

1. Úvod.....	2
2. RNA	3
2.1. Charakteristika bází RNA	3
2.2. Párování bází v RNA	7
2.3. Sekundární a terciární struktura RNA.....	12
2.3.1 Vybrané ribozomální motivy	15
2.3.2 A-minor interakce a P-interakce	17
2.3.3 Kink-turn motivy	20
2.4. Ribozom.....	24
3. Metody	27
3.1. Molekulová dynamika	30
3.1.1 Výběr silového pole pro RNA	30
3.1.2 Nastavení používané v MD.....	31
3.1.3 Analýza simulací.....	32
4. Cíle.....	34
5. Výchozí struktura studovaných motivů	35
5.1. Motiv A.....	37
5.2. Motiv B	40
5.3. Motiv C	45
5.4. Motiv D.....	49
6. Výsledky a diskuse	53
7. Závěr	78
8. Literatura:.....	79
9. Summary	84
10. Příloha.....	85

1. Úvod

Tématem diplomové práce je studium struktury a dynamiky vybraných ribozomálních RNA motivů tvaru V a L. Strukturní a funkční úloha těchto motivů je dosud nevysvětlena. Cílem diplomové práce je pomocí molekulově dynamických simulací popsat dynamické chování příslušných motivů. V práci je věnována pozornost jak výchozí struktuře konkrétních motivů, získaných z ribozomu bakterie *E.coli.*, tak jejich dynamické struktuře. Při současném technologickém rozvoji se RNA a DNA těší velké slávě, ale genetický materiál by nebyl ničím bez ribozomů. Ribozomy lze definovat jako velké molekulární stroje, které lze přirovnat k obrovské dynamické stavebnici LEGO. Základní úloha ribozomu, coby „továrny“ na proteiny je obecně známá. Atraktivitu ribozomu potvrzuje i skutečnost, že v roce 2009 byla udělena Nobelova cena za objev struktury ribozomu.

Bez kvalitního krystalu by nebylo možné studovat ribozom na atomární úrovni s kvalitním rozlišením. První zmínky o krystalech ribozomu lze datovat od 90. let minulého století, kde se rozlišení pohybovalo okolo 10 Å. Dnes pracujeme s krystalovými strukturami s rozlišením 2.5-3.5 Å. Prohlubování poznání klade vědecké společnosti stále nové a nové otázky, které by bez kvalitního krystalu nemohly být zodpovězeny.

V ribozomu se vyskytují konzervované motivy, které moderují ohyb páteře, nabízí vazebná místa pro proteiny a ukazují dynamické chování, díky jemuž se např. translokují ribozomální segmenty – jde o kink-turn motivy. Dále se v ribozomu vyskytují motivy, které rovněž mají stejný ohnutý tvar jako kink-turny, ale postrádají jejich signaturu (kink-turn konsensus). K dispozici je sice struktura L- a V- motivů, ale není známa žádná informace o jejich dynamice a flexibilitě. Dynamiku můžeme studovat experimentálně např. metodami FRET, NMR nebo pomocí molekulové dynamiky. A právě molekulově dynamické simulace poskytují jedinečný nástroj ke studiu dynamických vlastností na atomární úrovni.

2. RNA

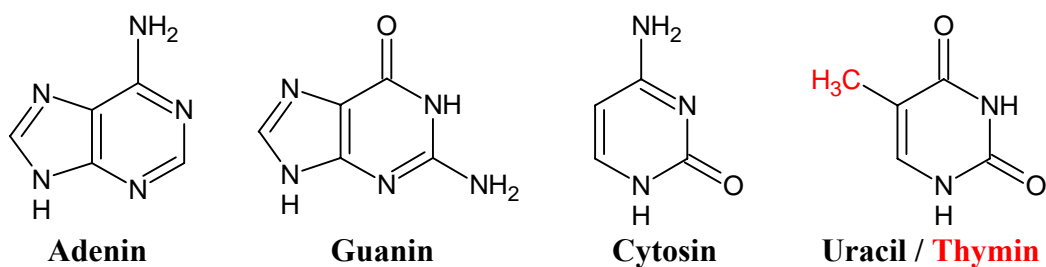
Dříve zůstávala ribonukleová kyselina (RNA) spíše ve stínu deoxyribonukleové kyseliny (DNA). DNA je známa jako nositelka genetické informace, ale s pokrokem v experimentální a výpočetní technice se stává i RNA velice atraktivním tématem pro výzkum. Vzdávající zájem o RNA dokazuje i skutečnost, že v roce 2006 byly uděleny v souvislosti s výzkumem RNA Nobelovy ceny jak v oblasti chemie, tak medicíny. Kornberg, který se zabýval problematikou eukaryotické translace, obdržel Nobelovu cenu za chemii a za medicínu cenu obdrželi američtí vědci Fire a Mello za objasnění mechanismu genové regulace [1]. V roce 2009 byla udělena Nobelova cena trojici vědců Ramakrishnan, Yonath a Steitz za studii o struktuře a funkci ribozomů .

V této kapitole bych ráda popsala základní rozdíly mezi DNA a RNA. Přestože DNA a RNA mají podobné stavební jednotky, liší se výrazně ve struktuře a funkci.

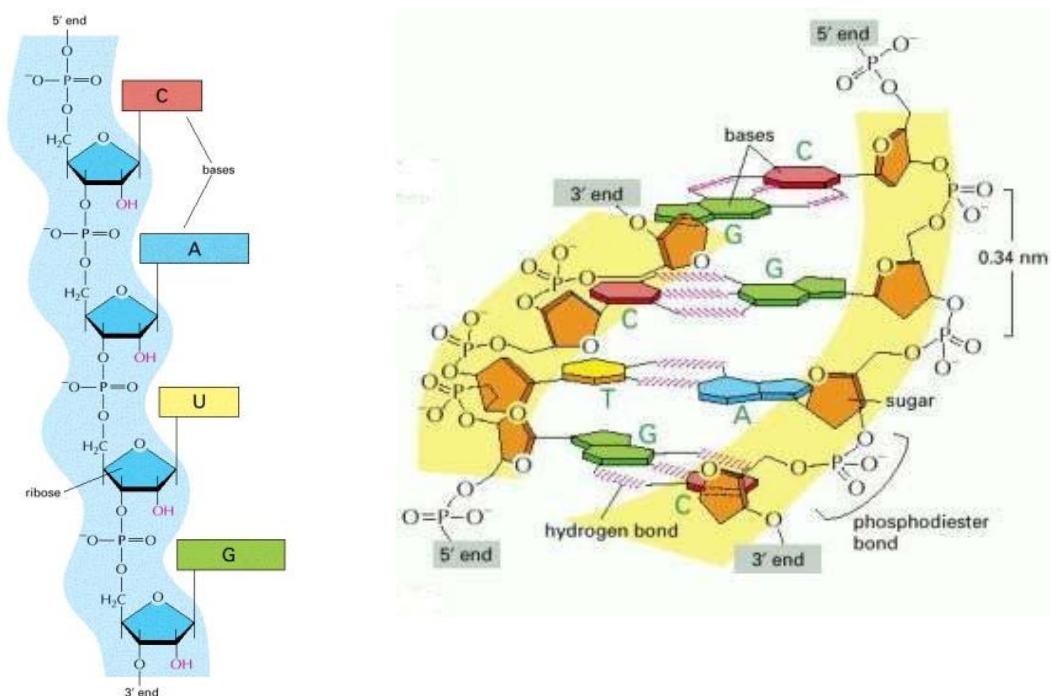
2.1. Charakteristika bází RNA

Nukleové kyseliny jsou obecně složeny ze tří základních částí – cukr, fosfátová skupina a báze. Cukrem v RNA je ribóza, v DNA 2'-deoxyribóza.

Báze v RNA i DNA jsou dvojího typu, a to purinové a pyrimidinové. Mezi purinové báze řadíme adenin (A) a guanin (G) a k pyrimidinovým zařazujeme uracil (U), cytosin (C) a thymin (T) (obrázek 1). Společnými bázemi pro RNA a DNA jsou adenin, guanin a cytosin, zatímco thymin, vyskytující se v DNA, je v RNA nahrazen uracilem. Thymin se od uracilu liší přítomností methylové (-CH₃) skupiny na uhlíku C5 aromatického pyrimidinového kruhu. Všechny atomy (kromě atomů vodíku náležící exocyklickým aminoskupinám) leží v rovině. Planarita bází je závislá na uspořádání elektronové hustoty na uhlících v aromatickém kruhu. [2].



Obrázek 1 – Strukturální vzorce bází RNA. Uracil se od thyminu liší absencí methylové skupiny (červeně). Strukturální vzorce jsou vytvořeny programem ADC/ChemSketch 10.0.

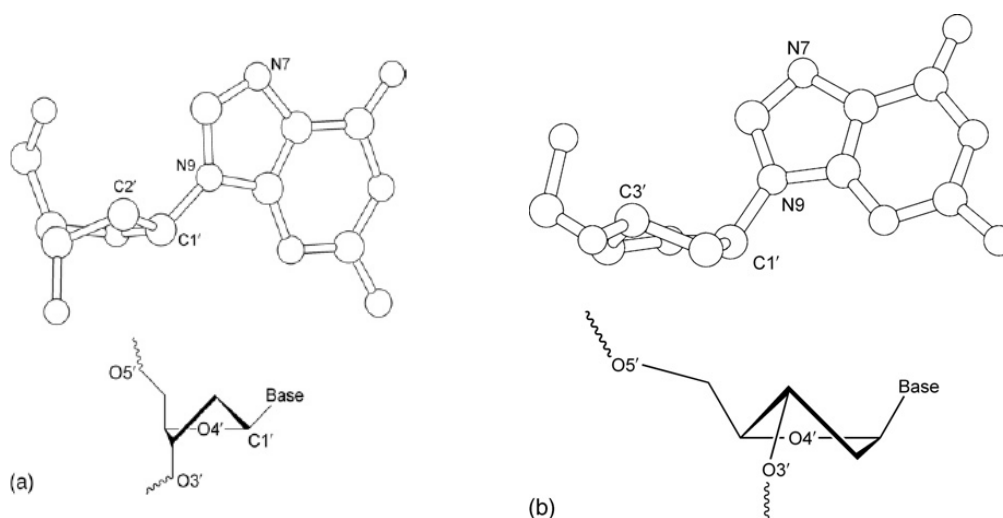


Obrázek 2 - Obrázky ilustrují připojení bází na cukr-fosfátovou páteř nukleové kyseliny. Převzato z [3]

Molekula ribózy není planární. Kruh ribózy může zaujmout několik konformací. Pokud je jeden atom mimo rovinu vůči ostatním čtyřem atomům, označujeme tento stav jako „envelope“. Běžněji se však vyskytuje konformace „twist“, ve které jsou dva atomy odchýlené od zbylých třech. Pokud se odchýlené atomy vyskytují na stejné straně jako báze a vazba C4'-C5' potom tento atom je nazván *endo*. Opačný případ je pojmenován jako *exo*. Nejběžněji pozorované struktury jsou C2'-*endo* a C3'-*endo* (obrázek 3). V případě velké odchylky na *endo*

straně bude malá odchylka na protější *exo* straně. Uspořádání *C2'-endo* má P-hodnoty v rozmezí 140° až 180° . Tato konformace se může označovat také termínem S (South). Uspořádání *C3'-endo* má P-hodnoty v rozmezí od -10° do 40° . Tato konformace se může označovat také termínem N (North) [4].

Pojem P-hodnota lze vysvětlit jako pravděpodobnost, se kterou by za předpokladu platnosti nulové hypotézy mohl být rozdílný efekt pozorovaný ve studii výsledkem pouhé náhody.

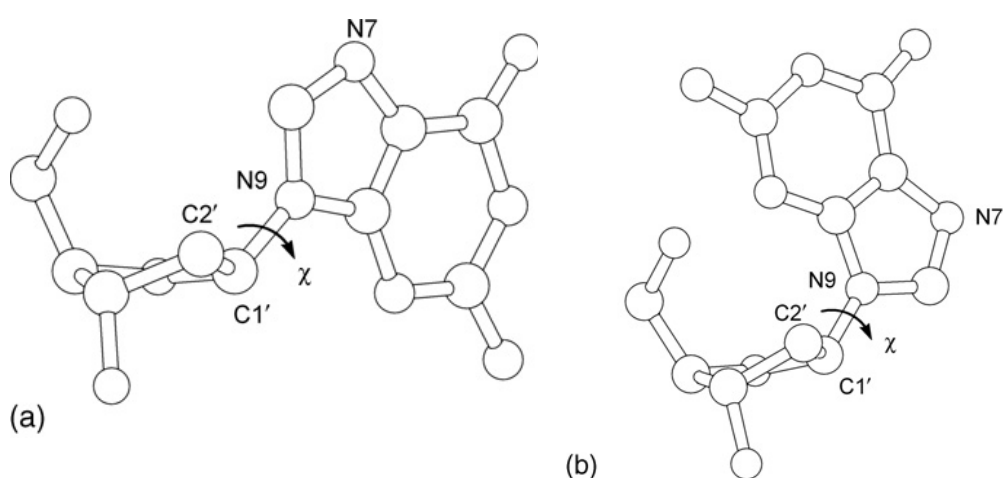


Obrázek 3 - a) *C2'-endo* konformace ribózy pro guanosen, spodní obrázek představuje rovinný řez. b) *C3'-endo* konformace ribózy pro guanosen, spodní obrázek představuje rovinný řez. Převzato z [4].

U RNA i DNA se báze kovalentně váží na ribózu pomocí N-glykosidové vazby a spolu tvoří takzvané nukleosidy. Nukleosid, na který je připojena fosfátová skupina se pak označuje jako nukleotid. Jednotlivé nukleotidy jsou spojeny fosfodiesterovou vazbou. Tato vazba je spojnicí mezi 3'-OH hydroxylovou skupinou jednoho sacharidu s 5' fosfátovou skupinou následujícího sacharidu. Je základem propojení mezi jednotlivými nukleotidy v polynukleotidovém řetězci (obrázek 2) [3].

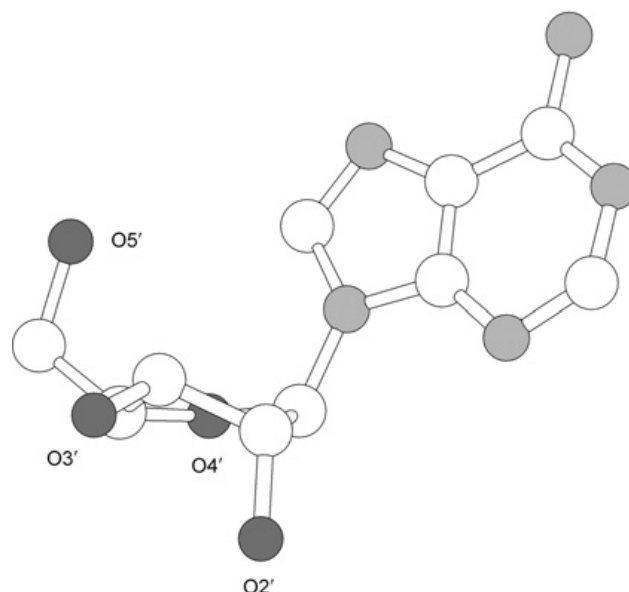
N-glykosidová vazba nukleových kyselin se nachází mezi atomy $C1'$ ribózy a $N1$ atomy u pyrimidinových nebo $N9$ u purinových bází. Torzní úhel okolo této jednoduché vazby je definován atomy $O4'-C1'-N1-C2$ pro pyrimidiny a $O4'-C1'-N9-C4$ pro puriny a označuje se χ . Rozeznáváme dvě základní konformace. Konformaci *anti* a konformaci *syn* [4].

