v RNA. Sacharidovou složkou obsaženou v nukleové kyselině je pentóza. V DNA struktuře ji tvoří 2- deoxy-D-ribóza. Ve struktuře RNA se jedná o D-ribózu. Rozdílem těchto dvou struktur je hydroxylová skupina na druhém uhlíku.[1]



Obrázek 1 Dusíkaté báze v RNA a DNA strukturách.

1.1 RNA

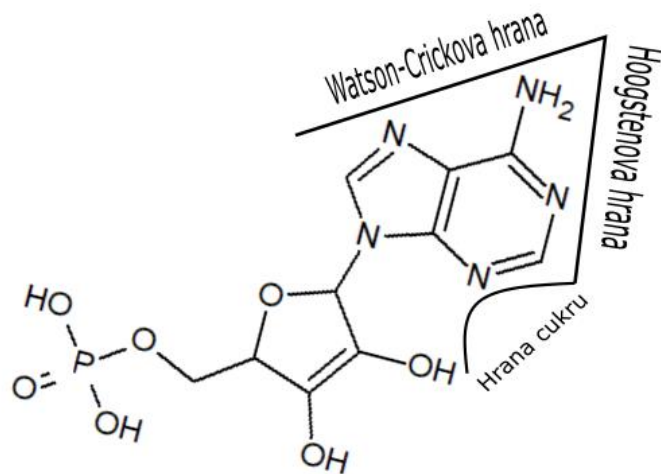
Ribonukleová kyselina neboli RNA se nachází v převážné části virů a bakterií a cytozomech. Jedná se o dipolymer podobný struktuře DNA. RNA je tvořena z nukleotidů, což je spojení D-ribózy, fosfátové části a dusíkaté báze. Tvoří většinou jednořetězovou strukturu, je však známo že dokáže vytvořit i dvouřetězovou strukturu (dvoušroubovici) neboli A-RNA.[2]

RNA byla objevena v roce 1886 švýcarským lékařem a přírodovědcem J. F. Miescherem, který zkoumal analýzu hnisu, kde našel směs nukleových kyselin (DNA a RNA). Několik dalších let bylo věnováno detailnějšímu prozkoumávání struktur obou nukleových kyselin. Existovaly domněnky, že se nacházejí pouze v rostlinných a živočišných buňkách. Až v 30. letech 20. století byla RNA detailněji popsána.[3]

1.1.1 Vazby v RNA struktuře

RNA se vyskytuje převážně jako jednořetězová nukleová kyselina. Ke vzniku dvoušroubovice dochází pomocí kanonického párování. Mezi kanonické párování řadíme Watson – Crickovo, které bylo objeveno ve 20.století, vědci Watsonem a Críkem. Ve struktuře dochází ke tvorbě spojení mezi purinových a pyrimidinových bází. Purinový adenin interaguje s pyrimidinovým thyminem a purinový guanin s pyrimidinovým cytosinem. Tento způsob párování se objevuje v molekule z 60 % až 70 %, ve zbylých procentech se jedná o další typy interakcí.[4]

Druhým typem je nekanonické párování dusíkatých bází, zde řadíme vazby s odlišným počtem vodíkových vazeb než u kanonického párování. RNA báze mají tři místa (hrany) pro vzájemná působení mezi bázemi. Tyto tři místa můžeme znázornit pomocí pravouhlého trojúhelníku. Odvěšny trojúhelníku znázorňují Watson-Crickovu hranu (Watson-Crick edge, WC) a hranu cukru (sugar edge), přeponou je znázorněna Hoogstenova hrana (Hoogsteen edge). Tyto interakce jsou pro lepší vizualizaci zobrazeny v obrázku č. 2. Každá ze tří hran nám může interagovat s jedním ze tří hran druhého „trojúhelníku“, tím nám vzniká 12 možných interakcí (rodin) mezi jednotlivými hranami. Tyto interakce se zobrazují dle metody Leontise a Westhofa.[5] Každé interakce pak má své specifické označení.[4]



Obrázek 2 Struktura interakcí v RNA.

1.1.2 Typy RNA

RNA se dělí na tři základní typy: mediátorová RNA, transferová a ribozomová RNA. Jejich odlišnost je ve struktuře, velikosti a v jejich funkcích při proteosyntéze, kde každá z nich hraje důležitou roli. Všechny tyto typy RNA jsou vytvářeny při transkripci a nepodléhají translaci, výjimkou je mRNA, která jako jediná podléhá translačním procesům.[1]

Mediátorová RNA

Mediátorová RNA (mRNA) byla izolována roku 1956, vědci E. Folkinem a L. Astrachanem. Pojmenována byla až o několik let později roku 1961 J. Mohamedem. Název messenger neboli mediátor (můžeme se setkat i s názvem informační RNA) vznikl podle jeho účelu v cytozomech, kde přenáší genetické informace. V buňkách ribonukleových kyselin se mRNA nachází v obsahu asi 5-10 %.[1]

Primární předpis u eukaryot se označuje jako pre-mRNA. Tento předpis je nadále upravován před následnou transkripcí, kdy je odštěpena nekódující sekvence (intron) od kódující sekvence (exon). Mediátorová RNA má za úkol určit správné navázání aminokyselin k peptidovému řetězci. Stanovení správného navázání a pořadí aminokyselin určují kodony. Jedná se o trojici tvořenou nukleotidy. Každý kodon při translaci kóduje jen jednu konkrétní aminokyselinu. Existuje minimálně 20 odlišných kodonů.[6][7]

Transferová RNA

Transferová RNA (tRNA) je malá molekula, která se skládá průměrně z 80 nukleotidů. Tato molekula se vytváří během transkripce stejně jako mRNA a rRNA. Její strukturu tvoří dvě ramena, které jsou na sebe kolmé. Toto seskupení vypadá jako jetelový list, který je zahnutý do písmene L. V obou ramenech se nachází dvouhelikální závit. Struktura je stabilizována pomocí patrových interakcí mezi aromatickými cykly a vedlejšími bázemi. Zastoupení tRNA tvoří 10-15 % z celkové RNA[6]

Funkce transferová RNA je přenos potřebné aminokyseliny do polypeptidů. Aminokyseliny jsou navázány v tRNA na 3'hydroxylový konec. Jedná se o vysoce energetickou vazbu, což znamená, že struktura je velmi reaktivní. Tento typ RNA se skládá ze dvou částí: antikodonová smyčka (antikodonové rameno) a akceptorové rameno pro aminokyselinu. Přičemž v antikodonové smyčce se nachází tzv. antikodon (trojice bází doplňková k určitému kodonu mRNA).[6]

Ribozomová RNA

Nejvíce zastoupenou složkou RNA je ribozomová RNA (rRNA), která tvoří až 80 % buněčné RNA. Existuje více forem rRNA, které jsou zejména odlišné svou velikostí. Ribozomová RNA se nachází jako součást ribozomů při proteosyntéze. Tato složka bývá součástí katabolických procesů spolu s RNA-polymerázou. Ribozomová RNA stejně jako tRNA a mRNA vznikají během transkripce, a nepodléhá translaci[6]

2 RNA přepínače

RNA přepínače neboli z anglického překladu riboswitches jsou nekódující prvky objevující se v bakteriálních mRNA v 5'-netranslatované oblasti. Jedná se o elementární biomolekuly, které dokážou navázat malé molekuly nebo ionty, do své struktury, v podobě ligandů.[8] Jejich hlavním úkolem je ovládat expresi genu na základě rozdílné koncentrace ligandů. Tato schopnost, rozlišení koncentrace, způsobuje dřívější ukončení transkripce nebo translace.[9]

2.1 Objev RNA přepínačů

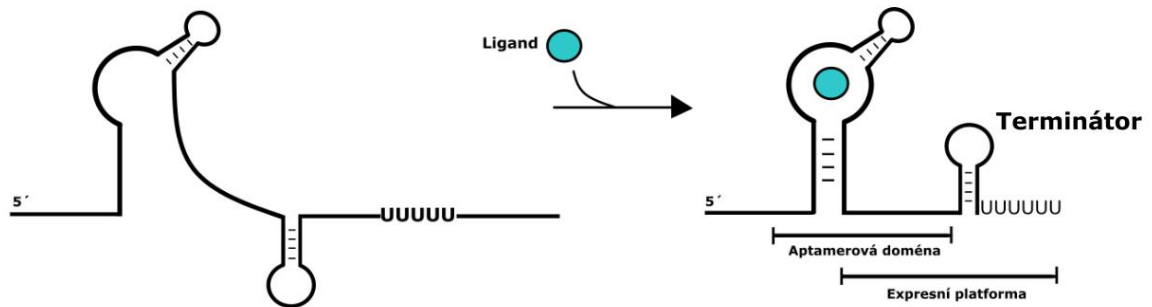
Před nalezením prvního RNA přepínače, bylo vytvořeno několik RNA aptamerů za pomoci in vitro revoluce, které byly následně zkoumány. První RNA přepínač byl objeven až v roce 2002 a to u bakterií, kde byly tyto molekuly nalezeny jako RNA molekulární senzory. Důkaz o existenci RNA přepínačů byl proveden na třech derivátech vitamínů AdoCbl, thiamin pyrofosfát (TPP) a flavin mononukleotid. Na těchto derivátech byla dokázána přímá interakce s mRNA, za příčiny kontroly vitamínů B1, B2 a B12. Tento objev zřetelně ukázal na fakt, že vazba metabolitu stabilizuje uspořádání mRNA senzoru a detekuje komponování nekonzervované mRNA části, čímž přispívá ke vzniku konstrukce, která má vliv na určení konce transkripce nebo translace. Tohle je důvodem, proč přímá vazba mezi metabolity a RNA má vliv na přepínání ribozomu mezi dvěma RNA konformacemi, což má vliv na expresi genů. [10]

Do současnosti bylo objeveno několik desítek tříd RNA přepínačů. Nově objevené třídy dokážou interagovat s koenzymy, nukleobázemi nebo jejich deriváty a aminokyselinami. Teorie ukazuje, že novodobé RNA přepínače by mohly být následníci starověkých RNA přepínačů. Pokud by se tato teorie potvrdila, mohlo by to znamenat, že funkce, které RNA přepínačům pomáhají, aby mohly zrcadlit vlastnosti a funkce RNA senzorů, se nacházely již ve světě RNA.[11]

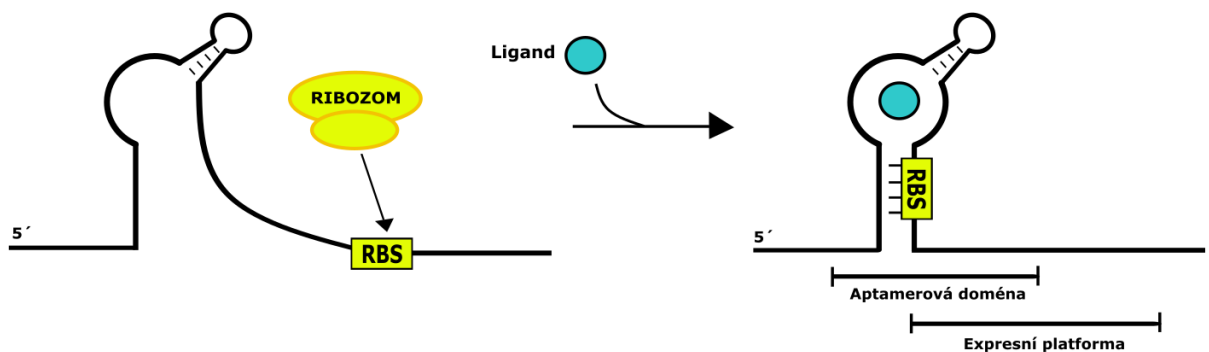
2.2 Struktura RNA přepínačů a jejich funkce

RNA přepínače se skládají ze dvou částí – domén (aptamerová doména a expresní platforma) (obrázek č. 3 a č. 4). Každá z domén má pak svou vlastní funkci ve struktuře RNA přepínače. Aptamerová doména funguje jako snímač ligandů.

Ligand se naváže do struktury aptamerové domény do tzv. kapsy. Pomocí navázaného ligandu se určují jednotlivé kategorie RNA přepínačů. Jako většina příjemců ligandů, musí rozeznávat jednotlivé metabolity, které mají podobné chemické vlastnosti a vysokou selektivitu. Díky schopnosti rozeznávat jednotlivé metabolity, může poskytnout správnou regulační odpověď. [12]



Obrázek 3 Regulace transkripce pomocí RNA přepínače. Pokud RNA přepínač nemá ve své struktuře navázaný ligand, probíhá děj transkripce. Po navázání iontu je do jeho struktury se vytvoří terminátor a dochází k ukončení transkripce



Obrázek 4 Regulace translace pomocí RNA přepínače. Když v RNA přepínači není navázan iont, tak vazebné místo (RBS) se stává přístupné pro navázání ribozomu. Pokud však ve struktuře RNA přepínače je navázan iont, dochází k izolaci RBS a ribozom není schopen se do vazebného místa navázat.

V několika studiích analýzy RNA přepínačů bylo zjištěno, že struktura aptamerových domén je podobně vystavěna jako u mnoha jiných větších RNA systémů. Aptamerová doména purinového RNA přepínače, patří mezi nejelementárnější struktury aptamerů, je složena ze tří částí P1, P2, P3. Tyto tři části se objevují ve všech objevených typech RNA přepínače.[13]

Na rozdíl od aptamerové domény, expresní platforma kontroluje genovou expresi. Expresní doména se nachází většinou vedle aptamerů, kde vyhodnocuje, jak se váže ligand na aptamerovou doménu.

V expresní platformě můžeme najít přepínač, který je na rozhraní s transkripčním a translačním mechanismem. Společná část obou domén je pojmenována jako přepínací oblast. Pomocí této oblasti se reguluje skládání RNA.[8]

2.3 Identifikace metabolitu

RNA přepínače dokážou chemicky rozpoznat různé typy ligandů, aniž by měly zakódovanou funkci, jak tyto ligandy od sebe rozeznat. Pozorujeme však několik společných rysů k navázání metabolitu. Jedním z nich je pomocí vazebného místa. Mnoho RNA přepínačů tvoří ve struktuře tzv. kapsu neboli vazebné místo, kde se naváže metabolit (ligand). Uvnitř těchto vazebných míst se nachází malé ligandy, které jsou zapouzdřené uvnitř „kapsy“. Tyto místa jsou ohraničeny nekanonickými páry bází a nukleotidů.[14]

Téměř všechny typy ligandů se spoléhají na funkci heteroatomů, pro tvorbu vodíkových vazeb a elektrostatických interakcí s RNA. Vodíkové vazby přitom dokážou interagovat s okraji ligandů a nepárových nukleotidů ribonukleové kyseliny. Interakce ligand s RNA jsou způsobeny kationty kovů Mg^{2+} a K^+ . Tyto kationty také mohou kompenzovat negativní náboj ligandu i jeho funkčních skupin.[14]

Poznatky z pozorování komplexu mezi RNA přepínači a ligandy byly doplněny informacemi z rentgenových snímků struktury RNA přepínačů. Tyto záznamy poukázaly na fakt, že RNA přepínače dokážou do své struktury navázat ligandy pomocí kombinací dvou mechanismů. Prvním z mechanismů je konformační selekce. Struktura se přeskupí pomocí tohoto mechanismu do tzv. předem složeného stavu. Tento stav je pak následně stabilizován pomocí ligandu. Druhým typem je mechanismus indukovaného přizpůsobení. Na rozdíl od prvního typu mechanismu, tento typ váže ligand na rozloženou konformaci.[14]

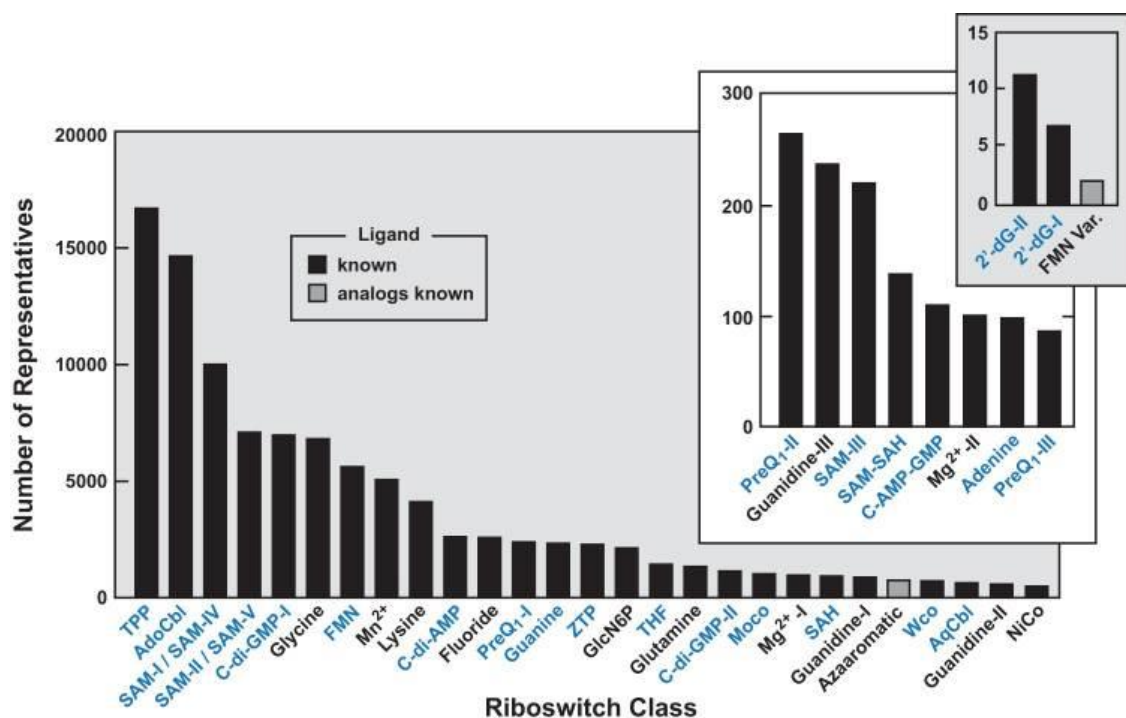
Zajímavostí RNA přepínačů je, že za určitých podmínek mohou přijímat metabolit, který má odlišnou koncentraci. Dále se mohou zúčastnit kinetických a termodynamických procesů, během kterých buď vzniká či nevytváří rovnováha mezi RNA a ligandem.[10]