Konformace *anti* má N1 a C2 atomy purinu a C2 a N3 pyrimidinu otočené směrem ven od cukru, a tak vodíkové atomy směřují k atomům C8 purinů a C6 pyrimidinů ležící nad ribózovým kruhem. U konformace *syn* je vodík vazující skupiny orientován přímo na O5'. U purinů je konformace *syn* méně preferovaná než konformace *anti*. Výjimkou je guanosin, který upřednostňuje konformaci *syn* z důvodu elektrostatické interakce mezi N2 aminoskupinou a 5'-fosfátovou skupinou (obrázek 4). Pro pyrimidiny je více charakteristická konformace *anti* z důvodu nepříznivé interakce mezi O2 a 5'-fosfátovou skupinou [4].



Obrázek 4 – A) Guanositový nukleosid s glykosidovou vazbou s χ v konformaci *anti*. B) Guanositový nukleosid v konfiguraci *syn*. Převzato z [4].

Efekt přítomnosti hydroxylové skupiny u ribózy RNA je významný v tom směru, že ribózy náležející RNA jsou rigidnější než u DNA. Ribóza přijímá konfiguraci C3'-*endo*. Atom 2'-OH se potom může vázat s atomy C8 purinu nebo C6 pyrimidinu ostatních bází. Atom 2'-OH' je orientován pouze několika směry jako výsledek interakcí s O3' a O4', nebo s jinou bází, se kterou bude tvořit vodíkovou vazbu. V helikální A-RNA struktuře je důležitá interakce mezi H2' a O4' následujícího residua, která nedovolí vodíkovou vazbu s molekulami vody [4].



Obrázek 5 - Ribonukleosid v A-RNA konformaci C3'-endo. Převzato z [4].

2.2 Párování bází v RNA

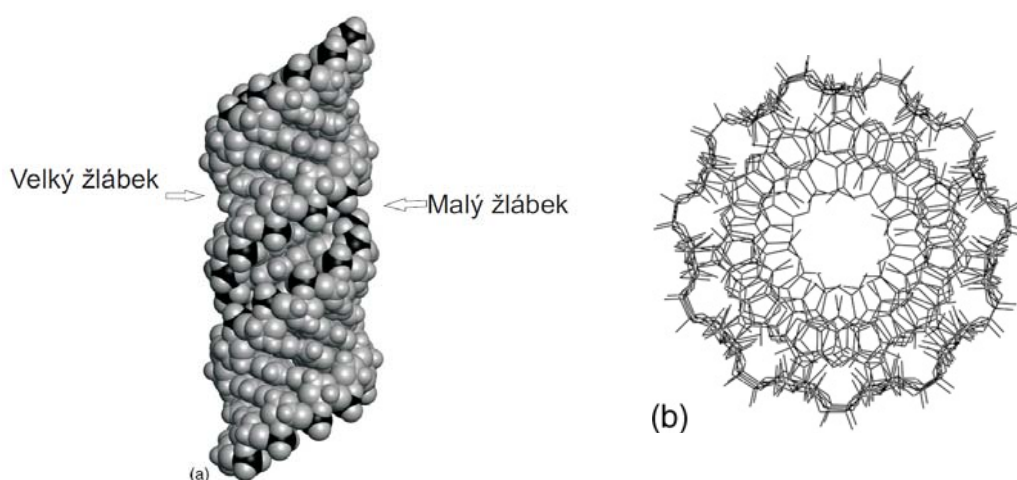
Ačkoli DNA a RNA jsou chemicky dosti podobné, v celkové struktuře se dramaticky odlišují. Molekuly RNA i DNA jsou ve vodném prostředí nabitě záporně díky fosfátovým skupinám. Na rozdíl od DNA se RNA snadno hydrolyticky štěpí v alkalickém prostředí na směs 2' a 3'-nukleotidů [5].

DNA se vyskytuje v jádře téměř bezvýhradně ve formě dvojšroubovice [6], platí zde pravidlo komplementarity, tzn. adenin se páruje s thyminem (A-T) a guanin se páruje s cytosinem (G-C), toto párování nazýváme kanonickým. Dvojšroubovice DNA se vyskytuje ve třech možných uspořádáních. Tyto struktury nazýváme A-DNA, B-DNA a Z-DNA.

Za fyziologických podmínek se uplatňuje pouze B-DNA. Mezi charakteristické vlastnosti B-DNA patří antiparalelní uspořádání polyribonukleových řetězců a pravotočivost. Výška na jeden závit má rozměr 3,4 nm, průměr šroubovice 2 nm, šroubovice obsahuje deset párů bází na jednu otáčku. B-DNA se reverzibilně mění na A-DNA za podmínek, při kterých je obsah

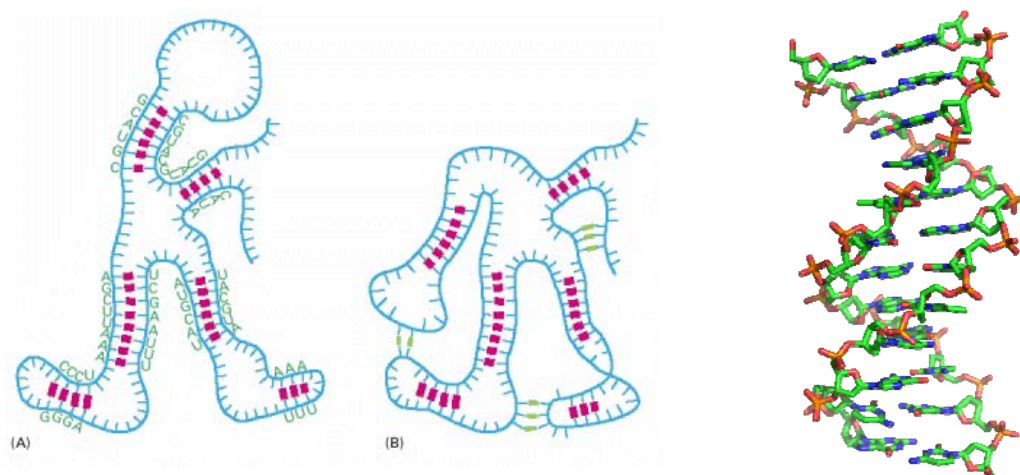
vody nižší než 75 %. A-DNA je na rozdíl od B-DNA širší. Jako poslední uvedená Z-DNA byla zkoumána za podmínek *in-vitro*, je levotočivá a pravděpodobně postrádá biologický význam, vyskytuje se v prostředí s vyšší iontovou silou [5].

RNA je jednovláknová a může se snadno skládat do různých tvarů podobně jako např. protein. Dvojšroubovice RNA se vyskytuje pouze jako A-RNA. Forma B-RNA neexistuje, protože se na riboze vyskytuje hydroxylová skupina. A-RNA obsahuje 11 bází na jednu otáčku, lze ji definovat jako šroubovici s úzkým a hlubokým velkým žlábkem a širokým, mělkým malým žlábkem (obrázek 6). Nejčastěji se A-RNA forma se nachází v polynukleotidových vláknech nebo poly(A)-poly(T) v prostředí s nízkou iontovou silou. V prostředí s vyšší iontovou silou dochází ke kontrakci polyribonukleotidového řetězce a tvoří se jiná forma A'-RNA, tzv. A'-RNA. A'-RNA obsahuje 12 bází na otáčku a vyjma tohoto si ponechává stejné helikální vlastnosti, kromě širšího velkého žlábkem, podobajícího se A-DNA [4].



Obrázek 6 – (a) Reprezentace A-RNA dvojšroubovice. (b) Pohled skrz osu dvojšroubovice A-RNA. Převzato z [4].

V RNA se vyskytují jak kanonické, tak nekanonické páry. Nekanonické páry nepodléhají pravidlu komplementarity (obrázek 7). Nekanonické páry charakterizoval Leontis [7] a blíže je daná problematika popsána v kapitole níže ve zdejší práci.

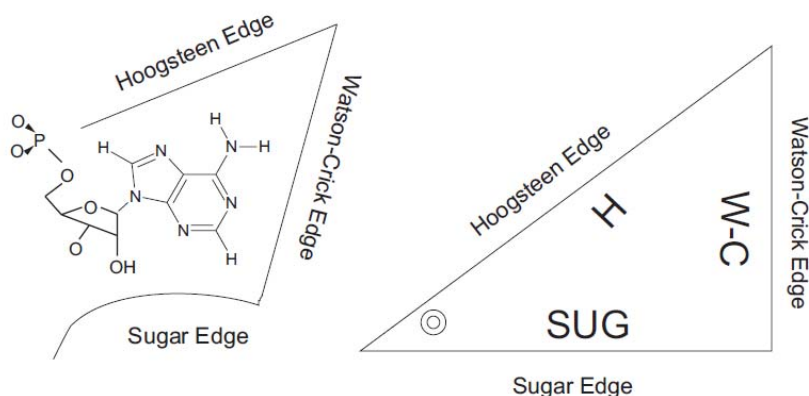


Obrázek 7 – RNA je jednovláknová, ale často obsahuje krátké úseky bází, které tvoří páry s bázemi nacházející se na kterémkoli místě na stejné molekule. Tyto interakce dovolují RNA se sbalit do 3D struktury. (A) Diagram RNA prezentující pouze konvenční interakce (červeně). (B) Struktura s konvenčními (červeně) a nekonvenčními (zeleně) interakcemi. Převzato z [8].

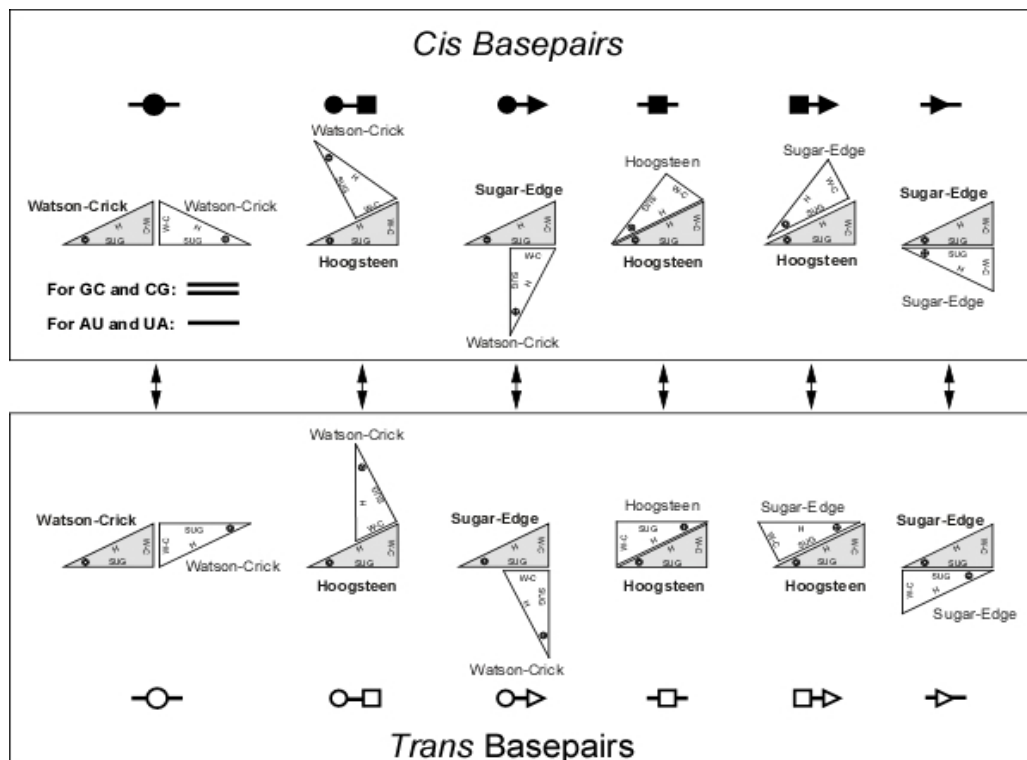
Struktura dvojšroubovice DNA, reprezentující pouze kanonické Watson-Crick páry. (PDB:1BNA) (vpravo).

Rychlý pokrok v krystalografii RNA ukázal bohatou škálu v párování bází a tím i složité terciární strukturní motivy. Zatímco jen asi 60-70% bází strukturovaných RNA jsou báze spárované v kanonickém Watson-Crickově módu, většina ostatních se účastní jiných interakcí. Z velké části je terciární struktura RNA určována pomocí párů, které nelze definovat jako Watson-Crickovy páry.

Každou RNA bázi lze pomyslně aproximovat pravoúhlým trojúhelníkem, jehož přepona představuje takzvanou Hoogsteenovu hranu (Hoogsteen edge) a odvěšny znázorňují Watson-Crickovu hranu (Watson-Crick edge) a hranu cukru (Sugar edge) (obrázek 8). Celkem tak RNA báze mohou být plně koordinovány okolními bázemi ze všech tří stran trojúhelníka. Hovoříme-li o párech bází, tak existuje dohromady 12 možných alternativ párování bází (obrázek 9).



Obrázek 8 – (vlevo) Chemická struktura purinového nukleotidu popisující tři hrany pro možné interakce. (vpravo) RNA báze jako trojúhelník. Trojúhelník je používán pro reprezentaci nukleotidů. Odvěšny trojúhelníka představují Watson-Crickovu hranu a hranu cukru, přepona trojúhelníka představuje Hoogsteenovu hranu. Kříž nebo kolečko v rohu, kde se potkávají Hoogsteen hrana a hrana cukru, indikuje orientaci cukr-fosfátové páteře ve vztahu k rovině stránky a to od 5' do 3' konce nebo 3' do 5' konce. Převzato z [7].




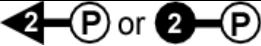








Obrázek 9 - Šest možných *cis* párů bází (nahore) a šest možných *trans* párů bází (dole). Převzato z [7].

Báze nukleových kyselin spolu interagují prostřednictvím patrových interakcí nebo vodíkových vazeb prostřednictvím vazeb „edge-to-edge“. Patrové interakce představují hybnou sílu pro skládání. Vodíkové interakce zase zprostředkovávají směrovost a specifičnost interakce [9].

Je vyvinuta metoda FR3D popisující opakující se tří-dimenzionální (3D) motivy v RNA. Tyto motivy lze definovat jako sady nukleotidů RNA s podobným prostorovým uspořádáním, které mohou být lokální nebo složené. Lokální motivy zahrnují nukleotidy, které se vyskytují na stejné vlásence nebo vnitřní smyčce. Složené motivy tvoří nukleotidy patřící třem nebo více různým RNA oblastem nebo molekulám [10].

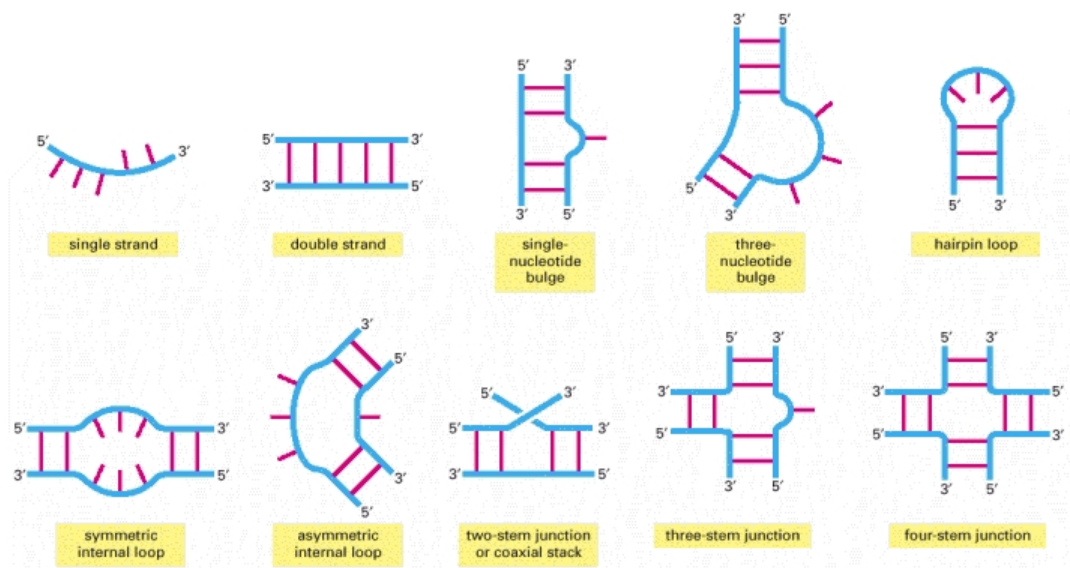
Program „Find 3D“ (FR3D) klasifikuje páry bází, patrové interakce nebo báze-fosfátové interakce. Každá báze je reprezentována geometrickou pozicí glykosidického dusíku ve 3D prostoru. Párování bází či patrové interakce jsou popsány podle symboliky Leontise [7]. Tento program slouží k vyhledávání konkrétních 3D motivů nebo podobných motivů [10].

Tabulka 1 – RNA báze fosfátové interakce.

No.	Vazebná strana	H-donor atomy	Symbol
1	Sugar edge	G(N2)	
2	Sugar edge nebo W-C	A(C2)	
3	W-C	G(N2)	
4	W-C	G(N2/N1)	
5	W-C	G(N1), U(N3)	
6	W-C	A(N6), C(N4)	
7	HoogSteen edge	A(N6), C(N4)	
8	HoogSteen edge	C(N4,C5)	
9	HoogSteen edge	C(C5), U(C5)	
10	HoogSteen edge	A(C8), C(C6), G(C8), U(C6)	

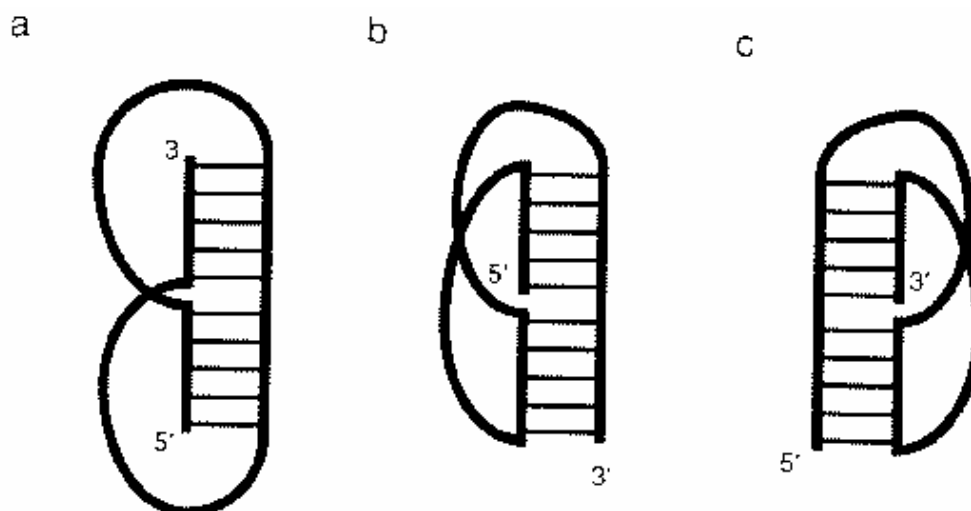
2.3 Sekundární a terciární struktura RNA

Jak již bylo zmíněno v kapitole 2.2, kanonicky i nekanonicky spárované báze se mohou objevit na stejném řetězci RNA. Tento jev umožňuje molekule RNA složit se jedinečným způsobem. Při porovnání mnoha struktur vyplynulo, že tyto krátké stavební prvky se ve větších strukturách vyskytují opakovaně. Sekundární struktura RNA je složena ze souborů šroubovic a smyček (loops), které mohou být rozděleny do šesti základních skupin: duplexy, jednovláknové regiony (single-stranded-regions), vlásenky (hairpin), vnitřní smyčky (internal loops), vyduté oblasti a zkřížené oblasti (obrázek10) [11].



Obrázek 10- Komplementární báze jsou označeny červenými „příčkami“. Převzato z [3].

Terciární struktura RNA zahrnuje interakce, které obsahují dvě dvojšroubovice, nespárované regiony nebo dva nespárované regiony a dvojšroubovici. Interakce mezi dvěma dvojšroubovicemi jsou dvojího druhu: buď dvě dvojšroubovice a přiléhající vlákno na každé straně, nebo dvě vzdálené dvojšroubovice, které interagují v malém žlábkku. Interakce mezi nespárovými regiony mohou tvořit tzv. „pseudoknoty“. Pseudoknot je definován jako element, jehož smyčka se páruje s komplementární sekvencí na druhé straně smyčky (obrázek 11) [12].



Obrázek 11 – a) smyčka na vrcholu protíná velký žlábek a smyčka na spodní straně protíná malý žlábek
 b) jedna smyčka protíná velký žlábek a druhá smyčka přemostuje celý helix
 c) jedna smyčka protíná malý žlábek a druhá smyčka přemostuje celý helix
 Převzato z [11].

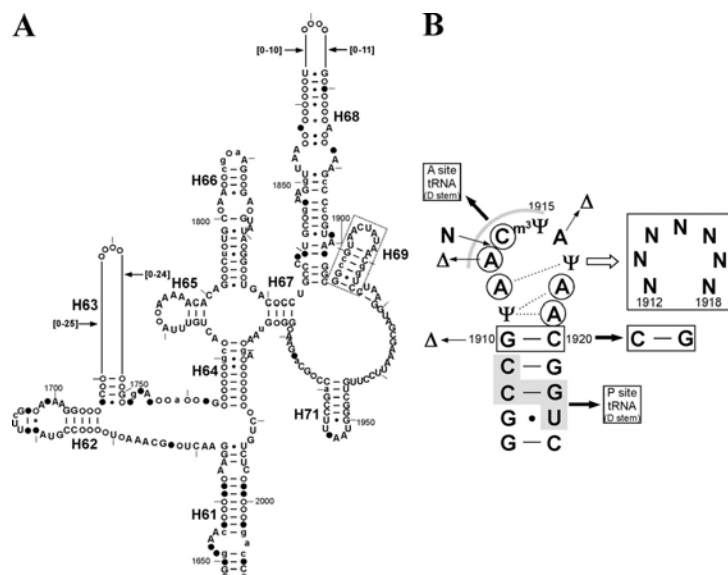
Interakce mezi nepárovým regionem a dvojšroubovicí může také vytvořit mnoho motivů, např. jedno vlákno se zaplete do dvojšroubovice za vzniku trojšroubovice.

Vlásenková (hairpin) struktura je jedna z nejhojnějších sekundárních elementů v RNA. Vlášeny hrají důležité strukturální a funkční role např. poskytují nukleární místa pro RNA skládání. Tetraloop se vyskytuje častěji v RNA a tímto pojmem se označuje asi 55% všech vlásenkových smyček v rRNA. u organismu *E. coli*. Struktura tetraloop je složena z ramene tvořeného Watson-Crickovými páry a smyčkou ze čtyř nespárovaných bází. Asi 70% tetraloop v patří do rodiny UNCG nebo GNRA, kde N je libovolná báze a R je purin. Mnoho RNA tetraloop tvoří kompaktní a stabilní struktury, které vyžadují neobvyklé interakce např. báze-báze, báze-cukr, báze-fosfát [13].

2.3.1 Vybrané ribozomální motivy

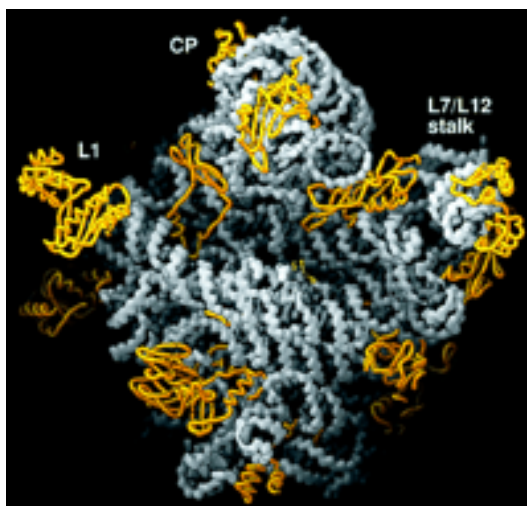
V této podkapitole bych ráda popsala funkce některých motivů v ribozomu. Pro přehlednost se určité úseky v ribozomu pojmenovaly, vyskytují se v různých organismech skoro ve stejné podobě pouze s malou obměnou např. došlo k nahrazení jedné báze za jinou. Motivy mají obecně důležitou roli při kontrole translace a některé se do ní přímo zapojují (např. helix 69, protein L7/L12, sarcin-ricin loop, L1 stalk a helix 44).

Helix 69 (H69) je vysoce konzervovaný motiv ve 23S RNA v 50S podjednotce. Je lokalizován na povrchu, kde se velká podjednotka spojuje s helixem 44 v malé podjednotce prostřednictvím B2e mostu. H69 hraje důležitou roli v kontrole translace (obrázek 12) [14].



Obrázek 12 – A) 2D mapa organismu *E. coli* domény IV podjednotky 23 S rRNA. H69 je zobrazen obdélníkem. B) Sekvence H69 s modifikovanými bázemi Ψ a $m^3\Psi$. Residua (1912, 1913, 1914, 1918, 1919) důležitá pro kontakt s mostem B2a jsou v kolečku. Residua, která jsou důležitá pro kontrolu translace jsou zobrazeny šedým obloukem (1913-1915) a šedým pozadím (1908-1909 a 1922-1923). Delece a vložené mutace jsou reprezentovány Δ . Převzato z [14].

Protein L7/L12 se vyskytuje v interakcích s translačními faktory během biosyntézy. Toto místo, lokalizováno v 50S podjednotce, stimuluje G faktory závislé na GTP hydrolýze. L7/L12 protein je také nezbytný pro interakci s iniciačními a terminačními faktory [15], [16] (obrázek 13).

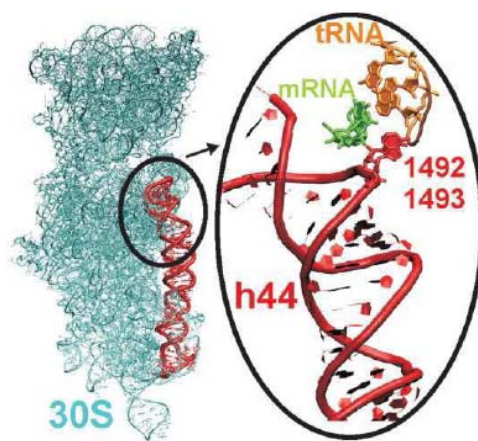


Obrázek 13 – Model velké ribozomální podjednotky s vyznačenými strukturami L1 stalk a L7/L12.

Sarcin–ricin loop (SRL) v helix 95, obsahuje jednu z nejdelších univerzálních konzervovaných rRNA sekvencí, je primární součástíka ribozomálního elongačního cyklu a také je nezbytný pro GTP-katalýzu v translaci, ale přesná funkce zatím není známa [17] .

L1 stalk je pohyblivá doména ve velké ribozomální podjednotce, L1 stalk v E místě v ribozomu mechanicky posouvá deacylovanou tRNA během proteinové syntézy. L1 stalk obsahuje protein L1 a helixy 76, 77, 78. Cryo-EM a RTG studie ukazují, že L1 stalk se vyskytuje nejméně ve třech konformacích. RTG struktury ribozomů s prázdným E místem nebo studie s izolovanou 50S podjednotkou našly L1 stalk v „otevřené“ konformaci, která je orientovaná směrem od hlavní části podjednotky. Díky vysoké flexibilitě L1 stalku není možné pořídít jeho RTG snímek ve vysokém rozlišení [18] (obrázek 13).

Helix 44, v doméně I na podjednotce 50S můžeme považovat za dešifrovací centrum. Je to nejdelší helix v ribozomu, jeho délka v bakterii *Thermus Thermophilus* je 93 bází (PDB: 1J5E, rezidua: 1404-1497). Podílí se na spojení obou podjednotek prostřednictvím několika hlavních vazeb (např. RNA-RNA nebo RNA-protein, atd.). Helix 44 hraje významnou roli v translokaci tRNA. Zejména horní část se chová jako dynamická doména, která je společně s mRNA/tRNA komplexem posouvána z A-místa do P-místa elongačním faktorem, následuje hydrolýza GTP [19] (obrázek 14).



Obrázek 14 – Vlevo se nachází pozice helixu 44 v 30S podjednotce (kyan), červeně je znázorněn helix 44. Vpravo je znázorněn detail helixu 44 s bázemi 1492A a 1493A, které rozpoznávají codon –anticodon prostřednictvím A_minor interakce. (PDB: 1J5E). Převzato z [19].

Loop E je součástí ribozomální podjednotky 5S, která náleží velké ribozomální podjednotce 50S. Loop E patří mezi nejdelší a nejkonzervovanější nekanonické šroubovice. Bakteriální loop E se skládá ze dvou submotivů. První interaguje s L25, zatímco druhý interaguje s 23S rRNA. Loop E u archebakterií a eukaryot je identický se sarcin-ricin motivem [20].

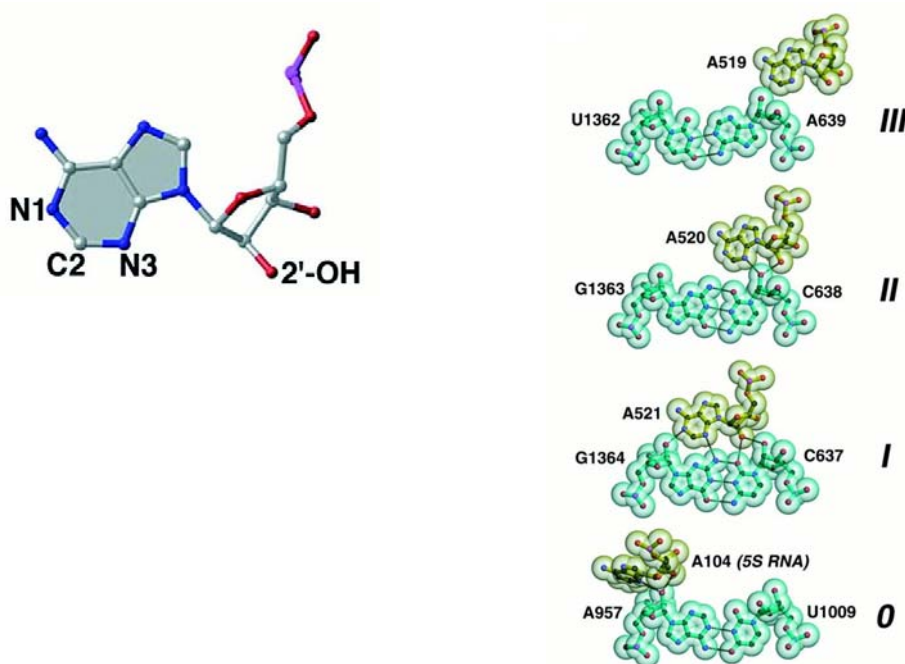
2.3.2 A-minor interakce a P-interakce

Krystalová struktura velké podjednotky ukazuje, že existují početné strukturální motivy, které stabilizují strukturu celého ribozomu. Jedním z motivů/interakcí je A-minor motiv/interakce. A-minor motiv je charakteristický tím, že dovoluje vsunutí jednoho helixu, který obsahuje v malém žlábků adeniny do druhého helixu, který obsahuje G-C páry. A-minor motivy stabilizují kontakty, např. mezi helixy, interakce mezi klouby a helixy, konformace s křížením (angl. conformational junction). Příkladem A-minor interakce je interakce mezi 3' koncem tRNA navázaného buď na A nebo na P místo na ribozomu.