2.4 Rozdělení RNA přepínačů

Od prvních zpráv z roku 2002, kdy byl objeven první RNA přepínač, se objevilo mnoho dalších. S nabývajícím počtem nových RNA přepínačů, bylo nutné je klasifikovat

do jednotlivých tříd. Rozdělení bylo provedeno v závislosti na jejich struktuře, ale i vlastnostech jednotlivých RNA přepínačů. V roce 2017 bylo objeveno 40 rozdílných tříd, které byly potvrzeny experimentálně. Podle předpokladů vědců Phillipa J. McCowna, Keitha A. Corbina a spol. by mělo existovat až tisíce odlišných tříd RNA přepínačů, které doposud nebyly nalezeny.[15]

K nejrozšířenějším třídám jsou přiřazeny třídy RNA přepínače, které jsou schopny vnímat a regulovat koenzymy a tzv. poslové (messenger riboswitch). Konkrétním příkladem je zastoupení třídy fluoridových RNA přepínačů a thyamin pyrofosfátové (TPP) třídy RNA přepínače. Tyto dva typy RNA přepínačů se objevují v bakteriích rodu *archaea*, a některých druzích hub, rostlin a řas. Toto sledování vede k poznatkům, že první RNA přepínače musely existovat již v RNA světě. Tento poznatek však doposud nebyl dokázán. Důvodem je, že nelze přesně dopátrat k prvnímu RNA přepínači, který by byl pro všechny předchůdcem. Jednotlivé zastoupení tříd můžeme vidět na obrázku č. 3.[15]

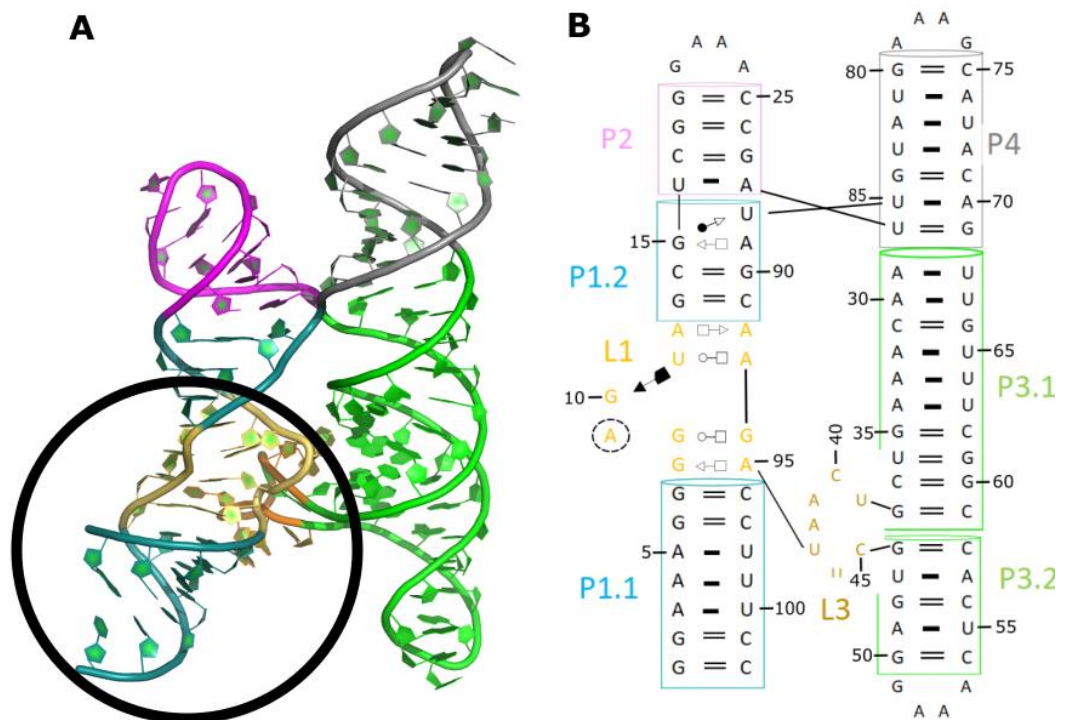


Obrázek 5 Četnost jednotlivých tříd riboswitchů [15]

I přes velké množství technik se nepodařilo některé RNA přepínače prozkoumat natolik, aby mohly být přiřazeny k jednotlivým třídám. Těmto typům RNA přepínačů byl dán název „sirotci“ z anglického překladu orphan. Jedním ze sirotek je skupina RNA přepínačů pojmenována jako *yybP-ykoY*. Tato třída patří k jedním z nejrozšířenějších skupin ve třídě sirotek, přesto tato skupina není označena jako třída. Důvodem zařazení k třídě sirotek je neprozkoumaná oblast jeho genů *yybP* a *ykoY*. [16]

2.5 RNA přepínač *Lactococcus lactis* *yybP-ykoY*

V mé bakalářské práci se zabývám strukturou RNA přepínače: *Lactococcus lactis* *yybP-ykoY* (obrázek č. 6). Jeho strukturu lze dohledat v Proteinové datové bance pod kódem PDB ID: 4y1I.[16] Tento RNA přepínač je charakterizován jako transkripční RNA přepínač, kdy jeho funkce závisí na afinitě k Mn^{2+} iontu. Struktura RNA přepínače je složena ze dvou koaxiálních dvoušroubovic, které jsou spojeny tzv. čtyřcestným spojem (z anglického překladu four-way junction). Ve struktuře *yybP-ykoY* se nachází dvě vazebná místa pro ionty, označujeme tyto vazebná místa jako M_A a M_B . Vazebné místo M_A je ve tvaru oktaedru, které se skládá z pěti fosforylovaného kyslíku a z části smyčky L1 (G7, G8, A9) a L3 (U39, C45). Toto vazebné místo preferuje především Mg^{2+} ion. Vazebné místo označeno jako M_B je stejně jako M_A místo koordinováno do tvaru oktaedru. Struktura tohoto místa je složena z dusíku (N7), který se nachází v adenosinu (A41) umístěném v části L3. Další části vazebného místa jsou atomy kyslíku z G8, U39, C40, U44 A C45. Ve vazebném místě M_B se váže Mn^{2+} iont. [16].



Obrázek 6 A) Zobrazení 3D struktury RNA přepínače *yybP-ykoY*. Zvýrazněná je část, kterou se zabývám v mé bakalářské práci. B) Zobrazení párování v 2D struktuře RNA přepínače *yybP-ykoY* dle Leontise a Westhofa.[5]

3 Počítačové simulace

Počítačové simulace tvoří značnou část nejen teoretické chemie, ale slouží i pro výpočty ve fyzice a dalších vědních oborech. V dnešní době, kdy technika se stále vyvíjí a přináší nám další možnosti, lze sledovat pomocí počítačových simulací struktury biomolekul a jejich chování v daném, námi zvoleném, prostředí. Velmi výhodným aspektem počítačových simulací je trojrozměrné zobrazení na atomární úrovni, což nám poskytuje veškeré detaily o zkoumané struktuře. Při správném použití této techniky, lze počítačové simulace použít jako doplněk k experimentálním metodám, případně k ověření již známých výsledků.[17]

Při sledování molekulárních struktur využíváme dva typy mechaniky, a to kvantovou nebo klasickou. Jejich rozdílem je přesnost a s ní spojená technická náročnost. Pro systémy, které jsou popsány pomocí klasické mechaniky obvykle platí, že jsou méně technicky obtížné, což nám dovolí počítat i daleko větší systémy než u kvantové mechaniky, ale výsledky jsou méně přesné. Naopak přesnější kvantová mechanika se pro svou náročnost používá pro menší systémy.[18]

3.1 Molekulární dynamika

Molekulová dynamika je jedním z metod počítačových simulací, která využívá principy klasické mechaniky. Velmi často se využívá i u velkých biomolekul. Simulace založené na molekulové dynamice používají Newtonovy zákony, tj. zákon setrvačnosti, zákon síly a zákon akce a reakce. Rovnice č. 1 je jedna z Newtonových pohybových rovnic, která nám zobrazuje sílu F působící na částice, m_i představuje hmotnost částice, a_i zrychlení částic, r je označení pro polohový vektor a písmenem t je označen čas.

$$F_i = m_i a_i = m_i \frac{dv_i}{dt} = m \frac{d^2 r_i}{dt^2} \quad (1)$$

Pro zjednodušení molekulové dynamiky se využívá Born-Oppenheimerova aproximace. Tato teorie je založena na faktu, že jádra atomů jsou několikanásobně těžší než samotné elektrony. Lze tedy sledovat pohyb jádra za předpokladu, že elektrony budou jádro následovat s velkou rychlostí. V rámci této aproximace, můžeme oddělit elektrony od jádra a atomy znázornit ve tvaru koule.

Následně atom jako koule je definováno dvěma parametry: parciálním nábojem a van der Waalsovým potenciálem, přičemž van der Waalssův potenciál nám značí poloměr koule a parciální náboj je v jejím středu. Vazba je definována jako model pružiny s určitou délkou a tuhostí. Lze tedy říct, že molekuly (koule s určitým nábojem) jsou spojeny pomocí pružin. energii systému tvořeného z atomů je definována pomocí souřadnic jednotlivých atomů. (rovnice č. 2)

$$E = f(R) \quad (2)$$

3.1.1 Potenciální energie

Potenciální energie charakterizuje popis mezi strukturou a energií. V předložené práci je potenciální energie vyjádřena parametricky pomocí programového balíčku AMBER. V tomto programovém balíčku jsou vypočteny veškeré vazebné a nevazebné interakce mezi atomy. Nevazebné interakce se vyjadřují pomocí dvou interakcí: van der Waalsovy (vdW) a Coulombické (Coulomb). Vazebné interakce jsou vyjádřeny pomocí tří funkcí: a to délky vazby, vazebným úhlem a torzním úhlem. Celkovou potenciální energii lze vyjádřit jako suma vazebných a nevazebných interakcí:

$$E = \sum E_{vazba} + \sum E_{úhel} + \sum E_{torze} + \sum E_{vdW} + \sum E_{Coulomb} \quad (3)$$

Jednotlivé části potenciální energie lze vypočítat pomocí jednoduchých funkcí. Energie vazby je definována dle rovnice č. 4, která vychází z popisu harmonického oscilátoru.

$$E_{vazba} = \sum K_r (r - r_0)^2 \quad (4)$$

Písmeno r označuje vzdálenost vazeb mezi jednotlivými atomy, r_0 je označení pro ideální vazebné vzdálenosti, které byly získány z experimentálních metod nebo pomocí kvantově chemických metod. K_r je konstanta tuhosti vazby, která byla také získána z experimentálních případně z kvantově chemických metod.

Vazebné úhly jsou definovány velmi podobně jako energie vazby. Tuto definici nám znázorňuje rovnice č. 5.

$$E_{úhel} = \sum K_\alpha (\alpha - \alpha_0)^2 \quad (5)$$

Podobně jako v rovnici č. 4 nám písmeno α značí vazebný úhel, písmeno α_0 je označení pro ideální vazebný úhel, který byl pomocí experimentálních a kvantově chemických metod. K_α je označení pro silovou konstantu vazebného úhlu, která byla taktéž získána pomocí experimentálních nebo kvantově chemických metod.

Energie torzních úhlů je dána rovnicí č. 6. Toto vyjádření je stanoveno jako superpozice několika funkcí.

$$E_{torze} = \sum_{torze} \sum_n \frac{E_n}{2} (1 + \cos(n \varphi - \varphi_{n0})) \quad (6)$$

Označení φ je pro vazebnou torzi, φ_{n0} představuje fázový posun v n-té periodě, E_n je označení pro výšku potenciální bariéry v n-té periodě, písmeno n je pak označení pro periodu jedné konkrétní harmonické složky.

Nevazebná interakce, která je započtena v celkové potenciální energii je Coulumbova interakce. Tato interakce je vyjádřena pomocí Coulumbova zákona (rovnice č. 7).

$$E_{Coulomb} = \sum_{i < j} \frac{q_1 q_2}{4\pi \epsilon_0 r_{ij}} \quad (7)$$

$E_{Coulomb}$ vyjadřuje poměr mezi parciálními náboji $q_1 q_2$ a permitivitě vakua ϵ_0 a vzdálenosti r_{ij} atomů

Posledním příspěvkem v rovnici pro potenciální energii jsou van der Waalovy (vdW) interakce. Tyto interakce se spolu s Coulumbovými interakcemi řadí i k nevazebným interakcím a jsou popsány pomocí Lennard-Jonesova potenciálu (rovnice 8).

$$E_{vdW} = \sum_{i < j} 4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad (8)$$

Znak ε_{ij} je označení pro hloubku potenciálové jámy, σ_{ij} je označení pro vzdálenost mezi dvěma atomy, přičemž potenciální energie se rovná nule, r_{ij} je označení pro vzdálenost mezi dvěma atomy. [17]

3.1.2 Silové pole

Výběr silového pole hraje velmi důležitou roli pro molekulové simulace. Silové pole udává veškeré informace o vazbách, nevazebných interakcích a vazebných úhlech mezi jednotlivými atomy ve struktuře a poskytuje informace pro výpočet potenciální energie. Tyto definované parametry jsou většinou získané z *ab initio* nebo jsou odvozeny z provedených experimentů.[19] Mezi nejpoužívanější silové pole patří AMBER[26] a CHARMM[20]. Pro tuto bakalářskou práci použit programový balíček AMBER.

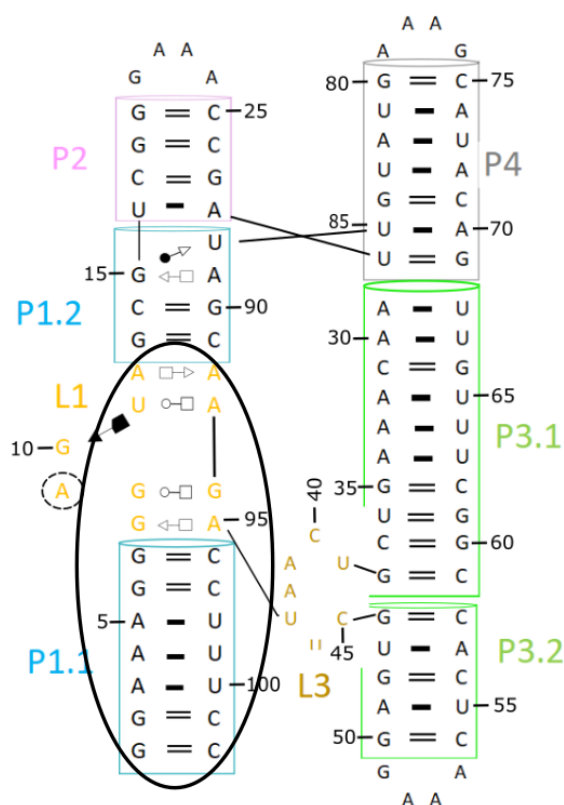
4 Praktická část

4.1 Příprava struktur

Pro tuto bakalářskou práci byla použita struktura *Lactococcus lactis* yybP-ykoY Mn²⁺ RNA přepínače s navázaným Mg²⁺ iontem. Tato struktura byla stažena z PDB databáze pod kódem PDB ID: 4y1I.[16] Popis této struktury najdete v podkapitole 2.5 RNA přepínač *Lactococcus lactis* yybP-ykoY. V této práci byla studována struktura RNA přepínače upravena do celkem 22 různých struktur za pomoci programu Pymol. Ze struktury stažené z databáze byly postupně odstraňovány jednotlivé nukleové báze z 3' konce (viz obrázek č. 7). Tedy první startovací struktura obsahovala kompletní RNA přepínač včetně horečnatého iontu, následující struktura byla o jednu nukleovou bázi kratší, konkrétně byl odstraněn cytosin 102 (C102). Celkem bylo odstraněno deset bází, včetně adeninu 93 (A93) viz tabulka č.1. Následně bylo vytvořeno ještě 11 struktur, u kterých byl hořečnatý iont nahrazen draselnými ionty.

Tabulka 1 Název struktury, která byla upravována a konkrétní počet odstraněných nukleotidů.

Název struktury	Počet odstraněných nukleotidů
4y1i	0
4y1i_1	1 (C102)
4y1i_2	2 (C102-C101)
4y1i_3	3 (C102-U100)
4y1i_4	4 (C102-U99)
4y1i_5	5 (C102-U98)
4y1i_6	6 (C102-C97)
4y1i_7	7 (C102-C96)
4y1i_8	8 (C102-A95)
4y1i_9	9 (C102-G94)
4y1i_10	10 (C102-A93)



Obrázek 7 Zde na tomto obrázku je černým kruhem vyznačená oblast, kde byly odstraněny nukleotidy z RNA přepínače.

Všechny připravené struktury (22 struktur) byly doplněny o vodíky a dále zasolvány pomocí programu tLeap, který je součástí programového balíčku AMBER, za vzniku oktaedrálního boxu vody a byly přidány K^+ ($r = 1,590 \text{ \AA}$, $\epsilon = 0,2795 \text{ kcal/mol}$)[21] a Cl^- ($r = 2,760 \text{ \AA}$, $\epsilon = 0,0117 \text{ kcal/mol}$)[21] o celkové koncentraci 150 nM. Pro výstavbu boxu vody byl použitý model vody OPC.[22] Vzdálenost mezi stěnou boxu a strukturou činila 10 \AA . Pro solut bylo použito silové pole OL3[23][24][25] s modifikací van der Waalsových parametrů atomů kyslíku od Case et. al[26]. Také byl aplikován externí potenciál gHBfix [27] ovlivňující stabilitu vodíkových vazeb s následujícím nastavením: síla NH-N a NH-O vazby byla zvýšena o 0,5 kcal/mol a síla vodíkové vazby OH-nbO a OH-bo byla snížena o -0,5 kcal/mol.

Upravené struktury byly následně před samotnou dynamikou minimalizovány a ekvilibrovány za použití standardního ekvilibračního protokolu. V prvním kroku byly provedeny minimalizace atomu vodíku, následně v druhém kroku proběhla minimalizace samotné vody. Během tohoto procesu se samotná struktura RNA přepínače neměnila. Po ustálení prvních dvou kroků, následovala samotná minimalizace RNA přepínače, která byla provedena v několika krocích. Po relaxaci byl systém následně zahříván na teplotu 298,16 K. Poté proběhla samotná dynamika v časovém rozmezí 1 μs . [28]

4.2 Analýza struktur

Provedené simulace byly analyzovány pomocí programu cpptraj, který je obsažen v balíčku AMBER, kde byly odstraněny molekuly vody pro následnou vizualizaci, vypočítány RMSD hodnoty, B-faktory a vzdálenosti mezi jednotlivými fosfáty v aktivním místě RNA přepínače. Následně byly jednotlivé simulace vizualizovány pomocí programu Pymol. Dále byl použit program Gnuplot pro vytvoření grafů, popisy jednotlivých grafů byly vytvořeny v programu Inkscape.

Pro analýzu struktur byla změřena hodnota RMSD. RMSD (ang. root-mean-square deviation) neboli v překladu střední odchylka kvadratické hodnoty. Tento parametr nám udává, jak moc se systém změnil od referenčního stavu, tj. můžeme například určit, zda je systém stabilní či nikoliv. Lze jej definovat pomocí rovnice (rovnice č.9).[29]

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N |w_i - v_i|^2} \quad (9)$$

Znak N je označení pro počet atomů, w_i udává polohové vektory pro atomy srovnávané struktury a v_i je označení pro polohové vektory stejných atomů jako w_i , ale v počátečním stavu.

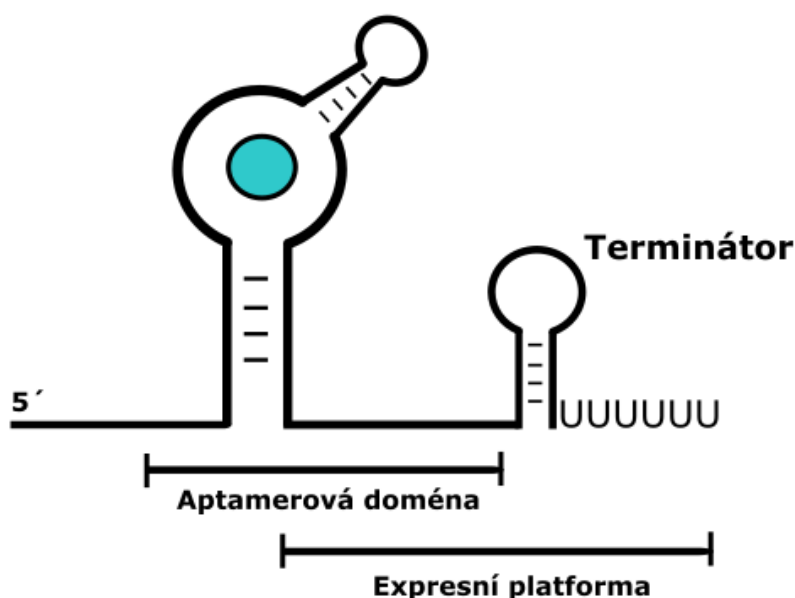
Dalším hodnotícím parametrem je B-faktor. B-faktor nebo také teplotní B-faktor, někdy zvaný jako Debye-Waller faktor, což je hodnota, která nám udává dynamickou pohyblivost atomu během simulace. Tento parametr nám popisuje vztah:

$$B = 8\pi^2 \langle u^2 \rangle \quad (10)$$

Parametr $\langle u^2 \rangle$ nám udává střední kvadratické posunutí od průměrné polohy. Hodnota B-faktoru se měří v Å. Pokud hodnoty B-faktoru jsou nízké, značí to o tom, že struktura nebo část struktury je méně pohyblivá a stabilní. Naopak, pokud jsou hodnoty B-faktoru velmi vysoké jedná se o velmi pohyblivou strukturu či její část.

5 Výsledky a diskuze

Cílem této bakalářské práce bylo připravit stabilní strukturu RNA přepínače *yypP-ykoY* pro následné navázání další části (terminátoru) ke struktuře (viz obrázek č. 8). Pro tuto přípravu byly využity počítačové simulace, celkem bylo spuštěno 22 simulací. Všechny simulace byly nejprve analyzovány vizuálně za pomoci programu Pymol (tabulka č. 2 a č. 3). Následně byly využity programy pro výpočet RMSD, B-faktorů a vzdálenosti mezi jednotlivými fosfáty ve vazebném místě.



Obrázek 8 Schematické navázání terminátoru na aptamerovou doménu

5.1 Stabilita simulovaných struktur

Prvním krokem analýzy byla vizuální kontrola, kdy za pomoci programu Pymol bylo sledováno hlavně chování částí, které byly odstraněny vazební partneri. Zaměřili jsme se také na to, zda v průběhu simulace nedochází k nestandardnímu chování přepínače v důsledku chybějící části. Dalším krokem analýzy byla kontrola jednotlivých patrových interakcí. Sledovali jsme jejich chování a vytváření nových interakcí v průběhu simulace. Zaměřili jsme se hlavně na to, zda jednotlivé báze byly seřazeny pod sebou stejně, jako v původní struktuře. Třetím parametrem, který byl sledován bylo, zda nedošlo k vytvoření nových interakcí. Vše výše zmíněné přehledně shrnuje tabulka č. 2 a č. 3.

Tabulka 2 Patrové a nově vytvořené interakce ve strukturách *yypP-ykoY* s navázaným iontem Mg^{2+}

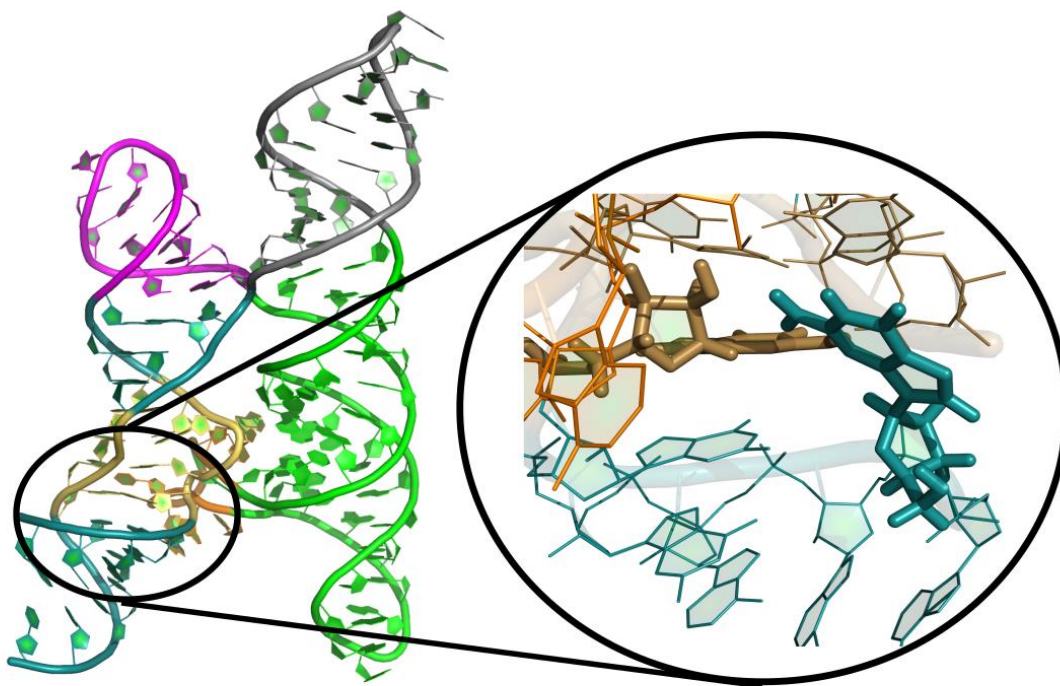
Název struktury	Navázaný iont	Stacking	Nová interakce
MD	Mg^{2+}	✓	/
MD1	Mg^{2+}	✓	/
MD2	Mg^{2+}	✓	/
MD3	Mg^{2+}	✓	/
MD4	Mg^{2+}	✓*	Vodíková vazba mezi G1 a částí P 1.1
MD5	Mg^{2+}	✓*	Vodíková vazba mezi G1 a částí P 1.1
MD6	Mg^{2+}	✓*	Vodíková vazba mezi G1 a částí P 1.1
MD7	Mg^{2+}	✗	Vodíková vazba mezi G1 a částí L1
MD8	Mg^{2+}	✗**	/
MD9	Mg^{2+}	✗	Vodíková vazba mezi G1 a částí L1
MD10	Mg^{2+}	✗	Vodíková vazba mezi G1 a částí P 1.1

✓ Patrové interakce v oblasti odstraněných částí jsou stejné jako v původní struktuře

✗ Patrové interakce v oblasti odstraněných částí zanikly

*Guanin (G1) se smyčky P1.1 vytvořil patrovou interakci s cytosinem (C96, u struktury MD5 s C95)

**Guanin (G1) z části P1.1 netvoří ideální patrovou interakci s navazujícím řetězcem P1.1



Obrázek 9 3D znázornění vodíkové vazby mezi G1 (modře označen) a smyčkou L1 (označeno žlutě)

Tabulka 3 Patrové a nově vytvořené interakce ve strukturách yybP-ykoY s navázaným iontem K⁺

Název struktury	Navázaný iont	Stacking	Nová interakce
MD	K ⁺	✓	/
MD1	K ⁺	✗	Vodíková vazba mezi G1 a částí P 1.1
MD2	K ⁺	✗	/
MD3	K ⁺	✗	Vodíková vazba mezi G1 a částí P 1.1
MD4	K ⁺	✗**	Vodíková vazba mezi G1 a částí P 1.1
MD5	K ⁺	✗	Vodíková vazba mezi G1 a částí P 1.1
MD6	K ⁺	✓	/
MD7	K ⁺	✓	/
MD8	K ⁺	✗**	Vodíková vazba v L1 části
MD9	K ⁺	✓	/
MD10	K ⁺	✓	/

✓ Patrové interakce v oblasti odstraněných částí jsou stejné jako v původní struktuře

✗ Patrové interakce v oblasti odstraněných částí zanikly

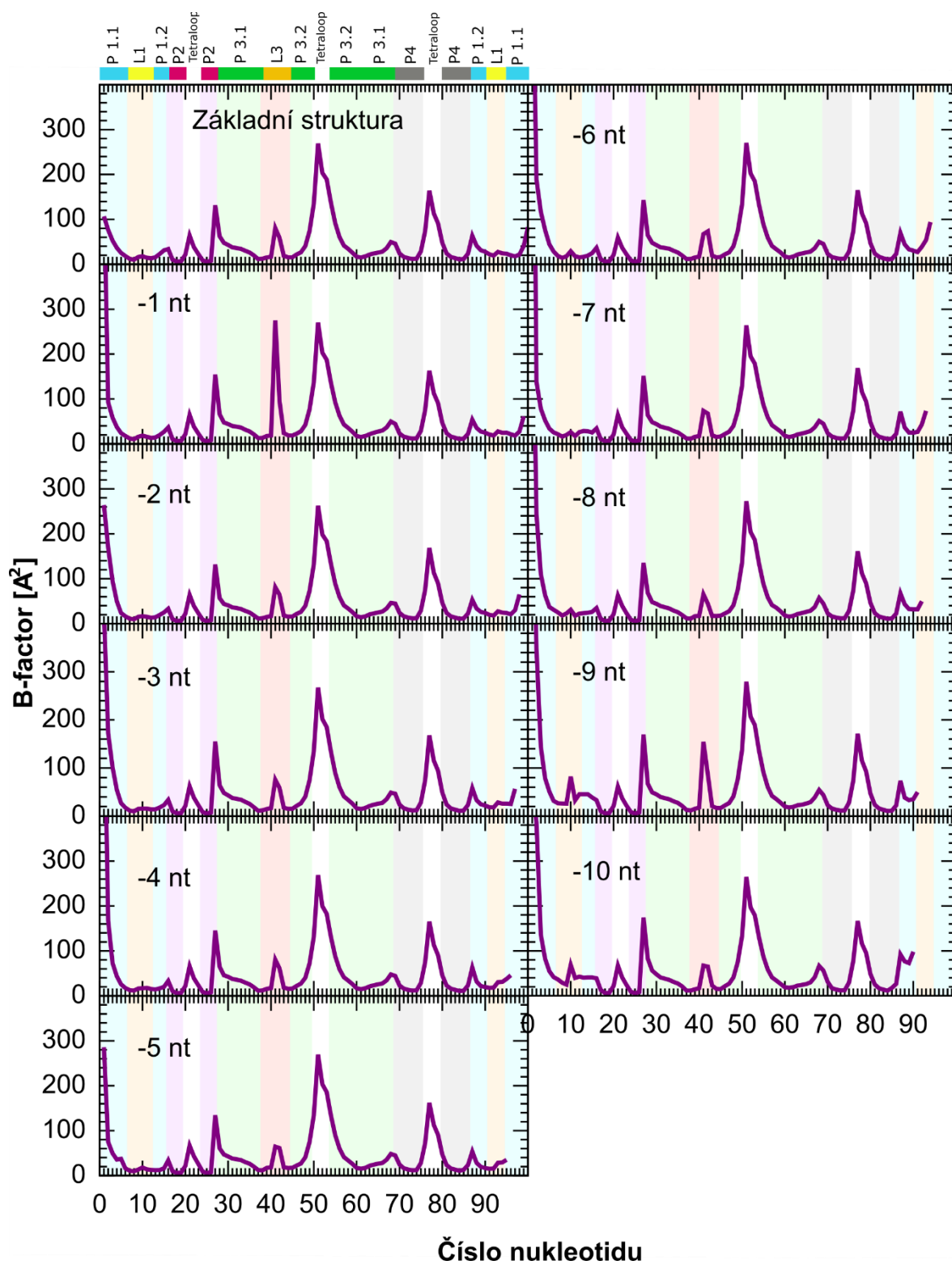
**Guanin (G1) z části P1.1 netvoří ideální patrovou interakci s navazujícím řetězcem P1.1