A-minor interakce může mít větší význam při stabilizaci terciární struktury RNA než klasické párování bází. Pokud se v RNA vyskytují konzervovaná rezidua, stejně jako např. v proteinech, mohou být tato rezidua rozhodující pro funkci nebo

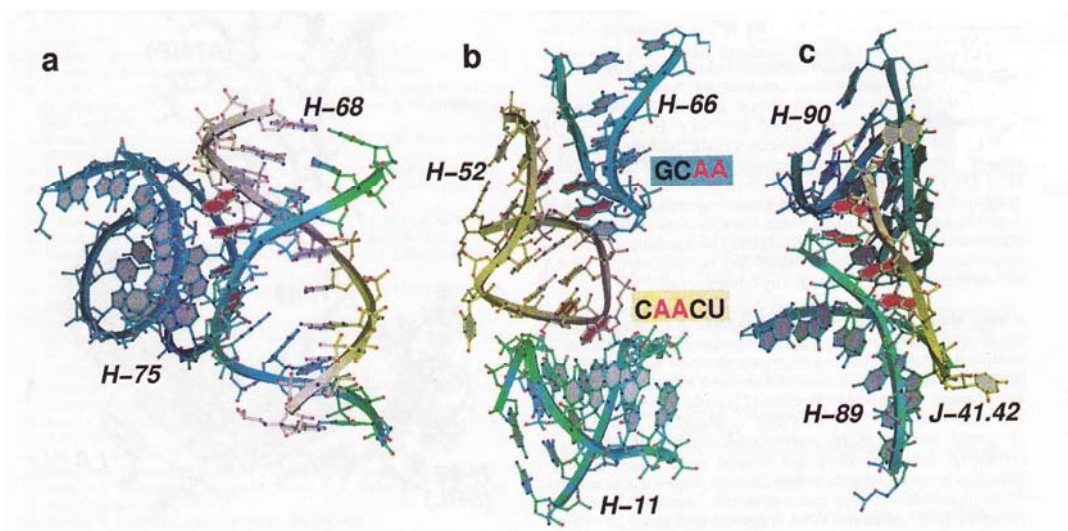
mohou být úzce zapojena do specifických terciárních struktur. Studie podjednotky 50S prozrazují, že adenin je nejhojnější konzervovanou bází podílející se na stabilizaci terciární struktury. O adeninech, které se účastní se A-minor interakcí říkáme, že tvoří tzv. „patches“ (skvrna, flek). Počet adeninů v „patches“ patří stejné RNA, zřídka převyšuje tři a platí obecné pravidlo, které říká, že A-minor interakce tvořené takovými adeniny jsou řízeny od 5' do 3' konce [21].

Existují čtyři varianty A-minor motivu. Tyto čtyři varianty se rozlišují podle vazeb mezi atomy O2' a N3 náležející adeninu vůči receptoru (např. helixu). Ve variantě I jsou oba atomy (O2' a N3) v malém žlábků receptoru, toto uspořádání optimalizuje fit adeninu a v tomto případě se dosáhne maximálního počtu vodíkových vazeb. Ve variantě II je atom O2' adeninu blízko atomu O2' receptoru, zatímco atom N3 adeninu je v malém žlábků. Ve variantě III jsou oba atomy adeninu lokalizovány blízko atomu O2' receptoru. Poslední a vzácná varianta A-minor motivu je nazývána jako nultá. V nulté variantě je atom N3 adeninu směřován směrem od malého žlábků a atom O2' není vůbec zainteresován do vazby s receptorem [21] (obrázek 15).



Obrázek 15 – Atomy adeninu (N1, N3, O2') umožňují tvořit A-minor intakci v malém žlábků RNA šroubovice (vlevo). Příklady čtyř hlavních A-minor interakcí nalezených v organismu *H. Marismortui* v 50S podjednotce. Převzato z [21].

Varianta 0 a III nejsou ani specifické ani selektivní. Oproti tomu jsou varianty I a II vysoce specifické. Jenom tyto varianty (I a II) jsou schopné se pohodlně naitovat do malého žlábků a tvořit vodíkové vazby (obrázek 16) [21].



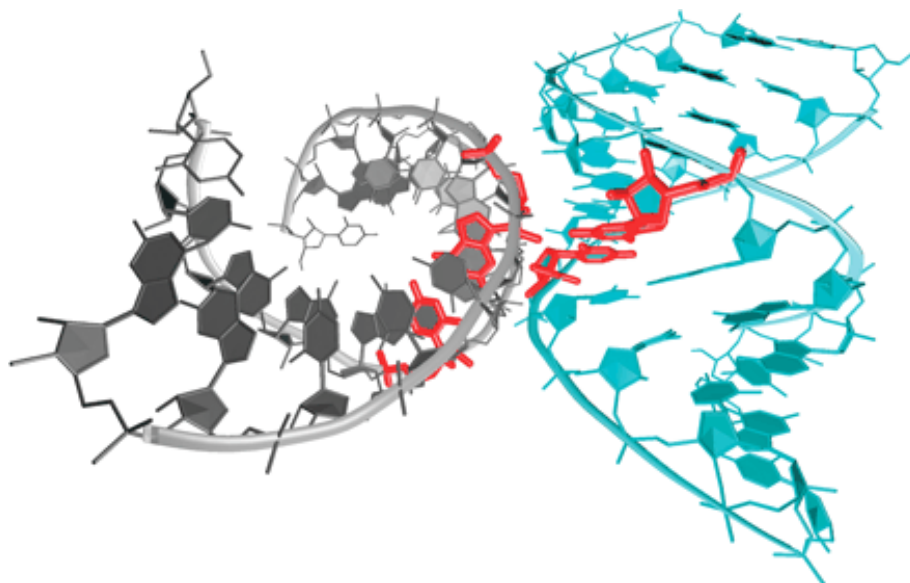
Obrázek 16 - Příklady RNA terciárních struktur stabilizovaných A-minor interakcemi v ribozomu organismu *Haloarcula marismortui* (PDB: 1FFK).

A) A-minor interakce stabilizuje helix 68 z domény IV (zelená a žlutá) s helixem 75 z domény V (modrý). Čtyři adeniny (červeně) tvoří patrovou interakci a tato interakce dovoluje vnoření adeninů do malého žlábků helixu 75.

B) A-minor interakce je také velmi důležitá jako prostředník v interakcích loop-loop, jako v případě helixu 66 (modrý) + 52 (žlutý) + 11 (zelený).

C) Jednovláknové křížení mezi helixy 41 a 42 (J41.42, žlutá) poskytuje adeniny pro A-minor interakci a tak stabilizuje helix 89 (zelený) a helix 90 (modrý). Převzato z [21].

Existuje interakce, která je méně častá, ale zato více robustní než A-minor interakce. Tato interakce byla nazvána jako P-interakce (obrázek 17). Tuto interakci můžeme najít mezi O2' ribózou na jednom helixu (G-C páry), která interaguje prostřednictvím vodíkových vazeb s druhým helixem (G-U páry). Počet vodíkových vazeb může být až pět. Toto seskupení molekul je jedinečné a vysoce konzervované. Hlavní rolí P-interakce je definovat dlouhodobé terciární kontakty v ribozomu [22].



Obrázek 17 – Nukleotidy tvořící interakci jsou znázorněny světle modře. Převzato z [23].

Přítomnost těchto klíčových interakcí stabilizuje přesnou ribozomální architekturu. Obě interakce, A-minor a P-interakce, tvoří dynamické kontakty a spínače (switches), které se vyskytují ve velkém měřítku během translokace v ribozomu [23].

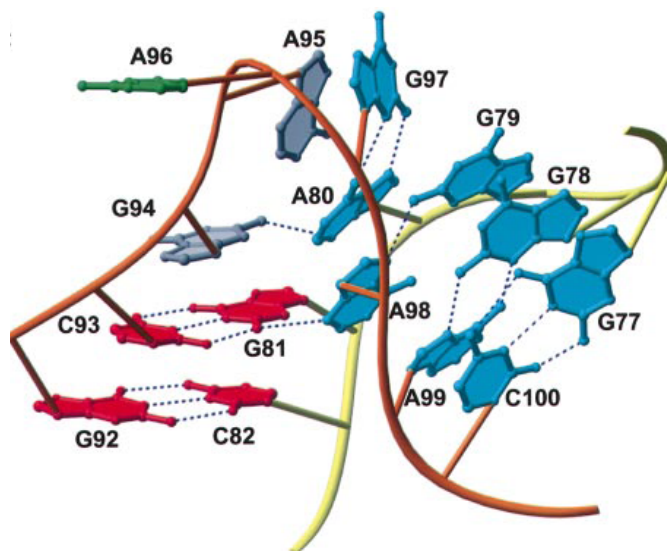
2.3.3 Kink-turn motivy

Kink-turn (Kt) motivy se vyskytují v obou podjednotkách ribozomu, ale i neribozomálních biomolekulách. V ribozomu se často vážou na ribozomální proteiny, zprostředkovávají interakce s RNA a mohou hrát důležitou roli během skládání RNA [24]. Neribozomální zástupci kink-turn motivů byly nalezeny nejčastěji v mRNA [25] a v molekulách označovaných jako „riboswitches“ [26]. Některé z nich byly nalezeny ve snoRNAs (malé jadéřkové RNA, uplatňující se při sestřihu RNA), např. U3 snRNA a U4 snRNA [27].

Ribozomální Kt-motivy jsou lokalizovány blízko důležitých míst, které se přímo účastní translace. Do translace jsou zainteresovány i nepřímo, tj. spolupodílí se na pohybech ribozomu, které jsou pro translaci esenciální. Kt-motivy v ribozomu mohou sloužit jako doplňkové strukturní motivy či mohou mít funkci prostředníka např. jako mosty v případě Kt-58, který je v kontaktu se šroubovicí

34 v 23S rRNA a společně s proteinem S15 a šroubovicí 20 (v 16S rRNA) tvoří most B4 [28].

Kink-turn lze charakterizovat jako dvouvláknový motiv tvořený dvěma helikálními rameny oddělenými regionem nespárovaných bází. První rameno je kanonické (C-stem). To znamená, že je tvořeno pouze Watson-Crickovými páry, zpravidla G-C páry. Druhé rameno je nekanonické (NC-stem). To znamená, že se zde mohou vyskytovat páry, které nepodléhají pravidlu komplementarity podle Watson-Cricka, nejčastěji G-A páry. Obě ramena jsou spojena kloubem (regionem nespárovaných bází). Tento kloub je vždy nesymetrický a obvykle má tři nespárované báze na jednom vlákně. Jedna báze je součástí C-stem, druhá je součástí NC-stem a třetí vyčnívá. Jednu bázi, která vyčnívá, označujeme jako „bulge“, a protože není spárována, může volně interagovat s jakoukoli bází či proteinem. Kink-turn motivy mají charakteristickou 3D strukturu, která připomíná písmeno „V“. Úhel, který svírají obě ramena, se pohybuje kolem hodnoty 60°. Typický tvar písmene „V“ je stabilizován interakcí A-minor. Tato interakce se nachází mezi C-stemem (kterému náleží C-G páry) a NC-stemem (obsahující adenin) [29] (obrázek 18).



Obrázek 18 - Kink-turn nalezený v helixu 7 (Kt-7) z organismu *H. marismortui* ve 23S podjednotce. Kanonické rameno v tomto případě obsahuje C82-G92 a G81-C93 a je zakončeno nepárovým G94. A95 je nepárový a dovoluje patrovou interakci k nekanonickému stemu. A96 očividně vyčnívá ven ze struktury a netvoří tak žádnou interakci se zbytkem motivu. Cukr-fosfátová páteř je ohnutá zhruba o 120°. Převzato z [29].

Kink-turn motivy obsahují celkem 10 konzervovaných bází. Tyto báze jsou klíčové pro stabilitu motivu. Pro definici kink-turn motivu [29] byl příkladem lidský U4 snRNA motiv. S výjimkou jednoho U-G páru je na C-stemu vždy G-C nebo C-G párování. Je tu silná tendence C-G sousedit se smyčkou. Druhý pár je důležitý pro vznik A-minor interakce. NC- stem obsahuje dva G-A páry. Adenin z druhého G-A páru stabilizuje smyčku a tvoří A-minor interakci s G-C párem situovaným v malém žlábkou [29].

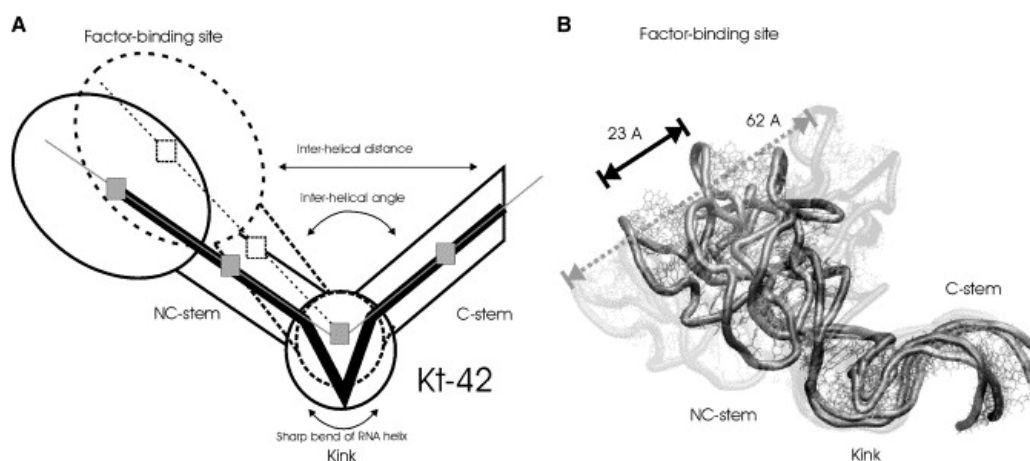
Struktura volného kink-turnu je velmi dynamická a závislá na vazbě kovových iontů nebo na L7Ae-proteinu. Při absenci navázaných proteinů existují kink-turn v rovnováze mezi stavy, kde je pevně zalomený či naopak narovnaný. Poměr těchto stavů je určen koncentrací iontů kovu. Při elektroforéze zalomená struktura migruje pomaleji než otevřená [30]. FRET měření (fluorescence resonance energy transfer, fluorescenční rezonanční přenos energie) ukazují, že v kink-turnu dochází k přechodu mezi dvěma strukturami. Toto zjištění je v souladu s molekulární dynamikou (MD) [31], která předpověděla strukturální bistabilitu kink-turnů. Data z měření FRET naznačují, že přechody mezi zalomeným a narovnaným stavem jsou rychlé [32].

Experimentální techniky mohou být doplňovány poznatky ze simulačních metod, které jsou realizovány pomocí výpočetní techniky. Výpočetní techniky jsou omezeny časem v řádech nanosekund nebo nedokonalostmi silového pole. Kvalitativní simulace poskytuje informace o struktuře a dynamice molekul RNA, které nelze získat jinými technikami [33]. Nanosekundové časové simulace umožňují studovat vnitřní dynamiky Kt v X-ray-geometriích za nepřítomnosti sousedních ribozomálních segmentů. Vnitřní mechanické vlastnosti volných Kt v simulacích pomáhají pochopit jejich interakce s jinými molekulami, zahrnující vzájemné strukturální úpravy, které se tvoří u větších komplexů biomolekul [34].

Nedávné MD simulace izolovaných KT-38, KT-42, KT-58 a KT-U4 vykazují značnou flexibilitu těchto motivů na časové škále v řádech nanosekund [34]. Jejich dynamika spočívá v pohybu dvou pevných ramen, která jsou kontrolována flexibilní vnitřní smyčkou. Je zajímavé, že i přes výraznější dynamiku, klíčové terciární interakce zcela zůstaly v simulacích stabilní. Kt tak mohou být považovány za pružný molekulární pant, který vykazuje mnoho

konformačních stavů kolem jejich ribozomální X-ray geometrie. Otevírání a zavírání Kt souvisí s lokální dynamikou např. vložení vody, souvisí také s A-minor interakcí mezi rameny [34].

V příkladu motivu Kt-42 je dynamika překvapivě propagována bez útlumu celého systému, který se chová jako velký molekulární pant. Pohyb pantu zcela převládá a v simulaci nebyly detekovány žádné jiné srovnatelné flexibilní prvky (obrázek 19). Kt-42 je tak jediným kandidátem, který nabízí určitou pružnost vazebnému místu pro faktor. Simulace ukazuje stochastické oscilační posuny hlavy faktoru vazebného místa v rozsahu desítek Å s ohledem na C-stem Kt-42 vůči helixu 42. Rozsah pohybů v simulaci převyšuje rozsah pohybů dosud publikovány v kryo-EM studiích [34].