5.2 Flexibilita struktury

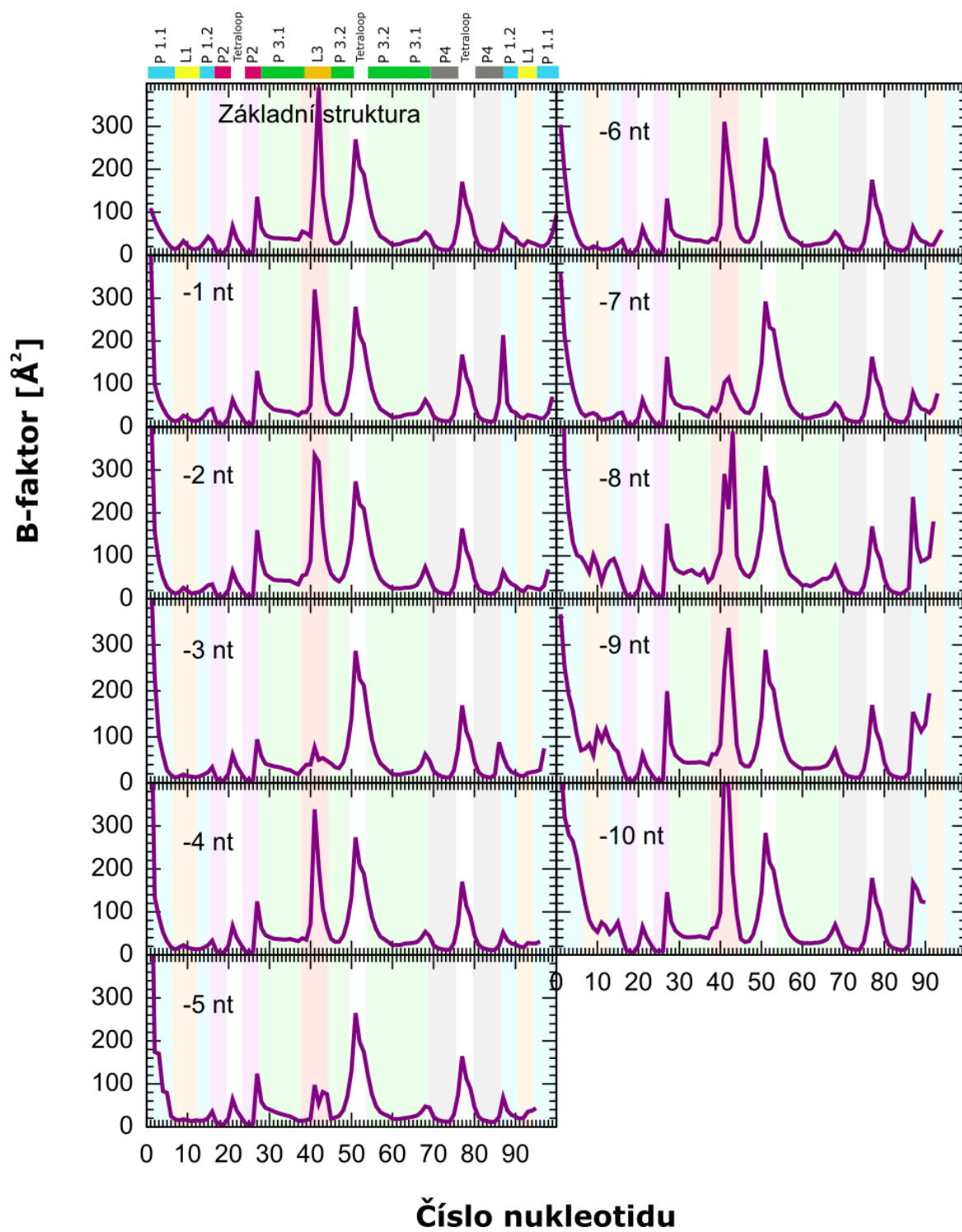
Pro všech 22 struktur byla spočítána hodnota B-faktoru, udávající míru flexibility struktury v průběhu simulace. Tento parametr byl vyneseno do grafu. Celkem bylo tedy vytvořeno 22 grafů, 11 grafů odpovídá strukturám, mající v aktivním místě hořčnatý iont (obrázek č.10) a 11 grafů strukturám, kde je navázán v aktivním místě draselný iont (obrázek č.11)

Z grafů pro RNA přepínač s Mg^{2+} iontem je vidět, že 5' konec je flexibilnější po odebrání jednoho a více nukleotidu, což značí vyšší hodnoty u křivky vlevo na obrázku č. 10 (hodnoty větší než 200 Å). Dalším faktem, který se dal očekávat je, že 3' konec, tj. konec ze kterého byly odebrány nukleotidy, také vykazuje vyšší míru pohyblivosti. Z grafů je také zřejmé, že po odstranění nukleotidů nedošlo ke zvýšení flexibility v ostatních částech RNA přepínače a všechny simulace vykazují podobnou pohyblivost (velikost B-faktorů) těchto částí, a tudíž odebrání bází neovlivnilo celkovou flexibilitu přepínače.

Z grafu pro RNA přepínač s K^+ iontem lze opět vidět, že 5' konec je flexibilnější po odebrání jednoho a více nukleotidu, hodnoty křivky vlevo na obrázku č.11 jsou větší než 200 Å. Dalším faktem je, že 3' konec, tj. konec ze kterého byly odebrány nukleotidy, také vykazuje vyšší míru pohyblivosti. Z grafů dále vyplývá, že po odstranění nukleotidů 1-7 nedošlo k zvýšení pohyblivosti v ostatních částech RNA přepínače. Po odstranění osmi nukleotidů došlo k nárůstu hodnot B-faktorů v oblasti L1 smyčky, což znamená větší míru flexibility. Tento nárůst je dán nestabilitou cukr-fosfátové páteře smyčky L1.



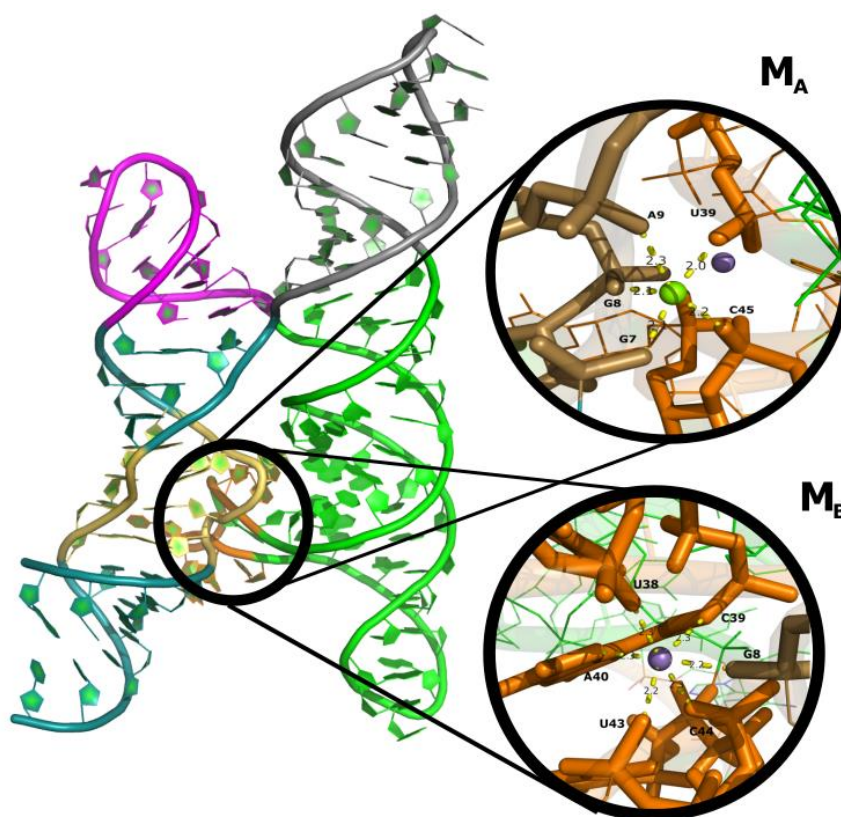
Obrázek 10 Zobrazení vypočtených B-faktorů pro struktury RNA přepínače s navázaným Mg^{2+} iontem.



Obrázek 11 Zobrazení vypočtených B-faktorů pro struktury RNA přepínače s navázaným K⁺ ionty.

5.3 Vzdálenost fosfátu

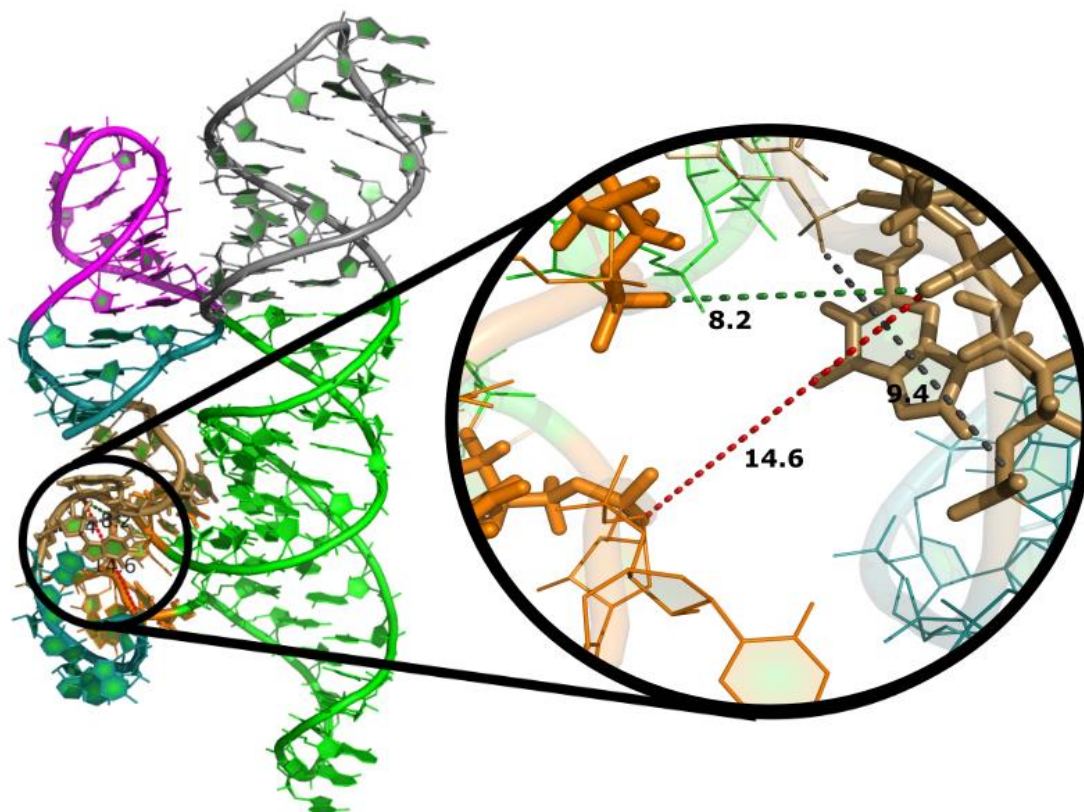
Tímto parametrem bylo sledováno, zda vazebná místa (viz obrázek č.12), po odebrání jednotlivých bází, jsou stabilní nebo dochází k jejich rozpadu. Pro 11 struktur RNA přepínače s K^+ bylo vytvořeno pomocí programu Gnuplot celkem 33 grafů. Pro strukturu RNA přepínače s Mg^{2+} nebyly vypočteny vazebná místa, jelikož z dřívějších studií je známo, že RNA přepínač s navázaným Mg^{2+} iontem je stabilní a nedochází ke změnám struktury vazebného místa. Toto bylo ověřeno vizuální inspekcí a u žádné z těchto simulací nedošlo k rozpadu aktivního místa. Některé simulace byly bohužel ukončeny již v 900 ns, což bylo zapříčiněno současnou situací s COVID19. Dá se předpokládat, že v posledních 100 ns by nedošlo ke změně výsledků.



Obrázek 12 Vazebné místa M_A a M_B

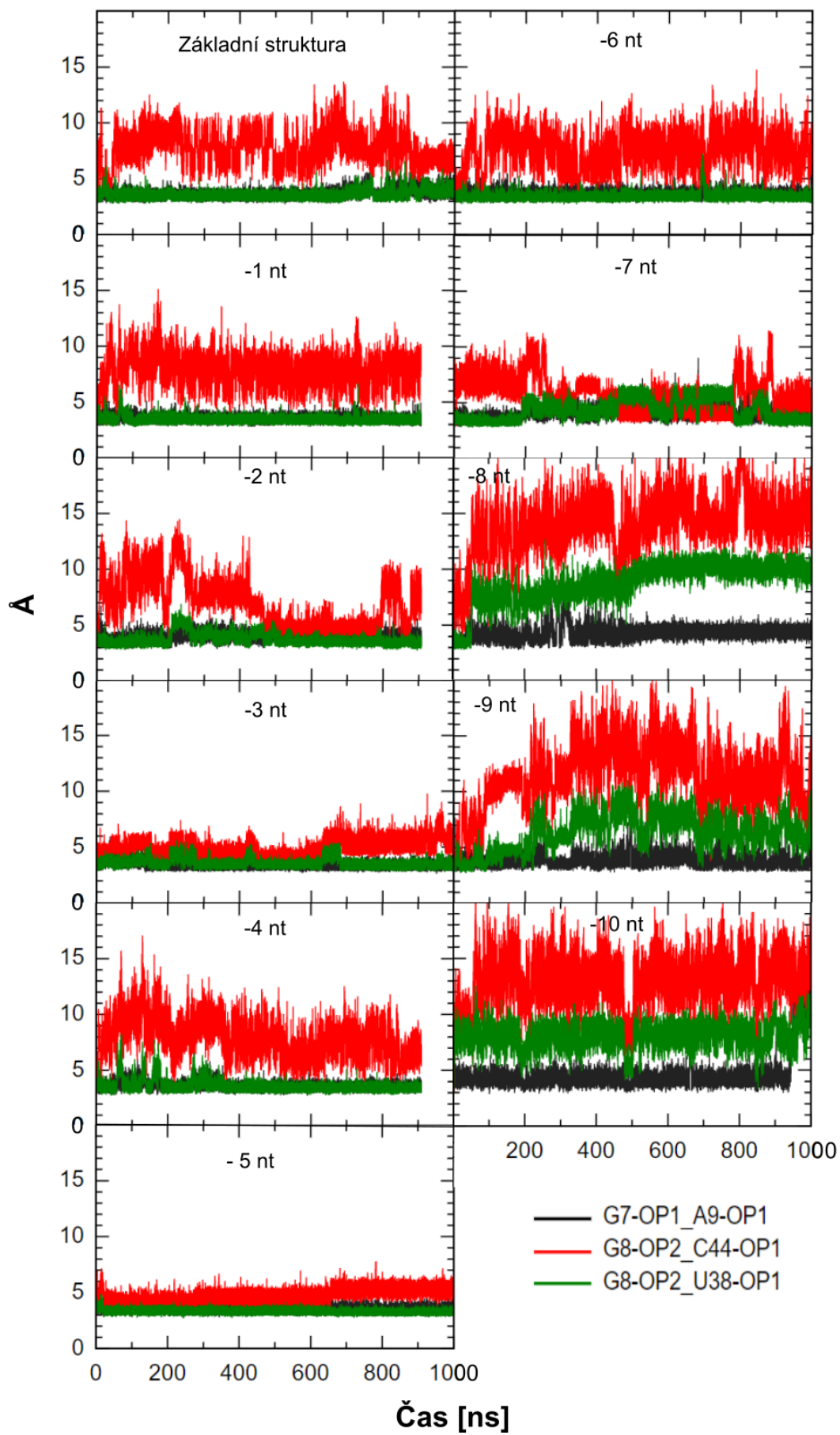
Grafy pro vazebné místo M_A ukazují, že fosfát navázaný na guanin (G7) a adenin (A9) je stabilní a nedošlo k jeho oddělení od vazebného místa, což je zřejmé z černé křivky na obrázku č.14. Dalším faktem je, že fosfát navázaný na C44 ve většině simulací byl oddělen od vazebného místa, tohle oddělení je dáno malou pevností vazby (červená křivka). K jeho oddělení nedošlo během simulace, kdy byly odebrány 3 nebo 4 báze (nukleotidy). Z grafů je také zřejmé, že dva fosfáty navázané na G8 a U38 jsou pevně vázány.

K jejich oddělení z vazebného místa dochází až po odstranění 8 a více nukleotidů (zelená křivka). Po odebrání 10 nukleotidů se vazebné místo zcela rozpadá, což lze vidět na obrázku č.13.