Obrázek 19 – Dynamické chování z Kt-42. (A) Schéma: Čtverce reprezentují centra jednotlivých elementů. Tečkovaná čára indikuje uzavřený stav, zatímco plná čára indikuje otevřený stav.

(B) Zavřený kink-turn (černá), otevřený kink-turn (šedá), nejvíce otevřená (transparentní šedá) a nejvíce zalomený kink-turn (transparentní šedá). Tvar Kt, při kterém je struktura nejvíce otevřená a nejvíce zalomená ukazuje maximální amplitudy během simulace, otevřené a uzavřené konformace popisují statisticky významné oscilace. Převzato z [34].

Kt jsou také spojovány s důmyslnou sítí dlouho-dosahových hydratací a kation vazebných míst, z nichž mnohé jsou přímo modulační pro Kt dynamiku a flexibilitu.

Kt vykazují trvalé konformační přechody v simulacích a měly by být klasifikovány jako flexibilní prvky s širokou škálou isoenergetických geometrií.

2.4 Ribozom

Ribozom je jeden z největších a nejsložitějších biomolekulárních strojů, které doposud známe. Ribozomy obsahují ribozomální RNA (rRNA) a proteiny, které jsou obecně uspořádány do dvou nerovnoměrně velkých podjednotek. Ribozomy jsou jaderné organely a mohou se vyskytovat volně nebo vázané na drsné endoplasmatické retikulum. Volné ribozomy mohou existovat samostatně nebo se na jednu mRNA naváže několik ribozomů a vytvoří tak polyribosom. Hlavní úlohou ribozomu je syntetizovat proteiny. Molekulová hmotnost ribozomu u bakterií je přibližně 2,5 MDa [35].

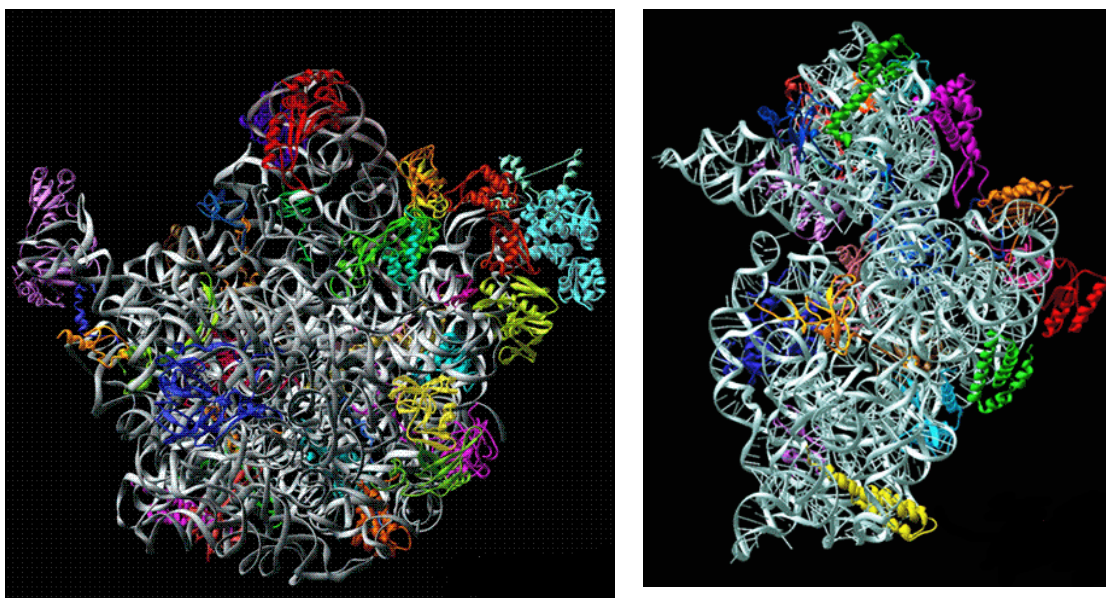
Okolo roku 1980 byla snaha krystalovat velké komplexy, ribozom byl bohužel moc velký a tehdejší technologie nesplňovala kritéria pro takový komplex jako je ribozom. Navíc nebylo jasné, zda ribozomy v buňce jsou identické nebo složené z několika rodin a zda je každý specifický pro nějakou úlohu. Velkým úspěchem v devadesátých letech bylo vytvoření reálného 3D krystalu velké podjednotky (50S) z organismu *Geobacillus stearothermophilus* (dříve *Bacillus stearothermophilus*) [36]. O několik let později byly získány RTG snímky malé 30S podjednotky a velké 50S podjednotky bakterie *Thermus thermophilus* [37]. Tyto první krystaly měly velmi nízké rozlišení pohybující se okolo 10 Å. Po rozsáhlých výzkumech vyžadujících několik odlišných organismů bylo dosaženo rozlišení 3 Å a ukázalo se, že je možné dosáhnout vysokého rozlišení na atomární úrovni i na takových velkých komplexech jako jsou ribozomy [38].

Ribozomální podjednotky prokaryot a eukaryot jsou dosti podobné. Ribozom prokaryot je menší, ale častěji zkoumaný než ribozom eukaryot.

Prokaryotní ribozom je tvořen malou podjednotkou 30S a velkou podjednotkou 50S, které spolu asociují do aktivního ribozomu 70S. Velká podjednotka se dělí na 5S podjednotku (obsahuje asi 120 bází) a 23S podjednotku (obsahuje asi 2900 bází), kromě rRNA obsahuje také 34 proteinů. Malá podjednotka 30S se dělí na 16S podjednotku (obsahuje asi 1500 bází) a 21 proteinů [3], [39].

Eukaryotní ribozom se skládá z malé podjednotky 40S a velké podjednotky 60S, které spolu tvoří ribozom 80S. Velká eukaryotní podjednotka je tvořena

podjednotkami 5S (120 bází), 23S (4700 bází), 16S (160 bází) a přibližně obsahuje 50 proteinů. Malá podjednotka 30S obsahuje 1600 bází a přibližně 33 proteinů [3], [39].

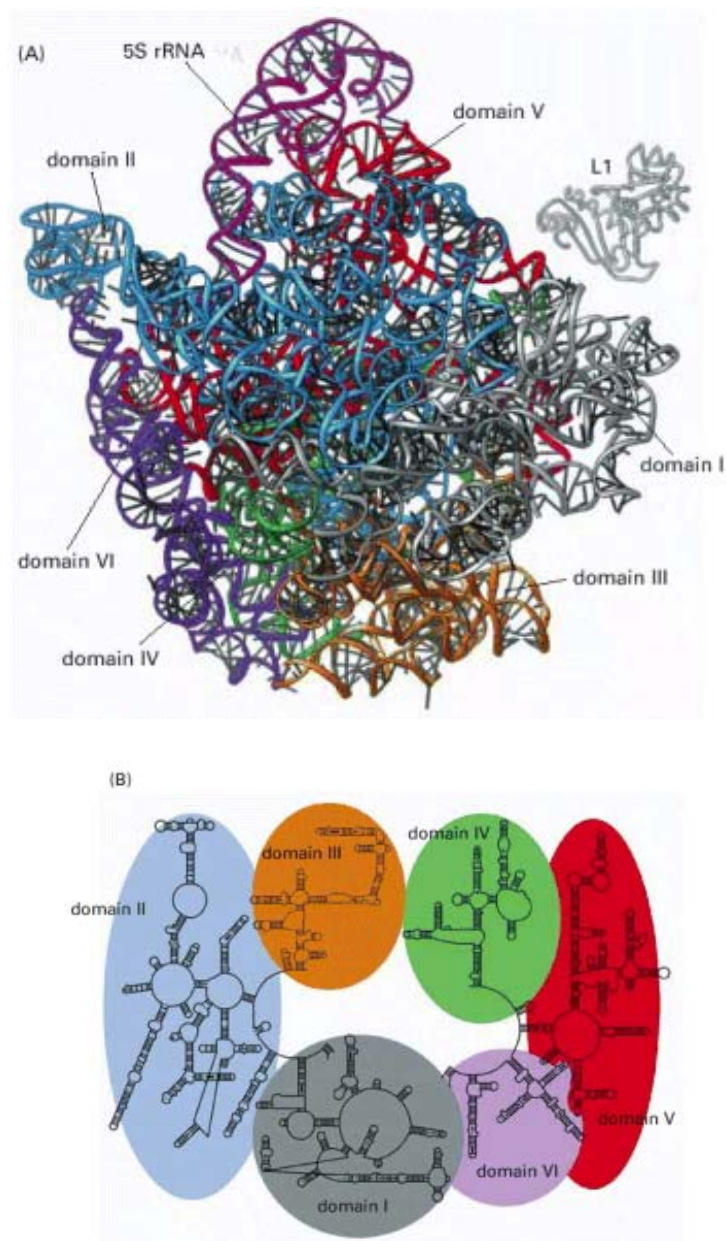


Obrázek 20 - Velká podjednotka ribozomu z organismu *Deinococcus Radiodurans* (50S) (PDB: 1KC9) vlevo a malá podjednotka (30S) (PDB: IQD7) ribozomu z organismu *Thermus thermophilus* vpravo. Barevně jsou odlišeny proteiny a šedou barvou je reprezentována RNA. Převzato z [40].

Malá podjednotka je zodpovědná za rozpoznání počátečního kodonu na mRNA, od kterého se začíná syntetizovat protein. Velká podjednotka katalyzuje vznik peptidové vazby mezi aminokyselinou a peptidovým řetězcem. Obě podjednotky se spojují na molekule mRNA blízko jejího 5' konce.

Ribozomální RNA jsou sbalené do vysoce kompaktních struktur. Ribozomální proteiny jsou obecně lokalizovány na povrchu a zanořují se do štěrbin ve sbalené RNA a tak stabilizují celý komplex.

Ribozom se rozděluje na několik domén, bakteriální ribozom obsahuje zpravidla šest domén (obrázek 21) [3].



Obrázek 21- (A) 3D struktura velké ribozomální podjednotky rRNA (5S a 23S) archebakterie *Haloarcula Marismortui*. (B) Schematický diagram 23S rRNA, ukazující rozsáhlou síť párů bází. Struktura je rozdělena do šesti domén, které barevně odpovídají doménám na obrázku A. Převzato z [3].

3. Metody

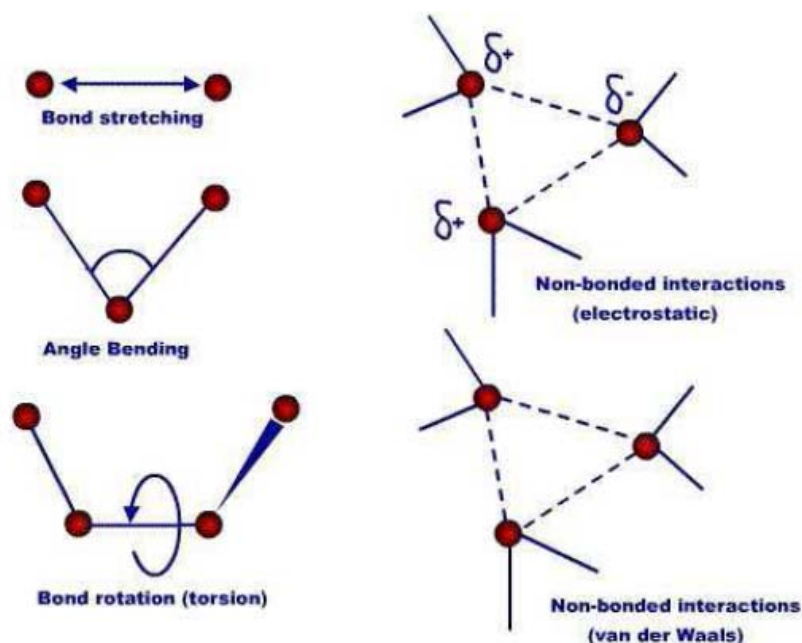
Statický pohled na biomolekulu, získaný z X-ray krystalografie, je stále nedostatečný pro pochopení široké škály biologických vlastností a aktivity. Molekulová dynamika představuje speciální disciplínu molekulového modelování, která je založena na základech molekulové mechaniky. Rovnovážné vlastnosti molekulového systému se získají rozřešením číselných Newtonových rovnic pohybu na atomistickém nebo jednoduchém modelu. Obecně je MD deterministická metoda, která vzorkuje konfigurační prostor v závislosti na časovém vývoji systému. Výsledkem MD je trajektorie, která upřesňuje, jak se měnily pozice a rychlosti v čase. Trajektorie také obsahuje informace týkající se strukturních a dynamických vlastností systému [41].

Celková energie systému, která je běžně užívána programem AMBER, je dána součtem kinetických potenciálních energií (rovnice 1). Potenciální energie je počítána jako součet jednotlivých výrazů popisující vazebné a nevazebné interakce v systému [41].

$$E_{pot} = \sum_{bonds} K_r (r - r_0)^2 + \sum_{angles} K_{\Theta} (\Theta - \Theta_0)^2 + \sum_{dihed} \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\varphi - \gamma)] + \sum_{vdw} \left(\frac{A_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{R_{ij}^6} \right) + \sum_{el} \frac{q_i q_j}{\epsilon R_{ij}}$$

Rovnice 1 – Potenciální energie je počítána jako součet jednotlivých výrazů popisující vazebné a nevazebné interakce v systému. Převzato z [42].

První tři výrazy na obrázku 22 popisují vazebné interakce a zbývající dva výrazy popisují nevazebné interakce.



Obrázek 22 – Schématické znázornění všech typů interakcí, které jsou použity v rovnici 1. Převzato z [41].

Prvním výrazem v rovnici 1 jsou párově aditivní empirické potenciály reprezentující součet energetických příspěvků odpovídající změnám délky vazeb (bond stretching). Druhým výrazem je součet energetických příspěvků popisující změny úhlů. Oba, vazebná délka a vazebný úhel (vyjádřeny z Hookova zákona), jsou počítány jako kvadratické funkce jejich parametrů. Třetím výrazem je součet energetických příspěvků související s rotací okolo vazby a je obvykle reprezentován Fourierovými periodickými funkcemi. Čtvrtým výrazem je součet van der Walsových energií popisující atrakci nebo repulzi mezi atomy, které nejsou přímo vázány. Repulzivní a atrakční člen jsou velká čísla, která po odečtení jednoho od druhého dají malé číslo směřující k nule. Van der Waalsův člen je prakticky popsán jako 12-6 Lennard-Jonesův potenciál. Poslední výraz reprezentuje Coulombický potenciál a lze jej definovat jako Coulombickou energii nabitých párů atomů v systému [41].

Gradient potenciální energie je daný rovnicí 2 a působí na všechny atomy v systému.

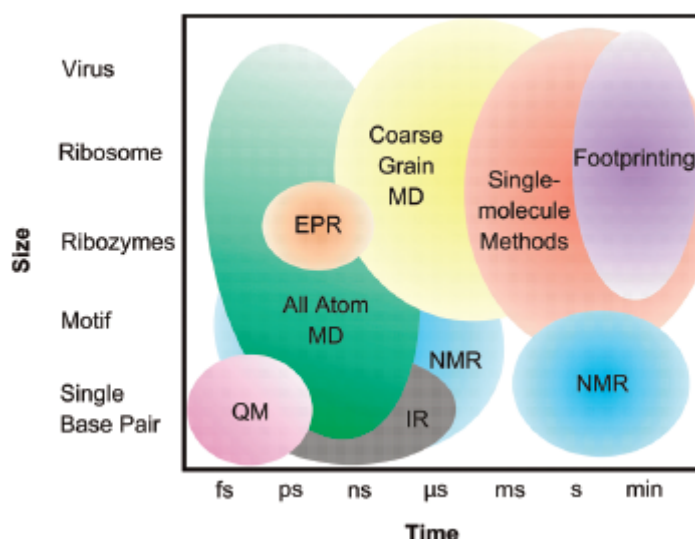
$$F_i = \frac{-\partial E_{pot}}{\partial r_i} \quad (2)$$

Rovnice 3 udává nové pozice všem atomům systému pro každý časový krok. Popisuje pohyb části hmoty (mass = m_i) s \mathbf{F}_i v závislosti na \mathbf{r}_i .

$$\frac{d^2 r_i}{dt^2} = \frac{F_i(r_i)}{m_i} \quad (3)$$

Kompletní pochopení molekulové dynamiky, uplatňované např. na RNA, vyžaduje časový monitoring od pikosekund až po několik hodin (obrázek 23). Vyžaduje také použití široké škály technik s uvážením prostoru a limitací [43].

První limitací je škálování konformačního prostoru na krátkou časovou škálu MD v porovnání s aktuálními biologickými procesy. Tato limitace se pomalu stává překonanou z důvodu technologického pokroku v oblasti výpočetní techniky. Druhá, použití silových polí, které simulují přirozené prostředí [43].



Obrázek 23 - Velikost systému a časová škála technik běžně užívaných k vyhodnocení RNA dynamiky. Převzato z [43].

Počítačové metody poskytují porozumění nebo nahlédnutí do problematiky, která není dosažitelná experimentálně. Simulace molekulové dynamiky mohou identifikovat problematické stránky experimentálních struktur, odhalit významné fluktuace, předpovědět účinek ionizace bází na RNA dynamice nebo charakterizovat vlastnosti solventu. Kombinace simulací s kvantovou mechanikou (QM) nazýváme QM/MM a představují rozšíření repertoáru aplikací ohledně chemie katalytické RNA nebo ribozomů [44].

3.1 Molekulová dynamika

Molekulově dynamické metody používají klasická silová pole, která definují potenciální energii jako funkci atomových koordinát. Tyto jednoduché analytické funkce potřebují k popisu kovalentních vazeb a úhlů společně s torzními profily pro dihedralní úhly sadu harmonických oscilátorů (pružin). Atomy jsou popisovány jako van der Waalsovy sféry s konstantním nábojem v centru atomu. Silové pole je párově aditivní to znamená, že zanedbává všechny nepřidávané efekty („non additive effect“) např. polarizaci atomů v elektrickém poli. Parametrizace pro biomolekulární silová pole je složitý úkol [44].

Polarizační silová pole jsou ve vývoji a jejich budoucí aplikovatelnost je důležité předpovídat. Navzdory opatrným parametrizacím současných silových polí jsou stále daleko od dokonalosti.

3.1.1 Výběr silového pole pro RNA

Existují dvě silová pole, která byla testována na systémech DNA či RNA a jsou vhodné pro simulace nukleových kyselin, jmenovitě silová pole AMBER a CHARMM [44]. AMBER obsahuje originální silová pole vyvinuta Cornellovou a Kolmanem (parm94, parm98 (ff98), parm99 (ff99)). Silové pole a parmbc0 bylo vyvinuto Orozcem. Parametry pro atomové náboje u ff94 byly získány z elektrostatických potenciálů vypočítané pomocí metody HF/6-31G*, která přeceňuje molekulové dipólové momenty a tak nepřímou kompenzuje chybějící polarizaci kondenzovanou v simulacích. Silové pole ff98 a ff99 se od ff94 odlišuje jen okrajově. Silová pole ff94-99 jsou vhodné pro nukleové kyseliny [44]. Silové pole parmbc0 se od ff94-99 liší několika skutečnostmi, které upravují chyby ve výpočtech např. v simulacích B-DNA

V případě simulace B-DNA s použitím silových polí ff94-ff99 docházelo k nashromáždění nevratných substavů v páteři (α/γ) s γ tozním úhlem (okolo vazby C4'-C5') v pozici trans a to ve výsledku způsobovalo nevratné strukturální deformace v simulované B-DNA. Silové pole parmbc0 modifikuje α/γ dihedralní profil a tímto stabilizuje simulace B-DNA. V simulacích s použitím RNA se výše

pojmenované patologické substavy trans- γ nevyskytují a všechny silová pole (parm94-99) u systémů RNA ukazují podobné vlastnosti.

Dalším silovým polem pro nukleové kyseliny je CHARMM27. Toto silové pole popisuje kanonickou B-DNA relativně dobře, jen se zde vyskytují problémy se šířkou žlábků, které jsou méně přesné než u AMBER. CHARMM27 byl několikrát použit pro RNA, ale nebyl nikdy pro RNA systematicky a důkladně testován. V 5ns simulacích předpovídal CHARMM27 velmi rychlé párové dýchání (base-pairing breathing), které může indikovat podcenění síly párových interakcí. Simulace o délce 50 ns odhalily i jiné problémy např. postupnou degradaci RNA [44]. Nedávno bylo odhaleno selhání pole CHARMM27 pro UUCG tetraloop [46].

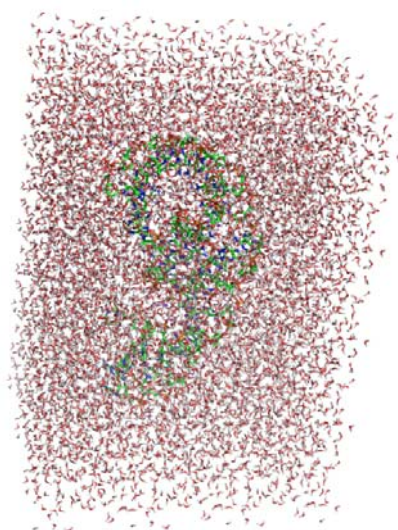
3.1.2 Nastavení používané v MD

Modelování biomolekul spočívá ve třech krocích: vytvoření modelu, spuštění MD simulace a poté následují analyzační výpočty vytvořených MD trajektorií.

Modelování biomolekul spočívá ve třech krocích: vytvoření modelu, spuštění MD simulace a poté následují analyzační výpočty vytvořených MD trajektorií.

Počáteční struktury pro MD simulace jsou získány z proteinové databanky (<http://www.rcsb.org/pdb>). Před spuštěním simulací je nutné zkontrolovat, zda se v motivu vyskytují vody a ionty. V této práci se pracovalo pouze s vystříženými úseky RNA a tak je nutné zkontrolovat interakce na okolí a vhodně tento motiv ukončit např. GC nebo CG páry. Vodíky byly přidány programem LEaP z balíku AMBER 10.0, cutoff pro nevazebné interakce byl nastaven na 10 Å. Náboj systému byl kompenzován přidáním několika protiionty Na^+ (motiv A_N – 25 iontů Na^+ , motiv A_L – 29 iontů Na^+ , motiv A_{SL} – 86 iontů K^+ , motiv B_N – 23 iontů Na^+ , motiv B_L – 42 iontů Na^+ , motiv B_S – 20 iontů Na^+ , motiv C_N – 38 iontů Na^+ , motiv C_S – 23 iontů Na^+ , motiv D_N – 31 iontů Na^+ , motiv D_L – 43 iontů Na^+ , motiv D_{Mg} – 43 iontů Na^+ , 3 ionty Mg^{2+}).

Systém byl poté umístěn do solvatačního boxu (obrázek 24) s modelem vod TIP3P, s nejmenší vzdáleností stěny od kubického boxu od povrchu solutu 10 Å. Během výpočtu MD je nutné zajistit periodické okrajové podmínky.



Obrázek 24 – Box s molekulami vody a uvnitř je RNA motiv (D₁). Box slouží jako prostor, ve které se MD počítá. Vytvořeno programem PyMOL.

Pro dynamiku všech motivů byl použit program Sander balíku AMBER 10.0 s použitím silového pole parm99. V procesech odehrávajících se před spuštěním samotné simulace byl každý motiv podroben lineárnímu zvyšování teploty z 10 K na 300 K za tlaku 1 atm v izobarickém souboru (NpT).

Strukturní a dynamické vlastnosti molekul se získají užitím programu *ptraj* a Carnal v programu AMBER. Pro další analýzu se používá např. esenciální dynamika.

3.1.3 Analýza simulací

Analýza dynamických simulací byla realizována programy *ptraj* jejich vizualizace se prováděla programy VMD a PyMOL.

Vodíkové vazby byly vizualizovány ve VMD, cutoff pro vzdálenost 3,5 Å a pro úhel 40°. Úhel mezi rameny byl měřen mezi koncovými páry bází a přihlédnutím na jejich stabilitu programem *ptraj*, graf byl vytvořen programem *xmgrace*. Analýza hustotních map protiiontů Na⁺ byly počítána užitím programu *ptraj* (grid analysis).

Byly také sledovány vyboulené báze, patrové a báze-fosfátové interakce, tvorba žebříkových struktur. Pro analýzu esenciální dynamikou byl použit program GROMACS a pro výpočty byly zahrnuty pouze atomy fosforu (P) z páteře.

Esenciální dynamika je nástroj, který odděluje základní společné pohyby od nekorelovaných a bezvýznamných fluktuací. Filtruje hlavní pohyby, které se vyskytují v simulaci a rozděluje je do nezávislých esenciálních pohybů.. Metoda se zaměřuje na analýzu celé simulace.

Analýza esenciální dynamikou (EDA) je silný nástroj k popisu flexibility RNA. Rozpoznává přirozené pohyby ve struktuře. Hlavním cílem této metody je nalézt korelované pohyby jako jednotlivé módy, které patří jednotlivým vektorům a konkrétním hodnotám [41].

Esenciální dynamika je založena na následujících krocích.

- určení skutečných pohybů na základě výpočtů a diagonalizace kovariance matrixu (kovariance = míra vzájemné vazby mezi dvěma náhodnými veličinami)
- získá se sada vlastních vektorů a jednotlivých vlastních hodnot
- výběr dominantních vektorů, které se objevují v 95-99% pohybů
- projekce vlastních vektorů do kartézského systému [41].

4. Cíle

Cílem diplomové práce je sledovat dynamiku a flexibilitu vybraných motivů a zjistit zda jsou obdobně flexibilní či vykazují podobný kloubový pohyb jako kink-turn motivy. Sledujeme, zda systém je rigidní či flexibilní, pokud je rigidní – znamená, že kolem něj vyskytuje hodně stabilizujících interakcí např. vodíkových vazeb. Pod pojmem flexibilní si můžeme představit, že se motiv nějakým způsobem hýbe a není tak omezován jako rigidní, a je schopen vykonávat daleko pestřejší pohyby. Studium těchto motivů je v začátcích, neví se moc o funkci a dynamice, kromě toho, že ohýbají páteř.

5. Výchozí struktura studovaných motivů

Sledované motivy RNA pocházejí z malé 30S (PDB: 2AVY) a velké ribozomální podjednotky 50S (PDB: 2AW4, 2AWB) organismu *E. coli* [45].

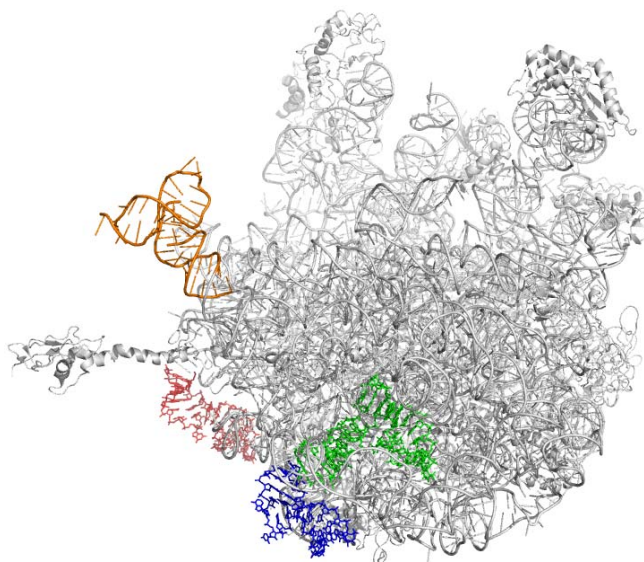
Celkem se v práci věnují struktuře a dynamice čtyř unikátních rRNA motivů, které svým tvarem připomínají písmeno L a V. Pro přehlednost jsou v práci označeny písmeny A, B, C a D. Při simulacích byly dále studovány motivy s různou délkou koncových šroubovicových úseků z důvodu krytí nestabilních párů nebo symetrizace motivu (zajištění stejného počtu párů bází v ramenech). Sekvence a počet bází jednotlivých strukturních alternativ motivů A-D jsou uvedeny v Tabulce 2.

Motivy A, B, C byly vybrány z velké podjednotky a poslední motiv D je součástí malé podjednotky. Motiv A pochází z ribozomální domény I, motivy B a C z domény III. Motiv D je součástí domény II malé ribozomální podjednotky. Celkem bylo studováno 11 různých forem těchto motivů (Tabulka 2).

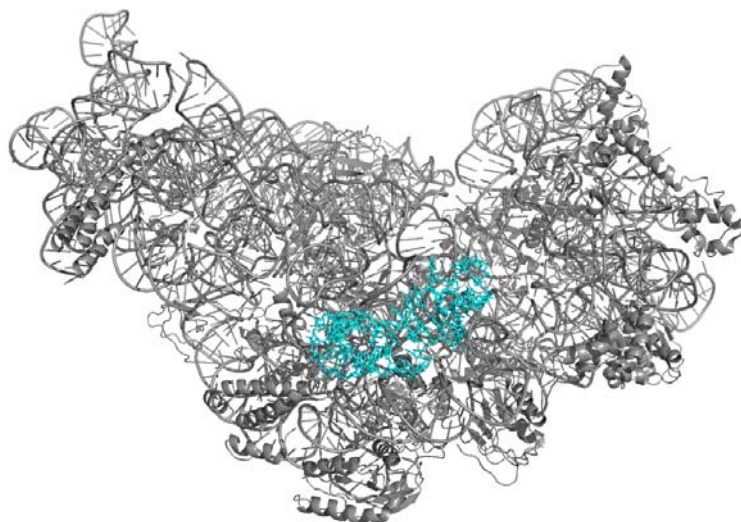
Tabulka 2 –Soubor všech motivů s jejich sekvencemi a počty residuí. V závorkách jsou definovány zkratky motivů.

Označení motivů	PDB kód	Residua	Počet bází
A_super_long (A _{SL})	2AW4	271 - 287 353 - 366	45
A_long (A _L)	2AW4	271 - 287 353 - 366	31
A (A _N)	2AW4	271 - 285 355 - 366	27
B_long (B _L)	2AW4	1405 - 1424 1574 - 1597	44
B (B _N)	2AW4	1410 - 1419 1578 - 1592	25
B_short (B _S)	2AW4	1410 - 1418 1580 - 1592	22
C (C _N)	2AWB	1421 - 1437 1555 - 1577	40
C_short (C _S)	2AWB	1423 - 1432 1561 - 1575	25
D_without_loop (D _N)	2AVY	769 - 786 796 - 810	33
D_loop_Mg (D _{Mg})	2AVY	768 - 811	44
D_loop (D _L)	2AVY	768 - 811	44

V této kapitole jsem použila pojmy rameno_1, rameno_2, vlákno_1, vlákno_2. Pojem rameno znamená A-RNA dvojšroubovici, která se vyskytuje před nebo za kloubem a v textu jsou definovány čísla residuí. Pojem vlákno_1 označuje jednovláknovou sekvenci bází, ke které je připojeno vlákno_2 a také jsou v textu definovány čísla residuí.



Obrázek 25 - Velká podjednotka ribozomu *E. coli* se zobrazenými motivy. Motiv A červeně, motiv B modře a motiv C zeleně. Oranžovou barvou je pro orientaci vyobrazen L1 stalk (PDB:2AW4). Vytvořeno programem PyMOL.



Obrázek 26 – Malá podjednotka ribozomu *E. coli* se zobrazeným motivem D, světle modrá. (PDB:2AVY). Vytvořeno programem PyMOL.