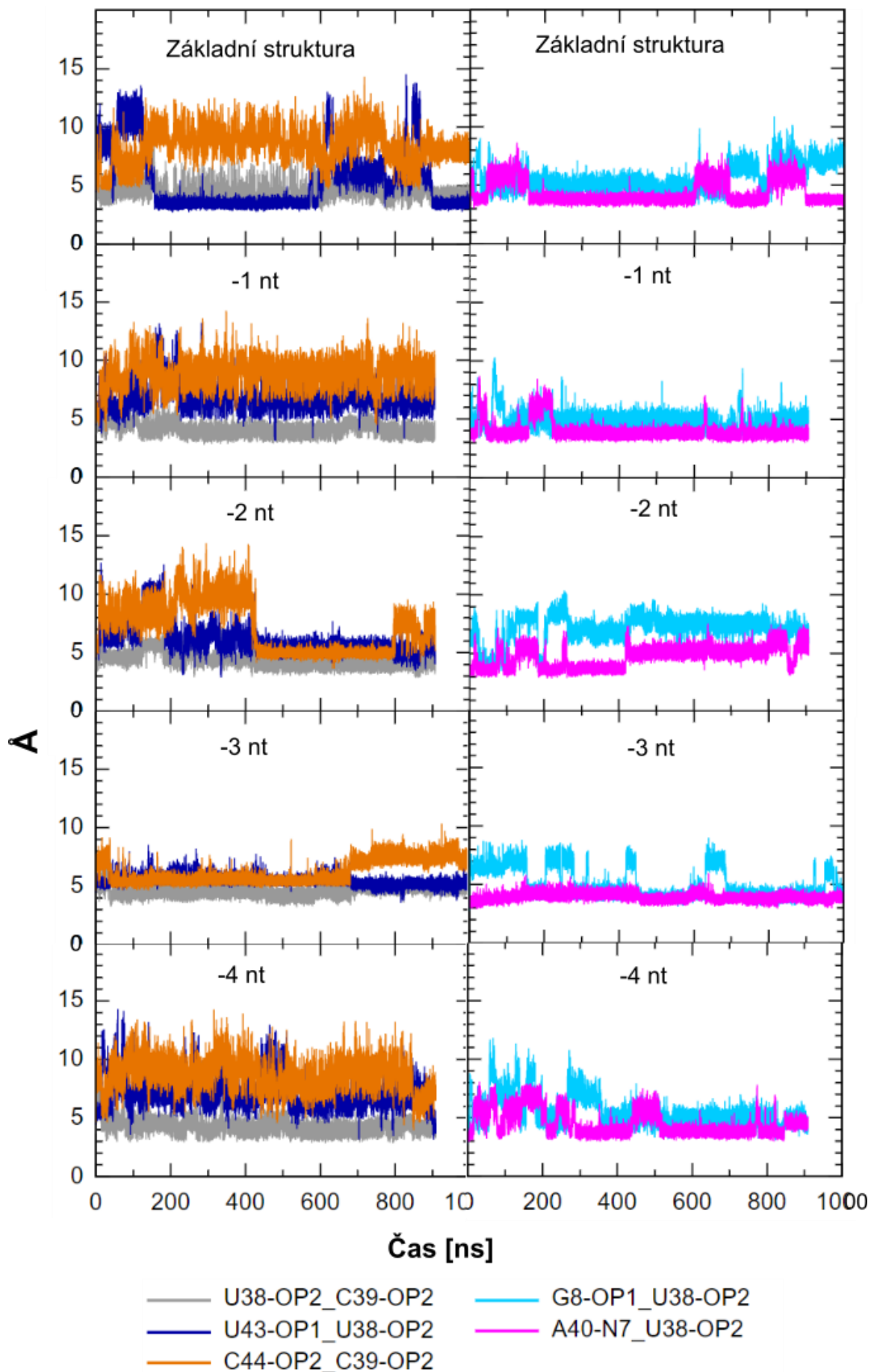


Obrázek 13 Rozpad vazebného místa M_A .

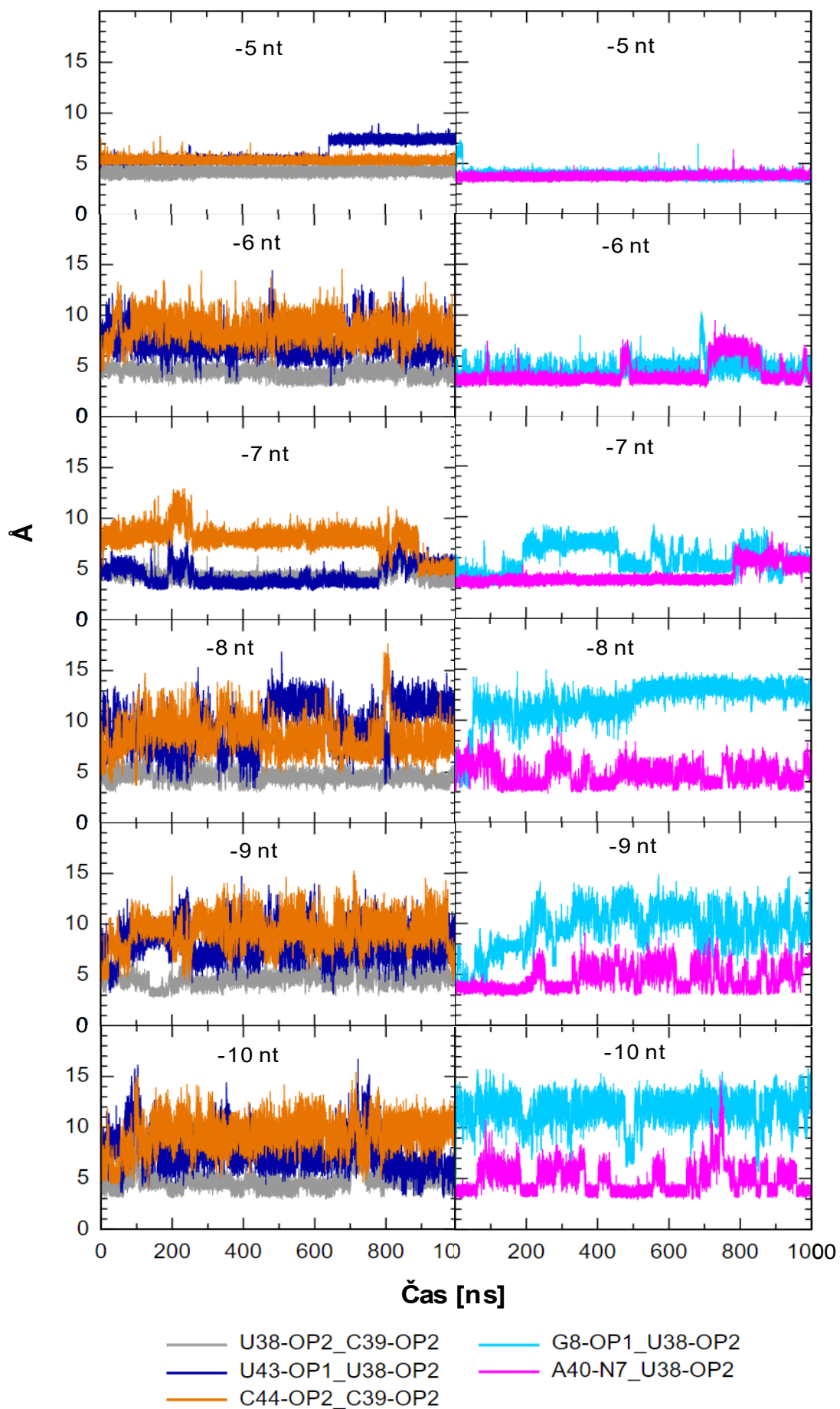
Z grafů pro vazebné místo M_B lze vidět, že fosfát navázaný na U38, je po celou dobu přítomen ve vazebném místě (hodnota je nižší než 5 Å), což lze vidět na obrázku č.15 a č. 16. Fosfáty navázané na uracil (U43) a cytosin (C44) se ve většině simulací oddělí ze svého vazebného místa. V grafu, kde je odstraněno pět nukleotidů, lze sledovat, že fosfáty navázané na uracil (U43) a cytosin (C44) jsou pevně vázány na K^+ (tmavě modrá a oranžová křivka). Dalším faktem je, že dusík N7 je pevně navázán k vazebnému místu, k jeho oddělení dochází, až po odebrání osmi nukleotidů (růžová křivka). Dále lze z grafů sledovat, že fosfát navázaný na guanin (G8) se pevně váže na vazebné místo, během simulací došlo k jeho reverzibilnímu oddělení (světle modrá křivka). Po odstranění osmi a více nukleotidů je fosfát z guaninu (G8) ireverzibilně oddělen.



Obrázek 14 Zobrazení vypočtených vzdáleností mezi fosfáty ve vazebném místě M_A.



Obrázek 15 Zobrazení vypočtených vzdáleností mezi fosfáty ve vazebném místě M_B po odstranění 0-4 nukleotidů.

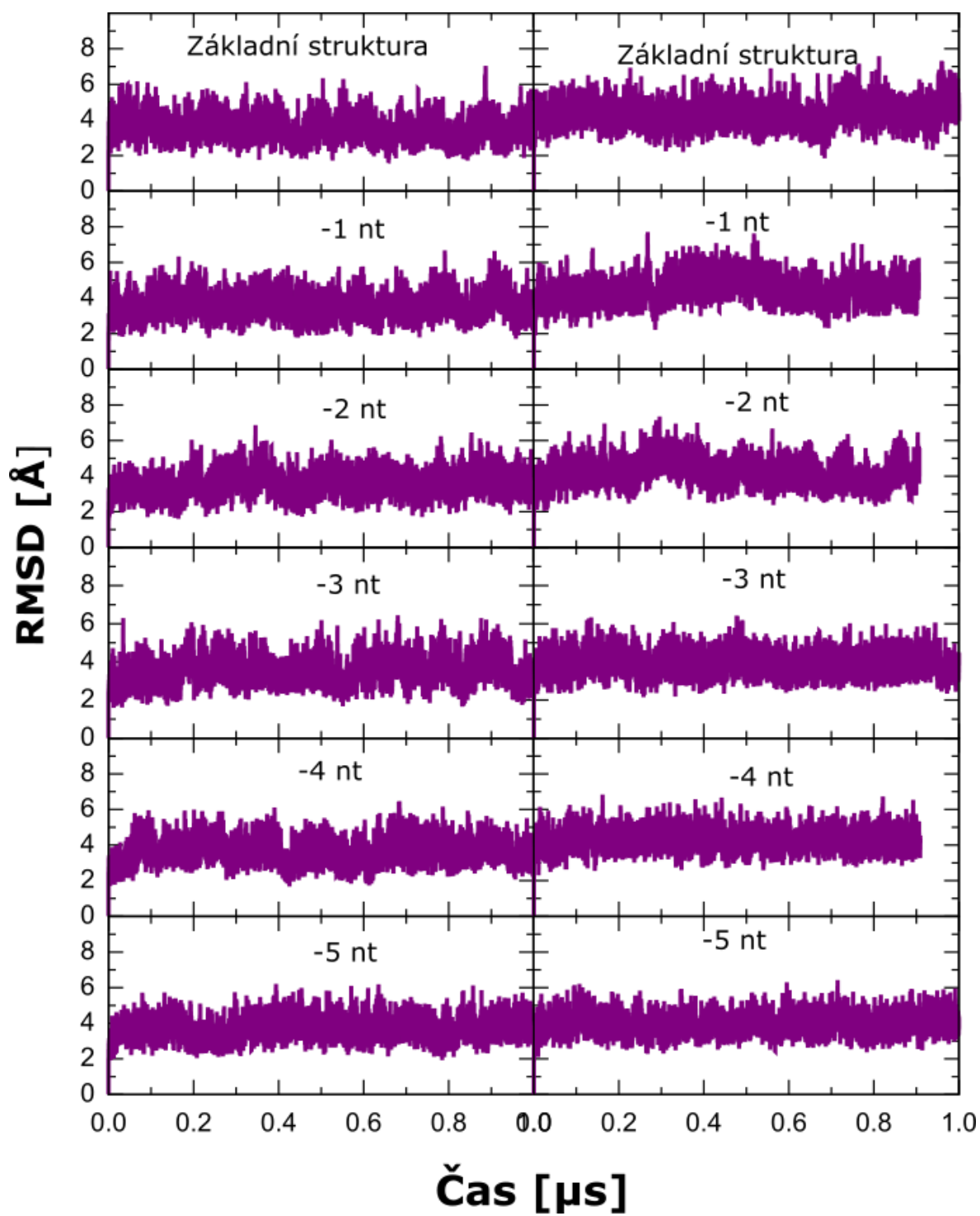


Obrázek 16 Zobrazení vypočtených vzdáleností mezi fosfáty ve vazebném místě M_B po odstranění 5-10 nukleotidů

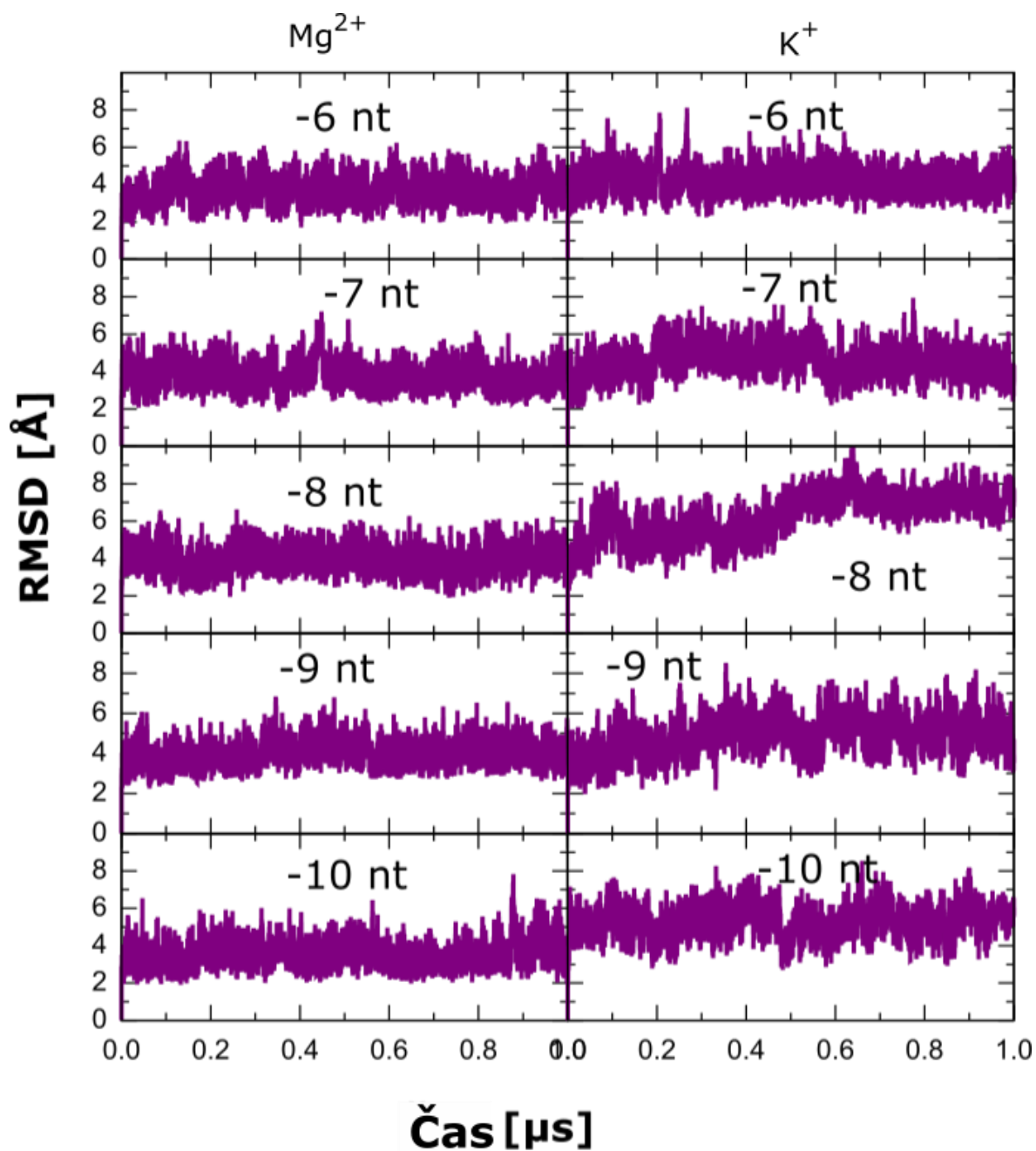
5.4 Stabilita simulací

Pro všech 22 struktur byla vypočítána hodnota RMSD která udává, jak moc se struktura změnila od původní (krystalické) struktury. Pomocí tohoto parametru se sledovala stabilita struktury celého RNA přepínače *yybP-ykoY* v průběhu simulace. Tento parametr byl vyneseno do grafu. Celkem tedy bylo vytvořeno 22 grafů, 11 grafů pro strukturu s navázaným hořečnatým iontem v aktivním místě a 11 grafů pro strukturu s navázaným draselným iontem (obrázek č. 17 a č. 18). Dále byla vypočtena hodnota ϵ RMSD pro L1 a P1.1 část RNA přepínače. Do výpočtu ϵ RMSD se nezahrnuje páteř a samotný výpočet je závislý jen na poloze atomů nukleobází. Tím tato hodnota lépe popisuje stabilitu a strukturní změny než RMSD. Ale každá z těchto metrik má své místo při analýze a při vhodném použití se dobře doplňují. Opět bylo vytvořeno 11 grafů pro L1 a P1.1 část RNA přepínače obsahující v aktivním místě hořečnatý iont a 11 grafů odpovídá L1 a P1.1 části RNA přepínače mající v aktivním místě draselný iont. (obrázek č. 19 a č. 20).

Z grafů RMSD pro RNA přepínač s navázaným hořečnatým a draselným iontem, lze sledovat, že struktura po celou dobu simulace rovnoměrně fluktuuje, což znázorňují křivky na obrázku č. 17 a č. 18. Z toho vyplývá, že jednotlivé systémy jsou velmi stabilní, páry bází se neoddělily. V grafu s označením -8 nt (odebraných osm bází) pro RNA přepínač s navázaným draselným iontem došlo ke výrazné změně, hodnota RMSD je zde větší než 8 Å. K této změně došlo v důsledku vazby fosfátu z guaninu (G6) k vazebnému místu M_A , což ovlivnilo, že část P1.1 změnila výrazně polohu vůči startovací struktuře. Celkově lze vidět, že systémy s hořečnatými ionty jsou více stabilní než příslušné systémy s draselnými ionty. I při odebrání 8 a více bází je systém stabilní a nedochází k velkým strukturním změnám.