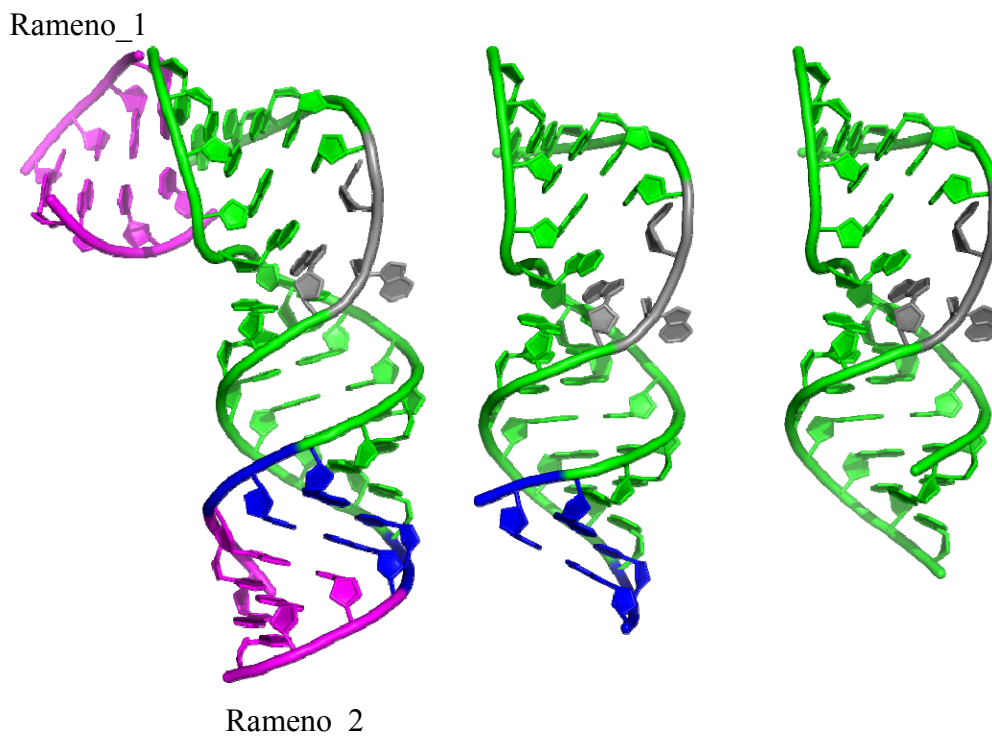
5.1. Motiv A

Motiv A pochází z velké ribozomální podjednotky 50S organismu *E.coli* z domény I. (PDB: 2AW4). Motiv A se vyskytuje na helixu 271 (H271)(Příloha 1). Originální motiv A_N je na obrázcích 27 a 29 zeleně. Na šroubovici ramene_1, která obsahuje báze 271-275 a 362-366, se vyskytují čtyři kanonické páry, pátý pár (275C a 362A) tvoří vazbu, která nebyla klasifikována v práci Leontise [9]. Šroubovice ramene_2, která obsahuje báze 279-285 a 355-361, se skládá z kanonických i nekanonických párů, rameno_2 je zakončeno dvěma „wobble“ G-U páry.

Vláknko_1 s 15 bázemi (271-285) obsahuje tři nepárové báze v kloubu, vláknko_2 obsahuje 12 bází (355-366) a nemá žádné nepárové báze. Báze 277G je ve startovní struktuře prezentována jako „bulge“.

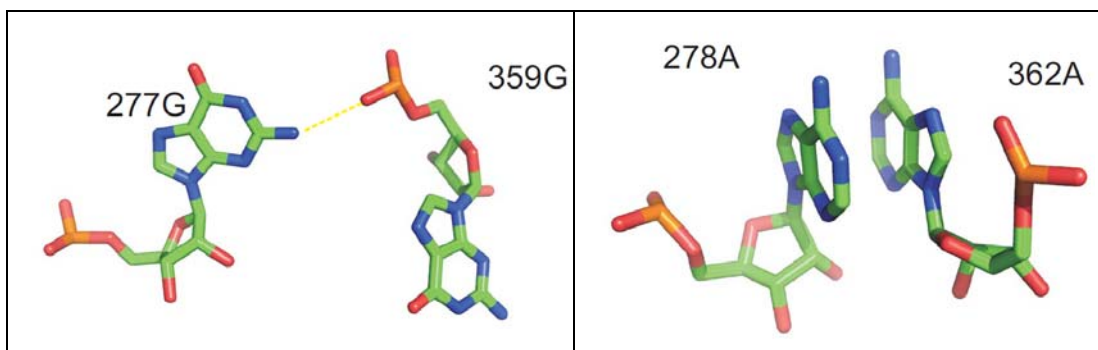
Motiv A_L , zeleně a modře na obrázcích 27 a 29, se od unikátního motivu A_N odlišuje dvěma nadstavenými páry na rameni_2 (báze 286-287 a 353-354). Motiv A_{SL} se od motivu A_L liší několika uměle přimodelovanými páry na obou ramenech. Na rameni_1 jsou navíc čtyři W-C páry a na rameni_2 jsou navíc dva W-C páry a jeden pár jehož báze jsou spojeny na WC-hraně, ale nejsou to typické W-C páry. Motiv $A_{superlong}$ je na obrázcích 27 a 29 vyobrazen zelenou, modrou a růžovou barvou.

Nejdelší studovanou alternativou motivu A je A_{SL} , jemuž náleží 21 párů bází, druhým nejdelším motivem je A_L – 14 párů a nejkratším motivem je A_N – 12 párů. Průměrná hodnota úhlu obou ramen v X-ray struktuře je 130°.

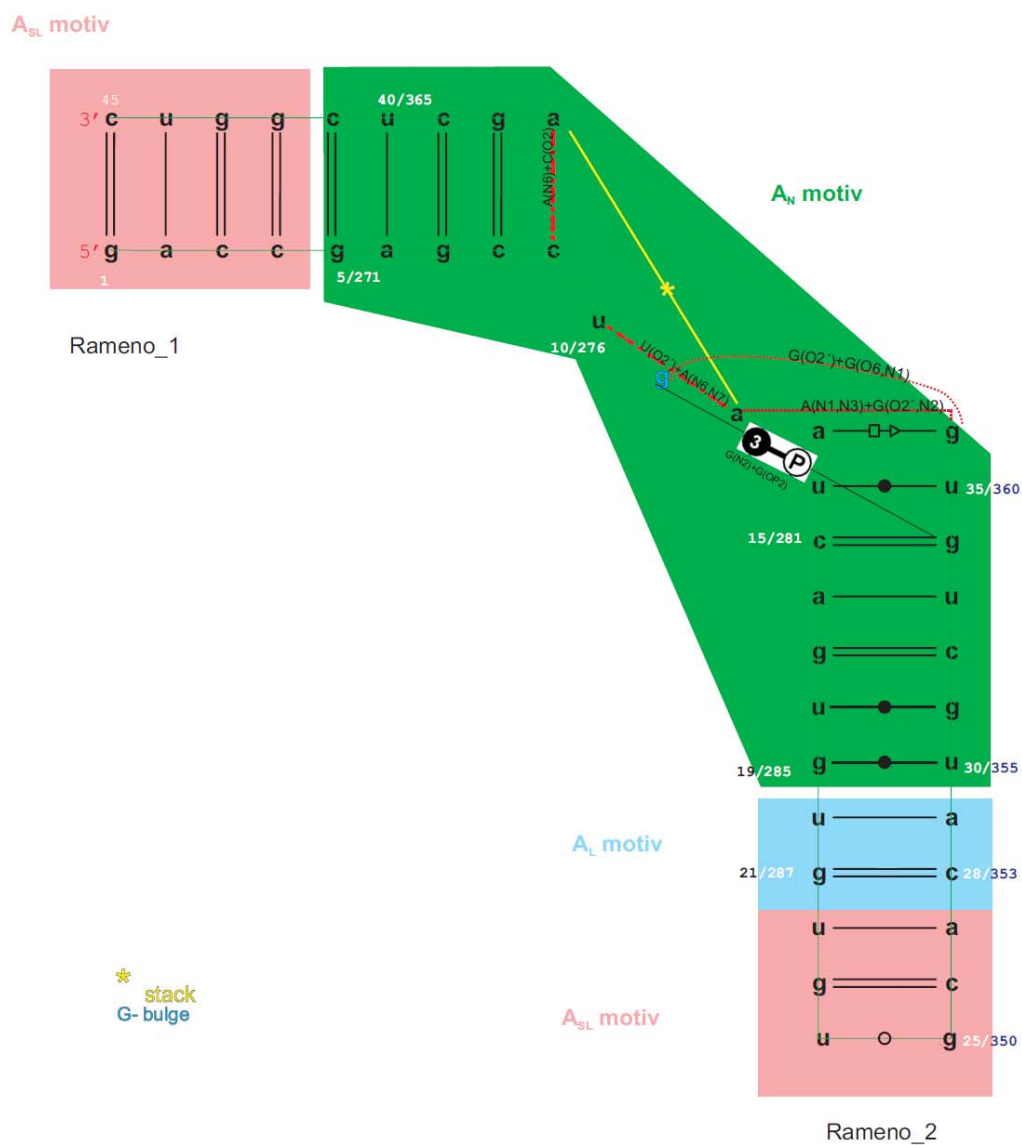


Obrázek 27 – Tři různě dlouhé formy motivu A, označené v práci jako A_{SL} , A_L , A_N . Motivy jsou vyobrazeny od nejdelšího k nejkratšímu. Barvy páteře a orientace korespondují s barvami na obrázku 29. Vytvořeno programem PyMOL. Šedou barvou je vyobrazen kloub.

Motiv A je lokalizován na povrchu ribozomu a ve svém okolí přímo neinteraguje s žádnou bází nebo proteinem. Pouze báze z nespárované oblasti interagují s jinými bázemi v motivu, vyznačeno na obrázku 29. Vyboulená báze 277G(N2) interaguje s bází 359G(OP2) prostřednictvím báze-fosfátové interakce (3BPh). V X-ray struktuře se rovněž vyskytuje patrová interakce mezi residui 278A a 362A (obrázek 28).

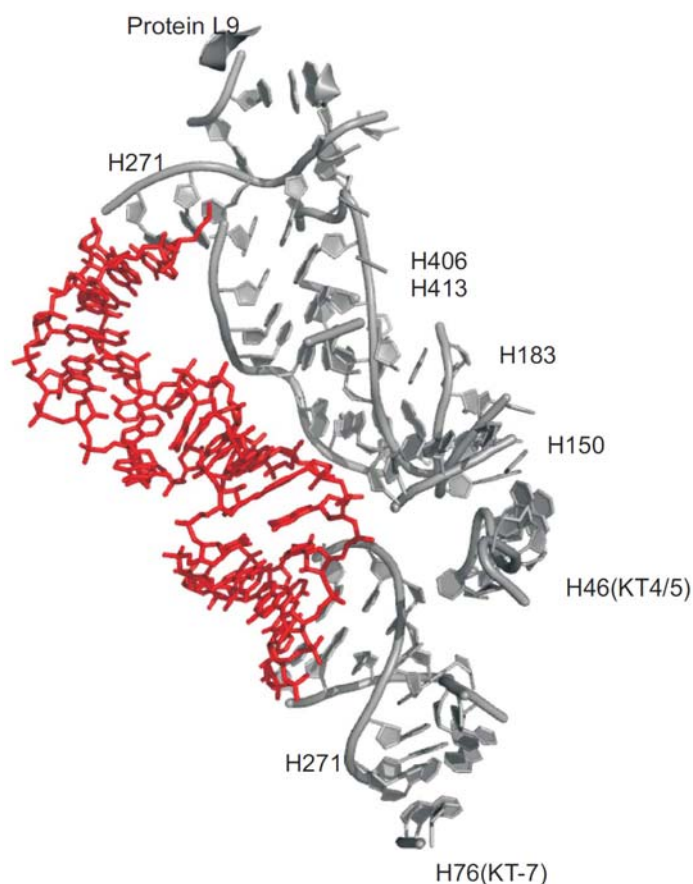


Obrázek 28 – Vlevo báze-fosfátová interakce 3BPh vyznačena čárkovaně žlutě. Vpravo se nachází patrová interakce 278A a 362A.



Obrázek 28 - Sekundární struktura motivu A s vyznačenými terciárními kontakty. Interhelikální kontakty jsou značeny červeně přerušovaně. Orientace odpovídá obrázku 27. Vytvořeno v programu RnamlView.

Motiv A sousedí do vzdálenosti 20 Å s těmito úseky helixů: H76, který je pojmenován též jako KT-7, H46 (KT-4/5), H271, H235, H151 a také sousedí s proteinem protein L9 (obrázek 29).



Obrázek 29 – Okolí motivu A do vzdálenosti 20Å. Červeně znázorněn samotný motiv, šedá barva reprezentuje okolní prostředí ribozomu.

5.2. Motiv B

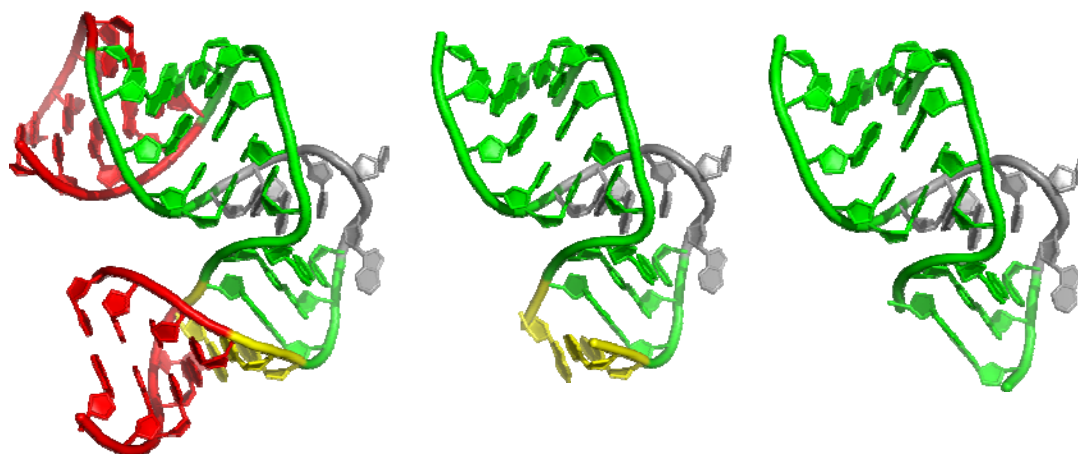
Motiv B pochází z velké ribozomální podjednotky 50S organismu *E.coli* z domény III. (PDB: 2AW4). Motiv B se vyskytuje na helixu 1405 (H1405) (Příloha 1).

Originální motiv B_N, zeleně a žlutě na obrázcích 30 a 31. Na šroubovici ramene_1 motivu B_N, báze 1410-1414 a 1588-1592, se vyskytují pouze čtyři W-C páry. Šroubovice ramene_2, báze 1416-1419 a 1578-1582, obsahuje dva W-C páry a dva nekanonické páry [9]. Vlákno_1 s 10 bázemi (1410-1419) obsahuje jedno nepárové residuum v kloubu (1414U) a jedno na rameni_2 (1419A). Vlákno_2 s 15 bázemi (1578-1592) obsahuje jedno nepárové residuum na rameni_2 (1579A) a pět nepárových residuí v kloubu.

Motiv B_S, na obrázcích 30 a 31 zeleně, se od unikátního motivu B_N odlišuje absencí posledního páru na rameni_2 (1419A-1578U) a nepárové báze (1579A). Motiv B_L, červená zelená žlutá na obrázcích 30 a 31, se od unikátního motivu B_N liší nadbytkem čtyř nekanonických a jednoho W-C párů na rameni_1 a na rameni_2 jsou navíc tři W-C páry a jeden nekanonický pár. Oba nekanonické páry na obou ramenech u motivu B_L jsou spojeny prostřednictvím W-C edge [9].