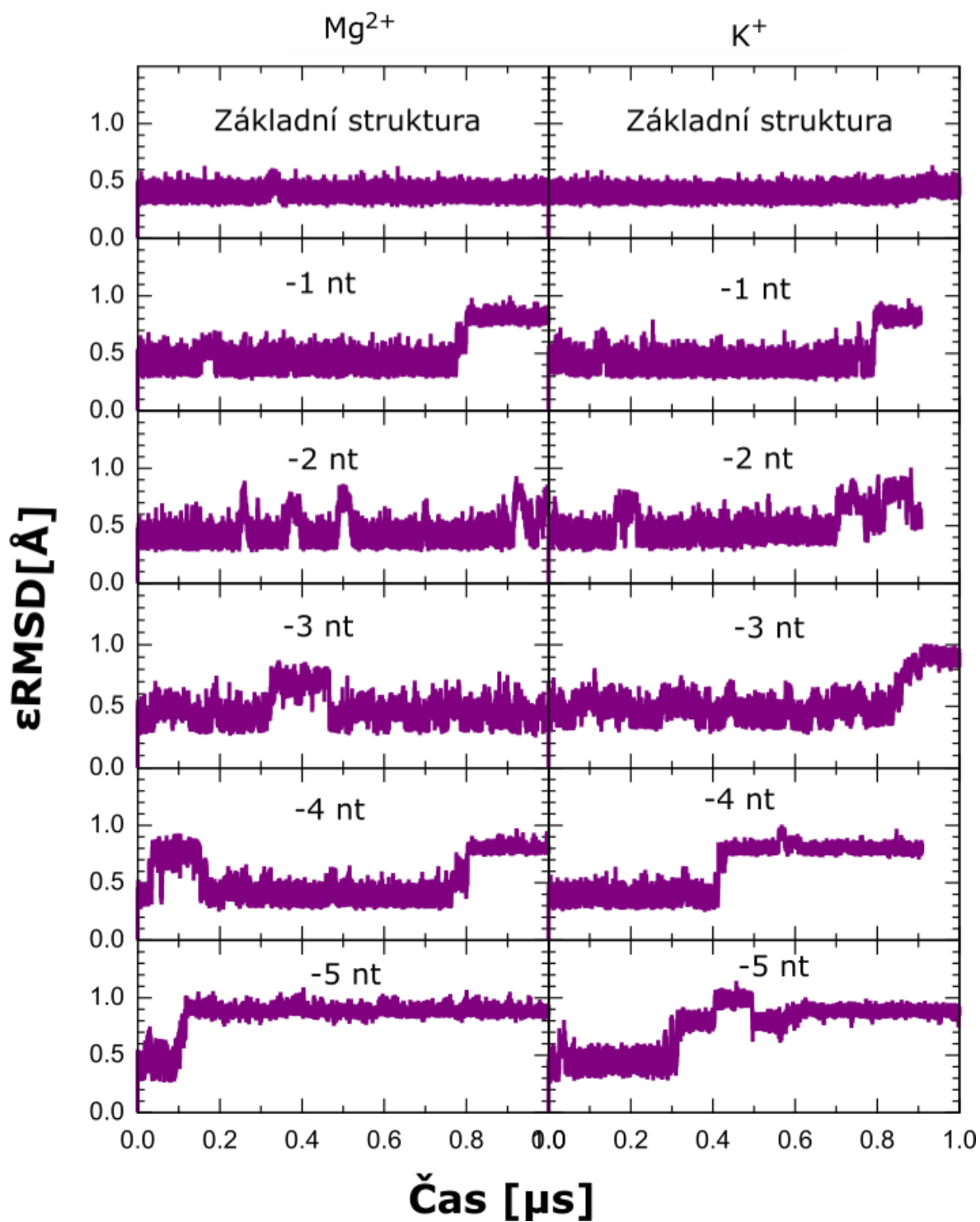


Obrázek 17 Vypočteny hodnoty RMSD po odstranění 0-5 nukleotidů ze struktury

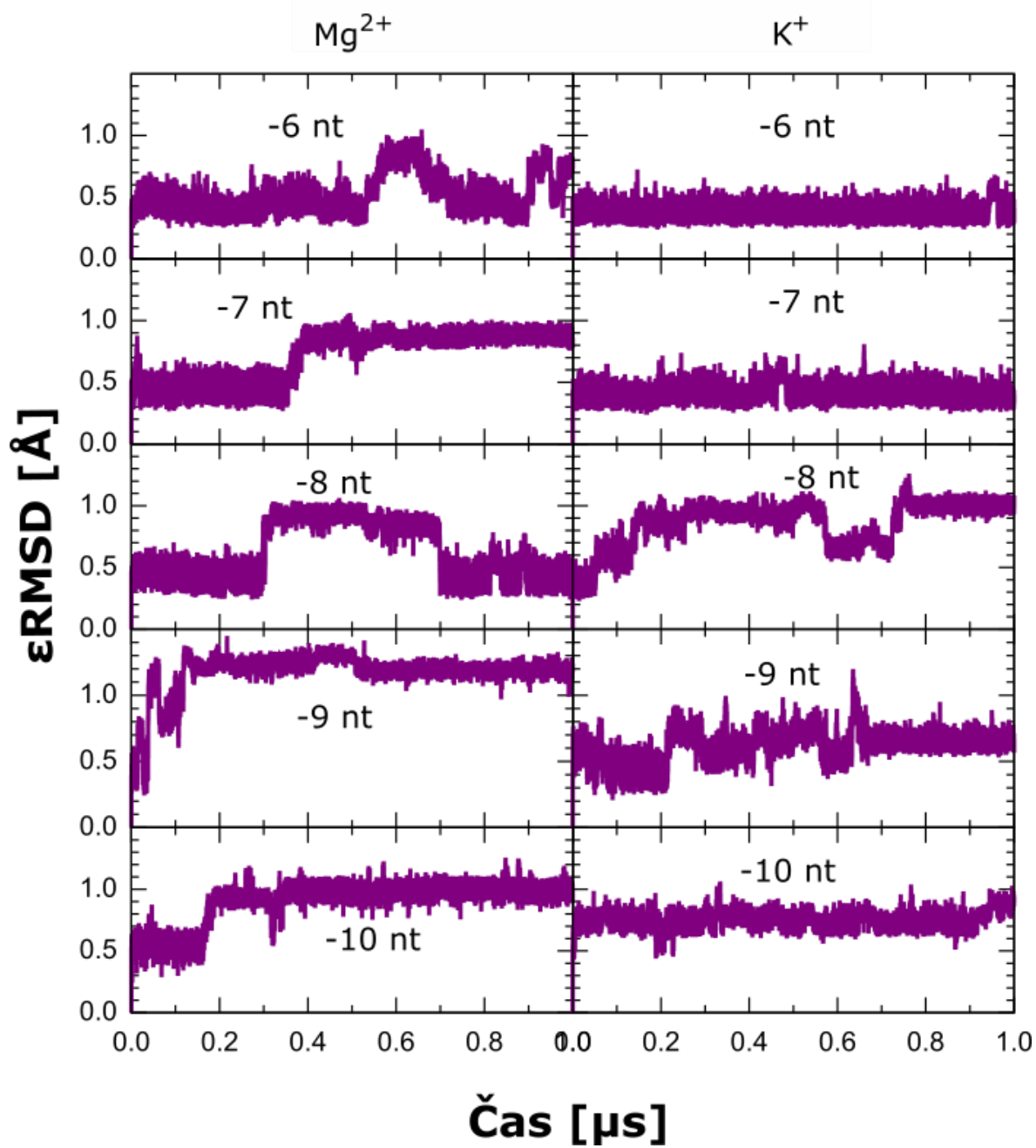


Obrázek 18 Vypočteny hodnoty RMSD po odstranění 6-10 nukleotidů ze struktury

Pro přesnější popis stability byla navíc vypočtena hodnota ϵ RMSD pro L1 a P1.1 částí, tj. pro tu část, která je nejvíce ovlivněna odebráním bází. U struktur s hodnotami ϵ RMSD pod 0.7 Å se dá říct, že jsou stejné a nedochází u nich k velkým strukturním změnám. Z grafů pro L1 a P1.1 části RNA přepínače, lze vidět vyšší pohyblivost vůči původní struktuře (viz obrázek č. 19 a 20). V těchto částech probíhá dynamika, která je vůči celé struktuře zanedbatelná. Dochází zde ke strukturním změnám, které jsou zapříčiněny odebráním nukleotidů ze struktury, což je logické, neboť řetězec komplementárních bází, který zbyl po odebrání bází, je flexibilnější. Čím víc bází chybí, tím mají větší tendence se vázat k okolním bázím.

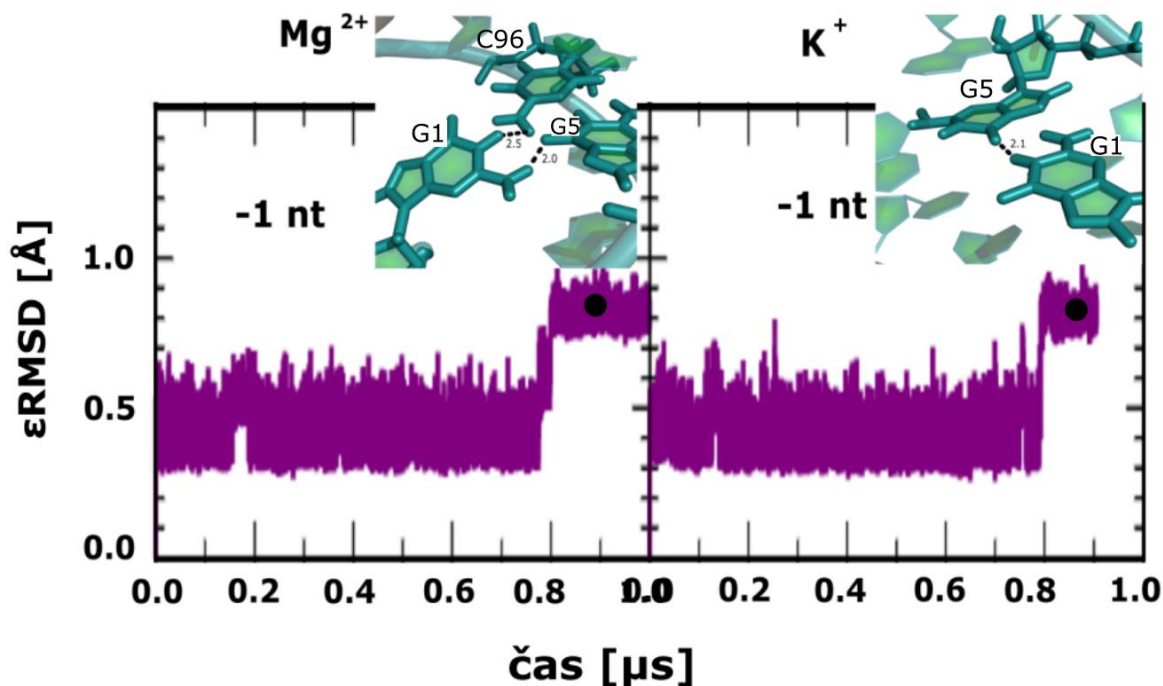


Obrázek 19 Vypočteny hodnoty ϵRMSD pro části L1 a P 1.1 po odstranění 0-5 nukleotidů ze struktury.



Obrázek 20 Vypočteny hodnoty εRMSD pro části L1 a P 1.1 po odstranění 6-10 nukleotidů ze struktury.

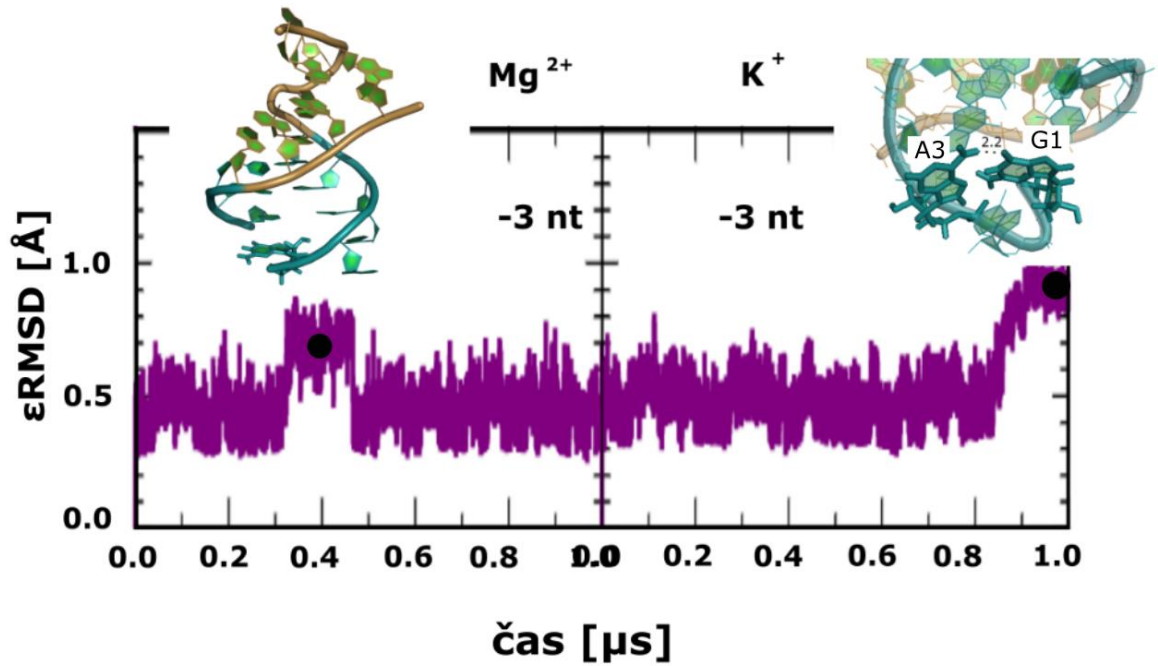
Pro lepší představu, co se ve struktuře v průběhu simulací děje, jsou v následujícím textu podrobně rozebrány jednotlivé grafy ϵ RMSD, včetně 3D vizualizace struktur. Po odebrání jednoho nukleotidu ze struktury RNA přepínače s navázaným hořečnatým iontem, došlo ke tvorbě interakce v čase 0,8 μ s mezi guaninem (G1) guaninem (G5) a mezi guaninem (G1) cytosinem (C96). Ve struktuře RNA přepínače s navázaným draselným iontem došlo k vytvoření interakce mezi guaninem (G5) a guaninem (G1) v čase 0,8 μ s, což lze vidět na obrázku č. 21



Obrázek 21 Zobrazení struktury RNA přepínače, který má odebrán jeden nukleotid ze struktury, v závislosti na čase a hodnotě RMSD

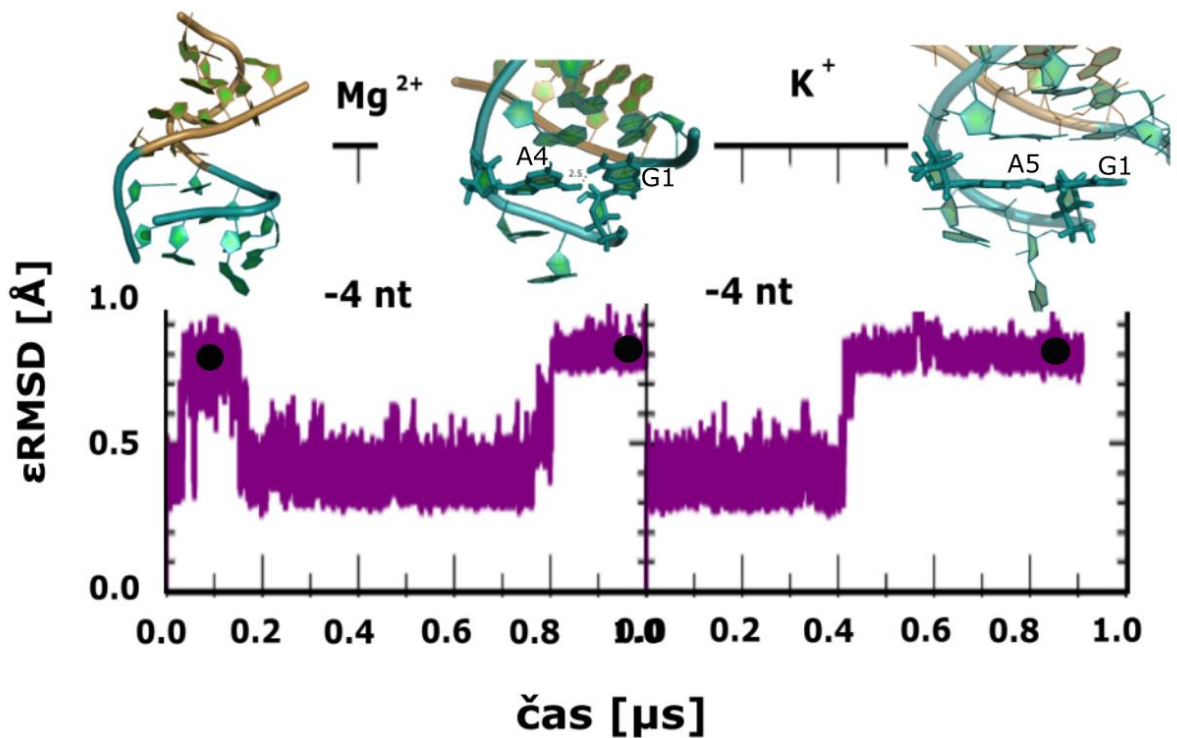
Ze struktur RNA přepínačů byly odebrány dva nukleotidy. Parametr RMSD vykazuje hodnoty, které jsou stabilní a ve strukturách s navázanými ionty dochází pouze k pohybu L1 a P1.1 částí. Nevytváří se nové interakce.

Následně byly odebrány tři nukleotidy ze struktur RNA přepínačů. RNA přepínač s navázaným hořečnatým iontem nevytváří nové interakce, dochází pouze k zániku párových interakcí ve struktuře v čase 0,4 μ s. V RNA přepínači, obsahující draselný iont ve vazebném místě, lze vidět, že byla vytvořena interakce mezi adeninem (A3) a guaninem (G1) v P1.1 části v čase 0,9 μ s (obrázek č. 22)



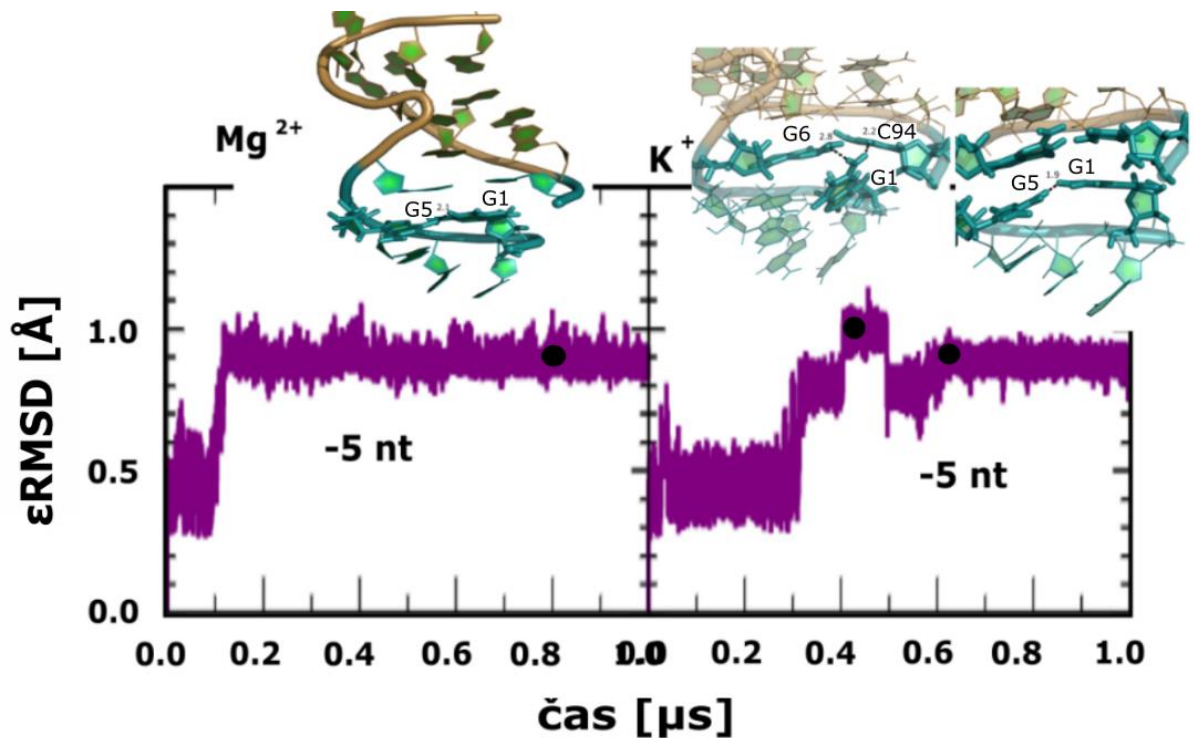
Obrázek 22 Zobrazení struktury RNA přepínače, který má odebrán tři nukleotidy ze struktury, v závislosti na čase a hodnotě RMSD

Po odebrání čtyř nukleotidů ze struktury RNA přepínače s navázaným hořečnatým iontem, dochází k vytvoření v čase 1 μs k interakci mezi adeninem (A4) a guaninem (G1), což lze vidět na obrázku č. 23. Ve struktuře RNA přepínače mající draselný iont ve vazebném místě došlo k vytvoření vazebné interakce mezi adeninem (A5) a guaninem (G1).



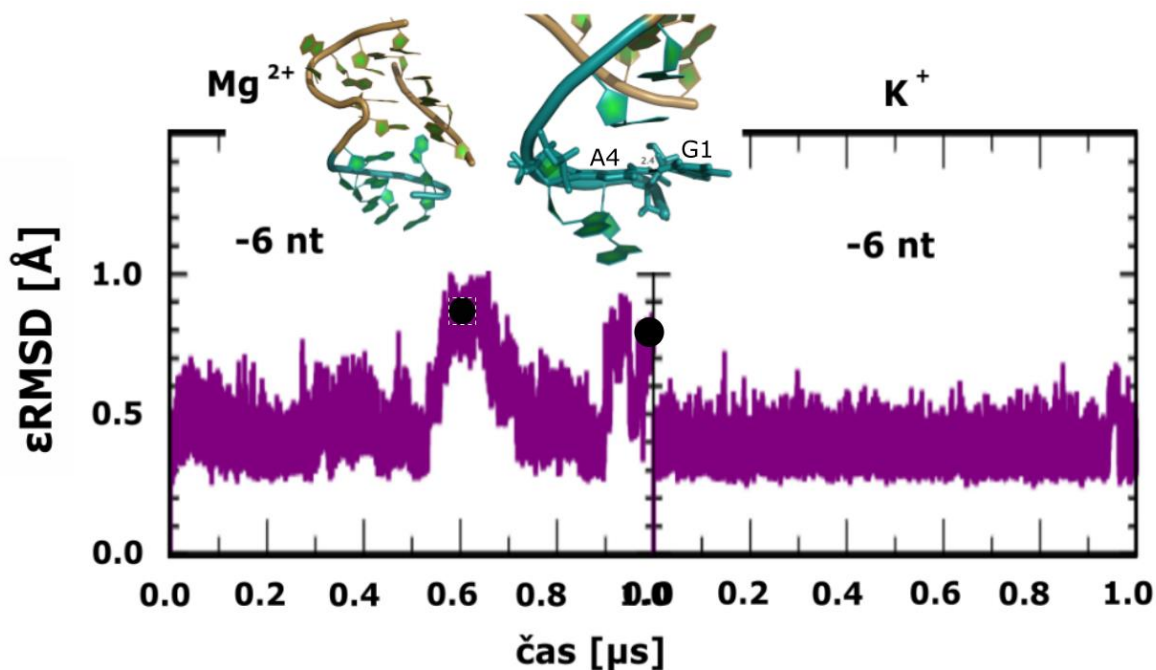
Obrázek 23 Zobrazení struktury RNA přepínače, který má odebrán čtyři nukleotidy ze struktury, v závislosti na čase a hodnotě RMSD

Na obrázku č. 24 lze vidět struktury RNA přepínače, kde bylo odebráno pět nukleotidů. RNA přepínač s navázaným hořečnatým iontem vytváří interakci mezi guaninem (G1) a guaninem (G5) v čase 0,8 μs , což lze vidět zvýšením hodnot v obrázku č. 24. Struktura přepínače s draselným iontem navázaným ve vazebném místě vytvořila v čase 0,4 μs interakci mezi guaninem (G1) a guaninem (G6) a následně mezi guaninem (G1) a cytosinem (C94). V čase 0,6 μs simulace byla vytvořena vazba mezi guaninem (G1) a guaninem (G5).



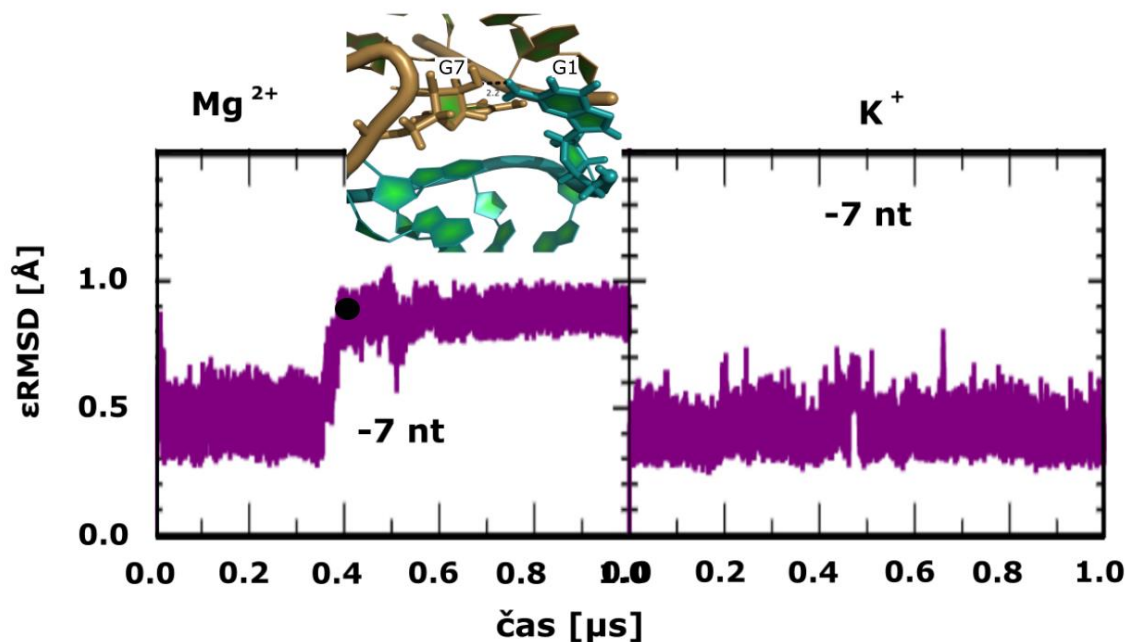
Obrázek 24 Zobrazení struktury RNA přepínače, který má odebrán pět nukleotidů ze struktury, v závislosti na čase a hodnotě RMSD

Ve struktuře RNA přepínače, obsahující hořečnatý iont ve vazebném místě došlo, po odstranění šesti nukleotidu ke vzniku interakce mezi adeninem (A4) a guaninem (G1) v čase 1 μs . V čase 0,6 μs došlo k zániku párových interakcí ve struktuře. Ve struktuře RNA přepínače s navázaným draselným iontem nedochází k zásadním změnám ve struktuře, což lze vidět na obrázku č. 25.



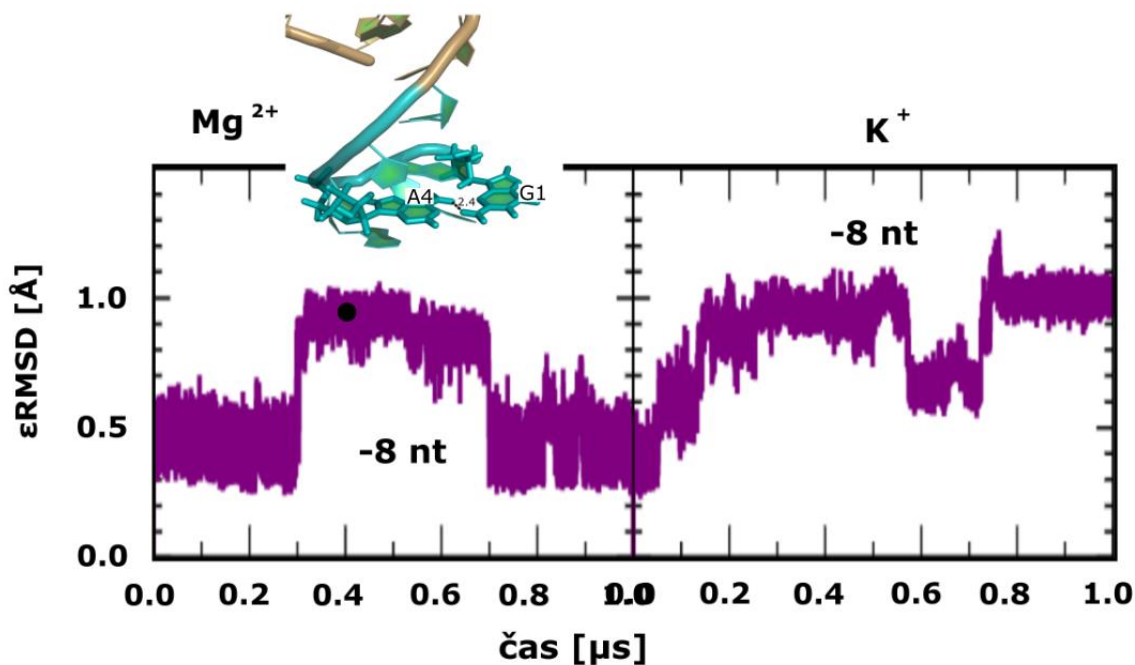
Obrázek 25 Zobrazení struktury RNA přepínače, který má odebrán šest nukleotidů ze struktury, v závislosti na čase a hodnotě RMSD

Z obrázku č. 26 pro RNA přepínač obsahující hořečnatý iont, lze vidět, že po odebrání sedmi nukleotidů, došlo ke vzniku interakce mezi guaninem (G7) a guaninem (G1) v čase 0,4 μ s. Ve struktuře s navázaným draselným iontem probíhá dynamika struktury bez tvorby nové interakce.



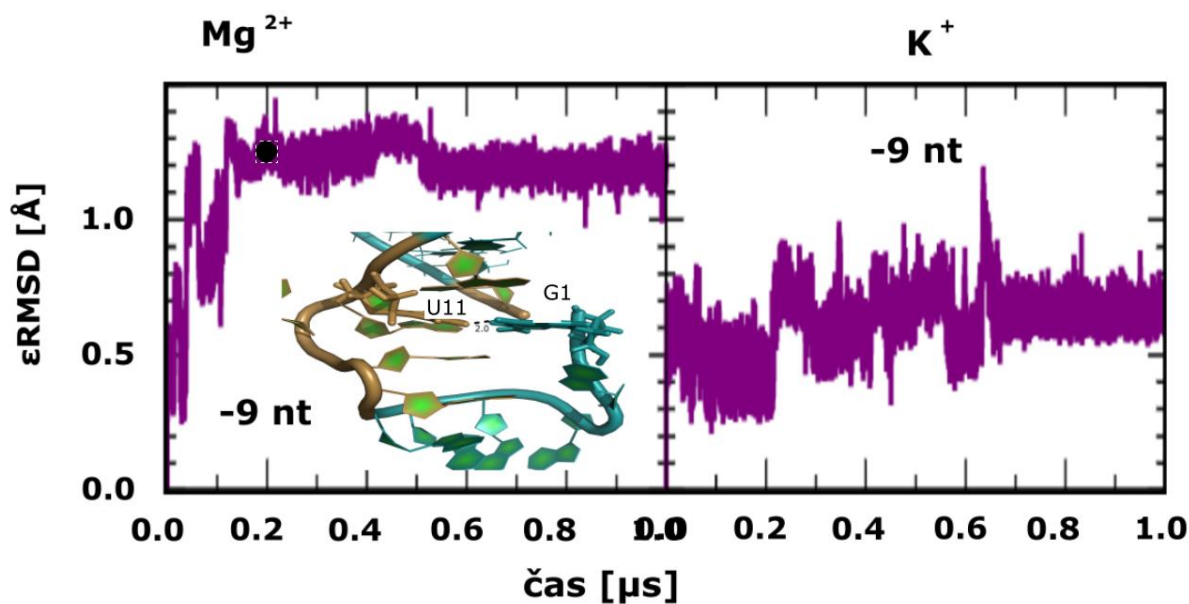
Obrázek 26 Zobrazení struktury RNA přepínače, který má odebrán sedm nukleotidů ze struktury, v závislosti na čase a hodnotě RMSD

V RNA přepínač, mající hořečnatý iont ve vazebném místě, po odebrání osmi nukleotidů, lze vidět, že došlo k vytvoření interakce mezi adeninem (A4) a guaninem (G1) v čase 0,4 μ s. Z obrázku č. 27 lze vidět, že struktura RNA přepínače, obsahující draselný iont, má vyšší hodnoty RMSD. Tyto hodnoty jsou způsobeny flexibilitou L1 a P1.1 části.



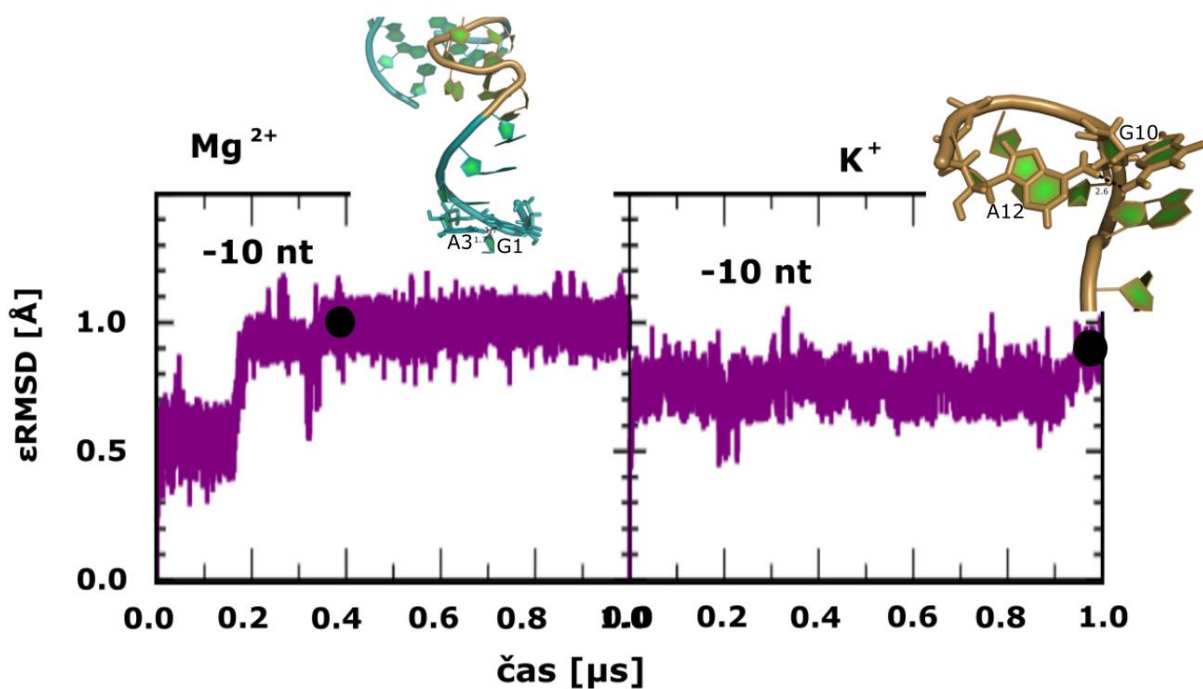
Obrázek 27 Zobrazení struktury RNA přepínače, který má odebrán osm nukleotidů ze struktury, v závislosti na čase a hodnotě RMSD.

Po odebrání devíti nukleotidů, ze struktury RNA přepínače s navázaným hořečnatým iontem, došlo k vazbě mezi uracilem (U11) a guaninem (G1), což lze vidět na obrázku č. 28 v čase 0,2 μ s. RNA přepínač obsahující draselný iont ve vazebném místě vykazuje pouze větší flexibilitu upravené struktury, nedochází ke vzniku nových interakcí.



Obrázek 28 Zobrazení struktury RNA přepínače, který má odebrán devět nukleotidů ze struktury, v závislosti na čase a hodnotě RMSD.

Ve struktuře RNA přepínače s navázaným hořečnatým iontem, kde je odebráno deset nukleotidů, vznikla interakce mezi adeninem (A3) a guaninem (G1) v čase 0,4 μs . RNA přepínač s draselným iontem ve vazebném místě vytvořil v čase 1 μs interakci mezi adeninem (A12) a guaninem (G10) v části L1 smyčky (obrázek č. 29)



Obrázek 29 Zobrazení struktury RNA přepínače, který má odebrán deset nukleotidů ze struktury, v závislosti na čase a hodnotě RMSD

Závěr

Tato bakalářská práce se zabývá přípravou aptameru RNA přepínače *Lactococcus lactis* *yypP-ykoY* pro následné navázání terminátoru ke struktuře pomocí počítačových simulací, neboť tato struktura nebyla experimentálně ani jinými prostředky doposud vytvořena. Hlavním cílem práce bylo, postupně odebírat báze z oblasti P1.1 a L1 RNA přepínače a tím nalézt strukturu vhodnou k navázání terminátoru. Celkem bylo vytvořeno 22 startovních struktur. Z nich 11 systémů obsahovalo hořčnatý iont ve vazebném místě, stejně jako originální RNA přepínač, a 11 struktur mělo v aktivním místě tento dvojmocný iont nahrazen draselným iontem.

Simulace běžící s draselnými ionty se ukázaly jako nestabilní a docházelo k rozpadání aktivního místa po odebrání více jak osmi bází. Navíc také po odebrání 8 a více bází došlo ke zvýšení celkové flexibility přepínače. Tento nárůst flexibility je dán nestabilitou cukr-fosfátové páteře smyčky, která se nachází v L1 části RNA přepínače. Tyto simulace se ukázaly jako nevhodné k dalšímu použití, tj. pro navázání terminátoru.

Simulace s hořčnatými ionty v aktivním místě se ukázaly jako více stabilní. I při odebrání více bází nedošlo ke zvýšení flexibility celého systému, jen se zvýšila flexibilita koncových částí přepínače, byť po odebrání 4 a více nukleotidu došlo ke změně párování u guaninu (G1). Pomocí těchto simulací se podařilo připravit set struktur, které jsou potenciálně vhodné k navázání terminátoru. Dalším krokem by bylo použít struktury terminátoru, které pomocí modelování připravila Kristína Petrovská, a tyto struktury následně pomocí počítačových simulací zkusit zminimalizovat do kompletní struktury RNA přepínače s navázaným terminátorem. Ale toto modelování je již nad rámec této práce a mohlo by být zcela samostatnou prací.

Summary

This bachelor's thesis is focused on preparation of the RNA riboswitch aptamer *Lactococcus lactis* *yybP-ykoY* for subsequent attachment of the terminator to the structure using computer simulations, because this structure has not been prepared experimentally. The main goal of this thesis was to gradually remove the bases from the P1.1 and L1 regions of the riboswitch and thus find a structure suitable for the binding of the terminator. A total of 22 starting structures were prepared. Of these, 11 systems contained a magnesium ion at the binding site, like the original riboswitch. Another 11 structures had this divalent ion replaced with a potassium ion at the active site.

Simulations running with potassium ions proved to be unstable and the active site disintegrated after removal of more than eight bases. In addition, even after removing 8 or more bases, the overall flexibility of the riboswitch increased. This increase in flexibility is due to instability of the sugar-phosphate backbone loop, located in the L1 part of the riboswitch. These simulations proved to be unsuitable for further use, i.e. for attaching a terminator.

Simulations with magnesium ions in the active site proved to be more stable. Even when removing more bases, the flexibility of the whole system does not increase, only the flexibility of the terminal parts of riboswitch was increased. Although after removing 4 or more nucleotides, the pairing of G1 changes. Using these simulations, it was possible to prepare a set of structures that are potentially suitable for terminator binding. The next step would be to use the terminator structures prepared by Kristína Petrovská, and then try to minimize these structures to the complete structure of the RNA riboswitch with the bound terminator using computer simulations. But this modeling is beyond the scope of this work and could be a completely separate work

Seznam použitých zdrojů

- [1] Z. Vodrážka, “Biochemie.” 2., opr. vyd. Praha: Academia 1996.
- [2] M. Biesiada, K. Pachulska-Wieczorek, R. W. Adamiak, and K. J. Purzycka, “RNAComposer and RNA 3D structure prediction for nanotechnology,” *Methods*, vol. 103, pp. 120–127, 2016.
- [3] A. D. Hershey, “Ribonukleové kyseliny,” *Živa*, vol.3, pp. 98-100 2007.
- [4] T. P. Begley, W. K. Olson, A. V. Colasanti, X.-J. Lu, and V. B. Zhurkin, “Watson-Crick Base Pairs: Character and Recognition,” *Wiley Encycl. Chem. Biol.*, no. October 2017, 2008.
- [5] N. B. Leontis and E. Westhof, “Geometric nomenclature and classification of RNA base pairs,” *Rna*, vol. 7, no. 4, pp. 499–512, 2001.
- [6] D. P. Snudstad, M. J. Simmons “Genetika,” Brno: Maarykova univerzita, 2009.
- [7] M. Kodíček.; O.Valentová; R.Hynek, “Biochemie: chemický pohled na biologický svět.”, Praha: Vysoká škola chemicko.technologická, 2015
- [8] A. D. Garst, A. L. Edwards, and R. T. Batey, “Riboswitches: Structures and mechanisms,” *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 3, no. 6, pp. 1–13, 2011.
- [9] A. Nahvi, N. Sudarsan, M. S. Ebert, X. Zou, K. L. Brown, and R. R. Breaker, “Genetic control by a metabolite binding mRNA,” *Chem. Biol.*, vol. 9, no. 9, pp. 1043–1049, 2002.
- [10] A. Serganov and E. Nudler, “A decade of riboswitches,” *Cell*, vol. 152, no. 1–2, pp. 17–24, 2013.
- [11] J. J. Trausch *et al.*, “Structural basis for diversity in the SAM clan of riboswitches,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 111, no. 18, pp. 6624–6629, 2014.
- [12] R. R. Breaker, “Riboswitches and the RNA world,” *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 4, no. 2, 2012.
- [13] J. N. Kim and R. R. Breaker, “Purine sensing by riboswitches,” *Biol. Cell*, vol. 100, no. 1, pp. 1–11, 2008.
- [14] H. L. Sung and D. J. Nesbitt, “Single-Molecule FRET Kinetics of the Mn²⁺ Riboswitch: Evidence for Allosteric Mg²⁺ Control of ‘induced-Fit’ vs ‘conformational Selection’ Folding Pathways,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 123, no. 9, pp. 2005–2015, 2019.

- [15] P. J. Mccown, K. A. Corbino, S. Stav, M. E. Sherlock, and R. R. Breaker, “Riboswitch diversity and distribution,” *Rna*, vol. 23, no. 7, pp. 995–1011, 2017.
- [16] I. R. Price, A. Gaballa, F. Ding, J. D. Helmann, and A. Ke, “Mn²⁺-Sensing Mechanisms of yybP-ykoY Orphan Riboswitches,” *Mol. Cell*, vol. 57, no. 6, pp. 1110–1123, 2015.
- [17] I. Nezbeda, J. Kolafa, and M. Kotrla, “Úvod do počítačových simulací: metody Monte Carlo a molekulární dynamiky,” no. October, 1998.
- [18] J. Šponer *et al.*, “Molecular dynamics simulations of nucleic acids. from tetranucleotides to the ribosome,” *J. Phys. Chem. Lett.*, vol. 5, no. 10, pp. 1771–1782, 2014.
- [19] I. Kumari, P. Sandhu, M. Ahmed, and Y. Akhter, “Molecular Dynamics Simulations, Challenges and Opportunities: A Biologist’s Prospective,” *Curr. Protein Pept. Sci.*, vol. 18, no. 11, 2017.
- [20] A. Allouche, “CHARMM: The biomolecular simulation program,” *J. Comput. Chem.*, vol. 32, pp. 174–182, 2012.
- [21] I. S. & C. Joung, “T. E. Determination of alkali and halide monovalent ion parameters for use in explicitly solvated biomolecular simulations.”
- [22] S. Izadi, R. Anandakrishnan, and A. V Onufriev, “Building Water Models : A Different Approach,” 2014.
- [23] P. A. Cornell, W. D.; Cieplak, P.; Bayly, C. I.; Gould, I. R.; Merz, K. M.; Ferguson, D. M.; Spellmeyer, D. C.; Fox, T.; Caldwell, J. W.; Kollman, “A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids, and organic molecules,” vol. 117, p. 5179, 1995.
- [24] P. A. Wang, J. M.; Cieplak, P.; Kollman, “How well does a restrained electrostatic potential (RESP) model perform in calculating conformational energies of organic and biological molecules?,” *J Comput Chem*, 2000.
- [25] M. Perez, A.; Marchan, I.; Svozil, D.; Sponer, J.; Cheatham, T. E.; Laughton, C. A.; Orozco, “Refinement of the AMBER force field for nucleic acids: Improving the description of alpha/gamma conformers,” *Biophys.*, 2007.
- [26] D. A. R. Steinbrecher, T.; Latzer, J.; Case, “AMBER Parameters for Bioorganic Phosphates.,” *Chem Theory Comput*, 2012.

- [27] P. Kuhrova, P.; Mlynsky, V.; Zgarbova, M.; Krepl, M.; Bussi, G.; Best, R. B.; Otyepka, M.; Sponer, J.; Banas, “Improving the Performance of the Amber RNA Force Field by Tuning the Hydrogen-Bonding Interactions,” *Chem. Theory Comput*, 2019.
- [28] D. A. Case *et al.*, “The Amber biomolecular simulation programs,” *J. Comput. Chem.*, vol. 26, no. 16, pp. 1668–1688, 2005.
- [29] V. N. Maiorov and G. M. Crippen, “Significance of root-mean-square deviation in comparing three-dimensional structures of globular proteins,” *Journal of Molecular Biology*, vol. 235, no. 2. pp. 625–634, 1994.

Seznam obrázků

Obrázek 1 Dusíkaté báze v RNA a DNA strukturách.	8
Obrázek 2 Struktura interakcí v RNA.	10
Obrázek 3 Regulace transkripce pomocí RNA přepínače. Pokud RNA přepínač nemá ve své struktuře navázaný ligand, probíhá děj transkripce. Po navázání iontu je do jeho struktury se vytvoří terminátor a dochází k ukončení transkripce	13
Obrázek 4 Regulace translace pomocí RNA přepínače. Když v RNA přepínači není navázán iont, tak vazebné místo (RBS) se stává přístupné pro navázání ribozomu. Pokud však ve struktuře RNA přepínače je navázán iont, dochází k izolaci RBS a ribozom není schopen se do vazebného místa navázat.	13
Obrázek 5 Četnost jednotlivých tříd riboswitchů [13]	15
Obrázek 6 A) Zobrazení 3D struktury RNA přepínače <i>yybP-ykoY</i> . Zvýrazněná je část, kterou se zabývám v mé bakalářské práci. B) 2D struktura RNA přepínače <i>yybP-ykoY</i>	16
Obrázek 7 Zde na tomto obrázku je černým kruhem vyznačená oblast, kde byly odstraněny nukleotidy z RNA přepínače.....	21
Obrázek 8 Schematické navázání terminátoru na aptamerovou doménu.....	24
Obrázek 9 3D znázornění vodíkové vazby mezi G1 (modře označen) a smyčkou L1 (označeno žlutě).....	25
Obrázek 10 Zobrazení vypočtených B-faktorů pro struktury RNA přepínače s navázaným Mg^{2+} iontem.	28
Obrázek 11 Zobrazení vypočtených B-faktorů pro struktury RNA přepínače s navázaným K^+ ionty.....	29
Obrázek 12 Vazebné místa M_A a M_B	30
Obrázek 13 Rozpad vazebného místa M_A	31
Obrázek 14 Zobrazení vypočtených vzdáleností mezi fosfáty ve vazebném místě M_A	32
Obrázek 15 Zobrazení vypočtených vzdáleností mezi fosfáty ve vazebném místě M_B po odstranění 0-4 nukleotidů.	33
Obrázek 16 Zobrazení vypočtených vzdáleností mezi fosfáty ve vazebném místě M_B po odstranění 5-10 nukleotidů	34
Obrázek 17 Vypočteny hodnoty RMSD po odstranění 0-5 nukleotidů ze struktury	36
Obrázek 18 Vypočteny hodnoty RMSD po odstranění 6-10 nukleotidů ze struktury	37
Obrázek 19 Vypočteny hodnoty ϵ RMSD pro části L1 a P 1.1 po odstranění 0-5 nukleotidů ze struktury.	39
Obrázek 20 Vypočteny hodnoty ϵ RMSD pro části L1 a P 1.1 po odstranění 6-10 nukleotidů ze struktury.	40
Obrázek 21 Zobrazení struktury RNA přepínače, který má odebrán jeden nukleotid ze struktury, v závislosti na čase a hodnotě RMSD.....	41
Obrázek 22 Zobrazení struktury RNA přepínače, který má odebrán tři nukleotidy ze struktury, v závislosti na čase a hodnotě RMSD.....	42
Obrázek 23 Zobrazení struktury RNA přepínače, který má odebrán čtyři nukleotidy ze struktury, v závislosti na čase a hodnotě RMSD.....	42
Obrázek 24 Zobrazení struktury RNA přepínače, který má odebrán pět nukleotidů ze struktury, v závislosti na čase a hodnotě RMSD.....	43
Obrázek 25 Zobrazení struktury RNA přepínače, který má odebrán šest nukleotidů ze struktury, v závislosti na čase a hodnotě RMSD.....	44

Obrázek 26 Zobrazení struktury RNA přepínače, který má odebrán sedm nukleotidů ze struktury, v závislosti na čase a hodnotě RMSD.....	44
Obrázek 27 Zobrazení struktury RNA přepínače, který má odebrán osm nukleotidů ze struktury, v závislosti na čase a hodnotě RMSD.....	45
Obrázek 28 Zobrazení struktury RNA přepínače, který má odebrán devět nukleotidů ze struktury, v závislosti na čase a hodnotě RMSD.....	46
Obrázek 29 Zobrazení struktury RNA přepínače, který má odebrán deset nukleotidů ze struktury, v závislosti na čase a hodnotě RMSD.....	46

Seznam tabulek

Tabulka 1 Název struktury, která byla upravována a konkrétní počet odstraněných nukleotidů.	21
Tabulka 2 Patrové a nově vytvořené interakce ve strukturách yybP-ykoY s navázaným iontem Mg^{2+}	25
Tabulka 3 Patrové a nově vytvořené interakce ve strukturách yybP-ykoY s navázaným iontem K^+	26