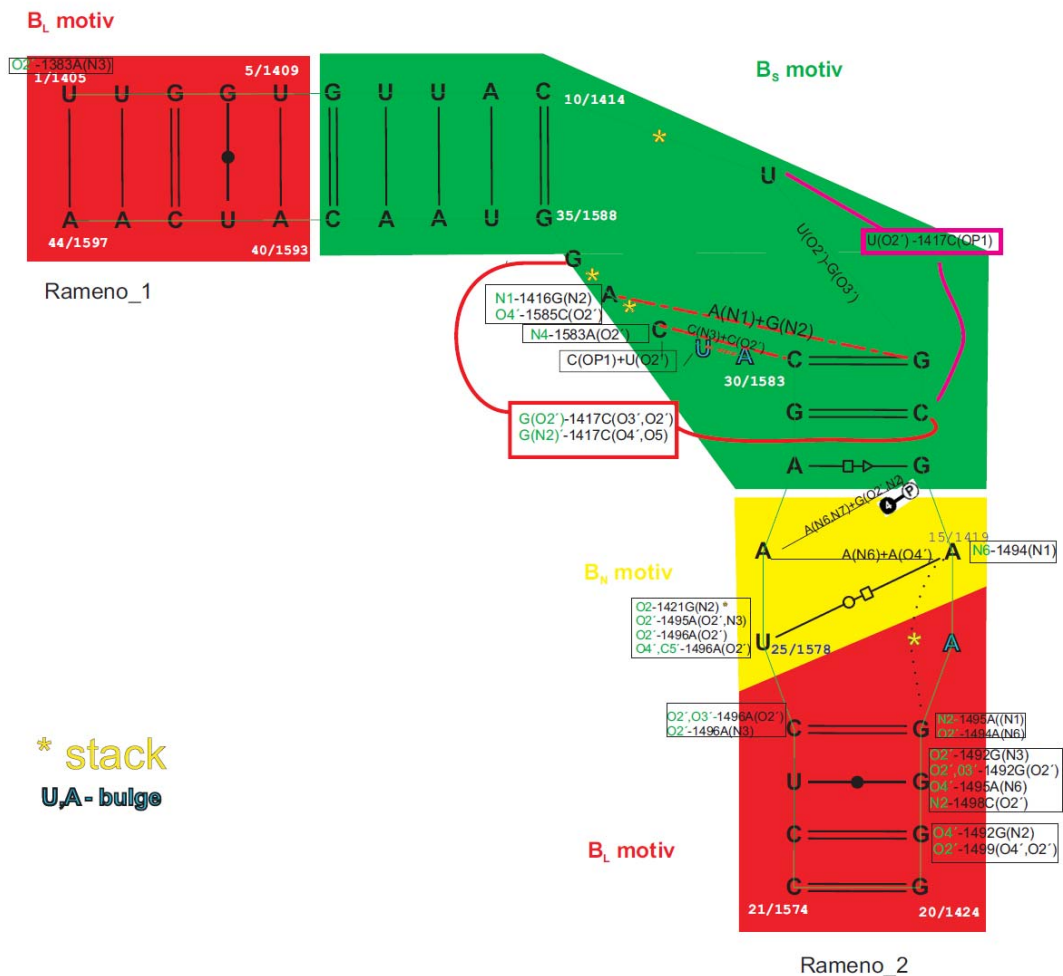
Nejdelší studovanou alternativou motivu B_N je motiv B_L jemuž náleží 18 párů bází. Druhým nejdelším motivem je B_N – 9 párů, nejkratším motivem je motiv B_S – 8 párů. Hodnota úhlu obou ramen v X-ray struktuře je 116°.

Rameno_1



Rameno_2

Obrázek 30 – Tři různě dlouhé formy motivu B, označené v práci jako B_L, B_N a B_S. Motivy jsou vyobrazeny od nejdelšího k nejkratšímu. Vytvořeno programem PyMOL. Barvy páteře a orientace korespondují s barvami na obrázku 31. Vytvořeno programem PyMOL. Šedou barvou je vyobrazen kloub.

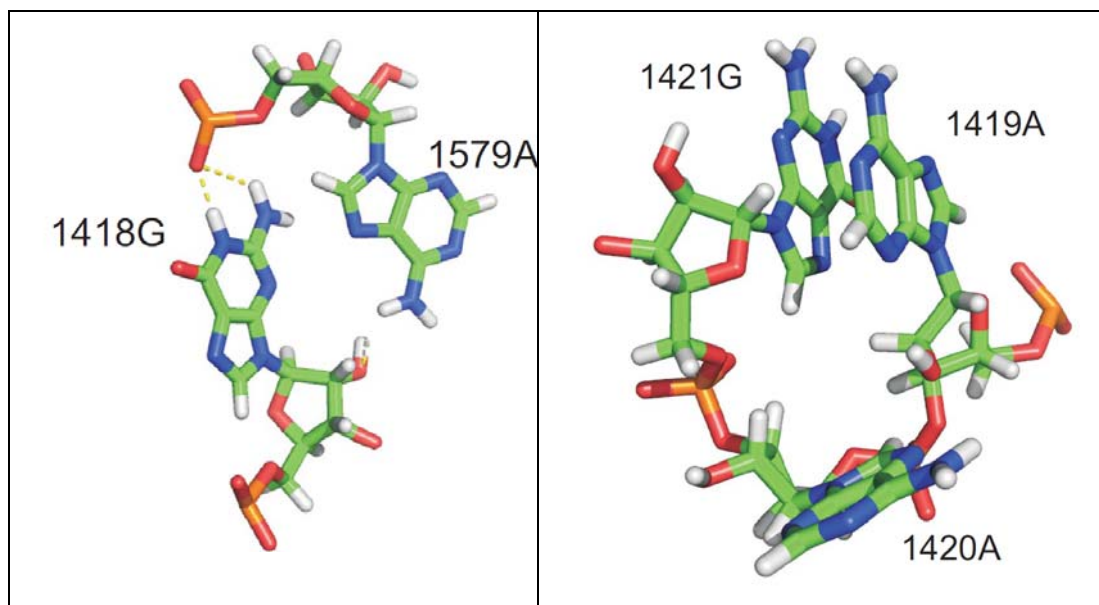


Obrázek 31 - Sekundární struktura motivu B s vyznačenými terciárními kontakty v motivu i s okolím motivu. Interhelikální kontakty jsou vyznačeny červeně přerušovaně. Orientace odpovídá obrázku 30. Interakce s okolním ribozomem jsou definovány v obdélníku u příslušného residua. Vytvořeno v programu RnamlView.

Motiv B je už více zanořen do ribozomu a tak se nabízí mnoho interakcí s okolím motivu.

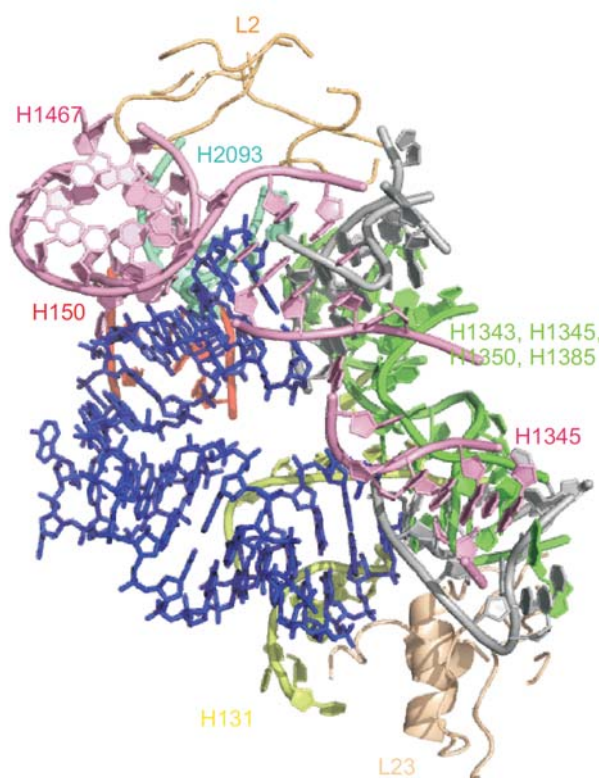
Na rameni_1 interaguje pouze první báze motivu B_L prostřednictvím kyslíku ribozy na 1383A. Rameno_2 nabízí interakce prostřednictvím kyslíkových atomů ribozy s okolím motivu. Interakce v kloubu jsou velmi pestré, jednak interakce v rámci motivu a jednak s okolním ribozomem, interakce jsou podrobně vyznačeny na obrázku 31.

Vyskytuje se zde báze-fosfátová interakce 4BPh (obrázek 32) mezi bázemi 1418G(N1, N2) a 1579A(OP1). Vzhledem k tomu, že báze 1420A je definována jako „bulge“ dochází ke patrové interakci mezi bázemi 1419A a 1421G (obrázek 32).



Obrázek 32 – Vlevo je báze-fosfátová interakce 4BPh vyznačena čárkovaně žlutě. Vpravo se nachází vyboulená báze 1420A a báze 1419A+1421G tvořící patrovou interakci.

Motiv B sousedí ve vzdálenosti 20 Å s těmito úseky helixů: H131, H150, H1343, H1345, H1350, H1385, H1405, H1467, H2093. V okolí motivu B se nachází proteiny L2 a L23 (obrázek 33).



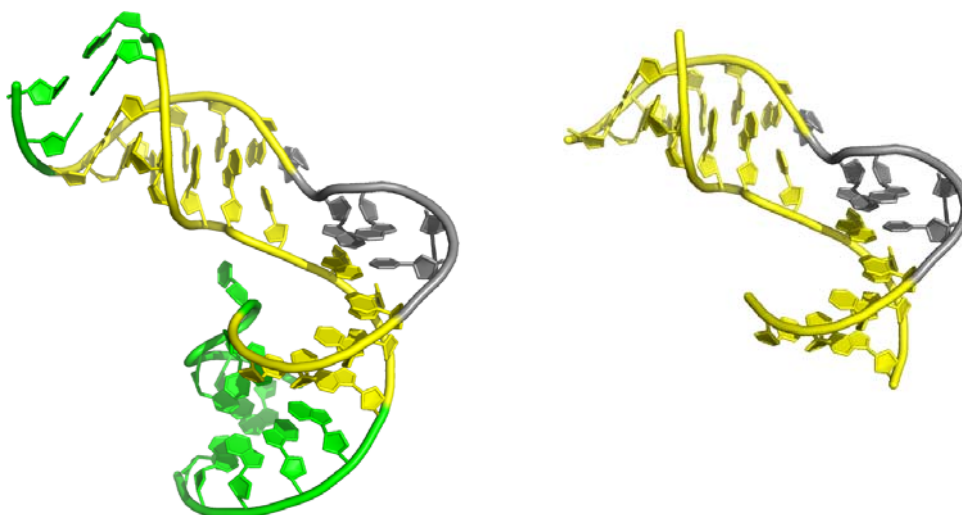
Obrázek 33 - Okolí motivu B ve vzdálenosti 20Å. Modře v je znázorněn motiv B, šedá barva reprezentuje helix na kterém se motiv nachází. K barevným helixům v režimu odpovídají stejně barevné popisky v obrázku.

5.3. Motiv C

Motiv C pochází z velké ribozomální podjednotky 50S organismu *E.coli* z domény III. Motiv C se vyskytuje na helixu 1405 (H1405) (Příloha 1). Originální motiv C_N , zeleně a žlutě na obrázcích 34 a 35. Na šroubovici ramene_1, báze 1421-1428 a 1570-1577, jsou první, druhý a čtvrtý pár kanonický, druhý a pátý až osmý pár je nekanonický. Šroubovice ramene_2, báze 1429-1437 a 1555-1564, je ukončena třemi kanonickými páry, také se zde vyskytuje jedna nepárová báze, celkem rameno_2 obsahuje devět párů z toho šest kanonických [9].

Vlákno_1 17 bázemi (1421-1437) neobsahuje žádné nepárové báze. Vlákno_2 se 23 bázemi (1555-1477) obsahuje v kloubu pět nepárových bází, z nichž jedno 1566A bylo v X-ray struktuře definováno jako vyboulená „bulge“ báze. Kromě nepárových bází v kloubu, se vyskytuje nepárová báze i na vláknu_2 (1558U). Motiv C_S , žlutě na obrázcích 34 a 35, se od unikátního motivu C_N odlišuje absencí dvou párů na rameni_1 a absencí pěti párů na rameni_2. Nejdelší studovanou alternativou je C_N , kterému náleží 17 párů bází. Druhým motivem je motiv C_S , který má na obou ramenech pouze 10 párů. Hodnota úhlu obou ramen v X-ray struktuře je 122° .

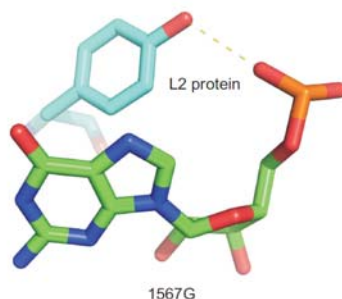
Rameno_1



Rameno_2

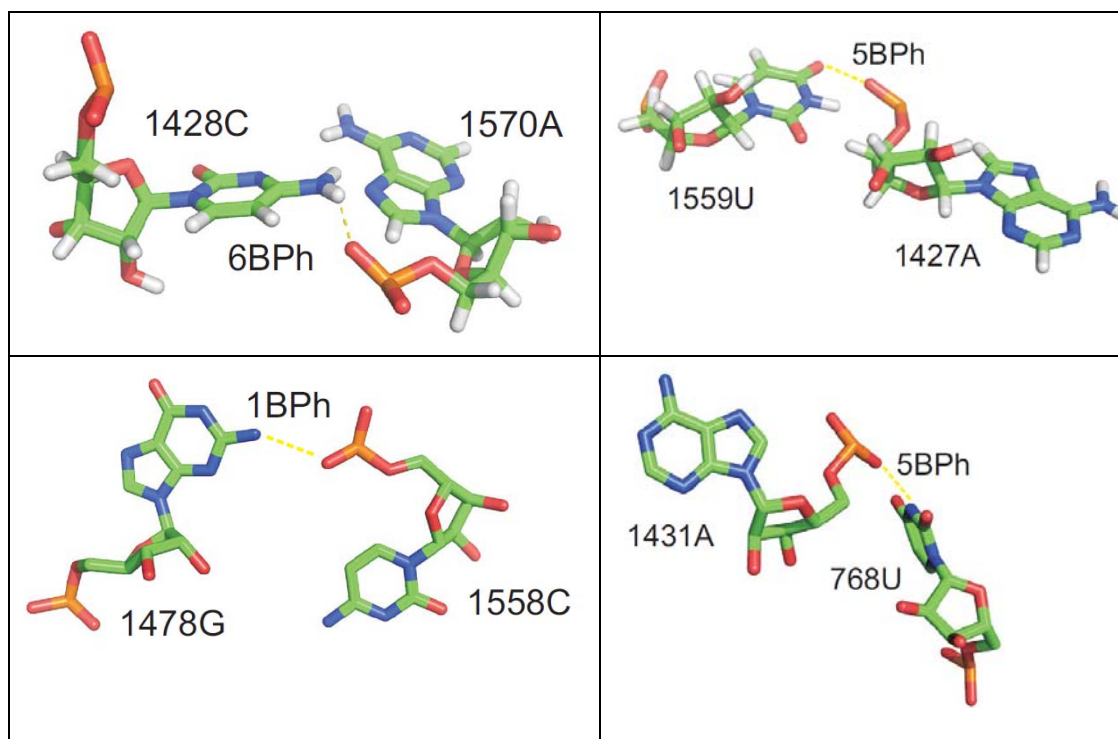
Obrázek 34 – Dvě různě dlouhé formy motivu C, označené v práci jako C_N a C_S . Motivy jsou vyobrazeny od nejdelšího k nejkratšímu. Vytvořeno programem PyMOL. Barvy páteře a orientace korespondují s barvami na obrázku 35. Vytvořeno programem PyMOL. Šedou barvou je vyobrazen kloub.

Motiv C je celý zapleten do ribozomální struktury a tak se nabízí mnoho interakcí s okolím motivu. Motiv C nabízí interakci s proteinem L2 prostřednictvím rezidua 1567G(OP1) s aminokyselinou Tyr82 (obrázek 36).



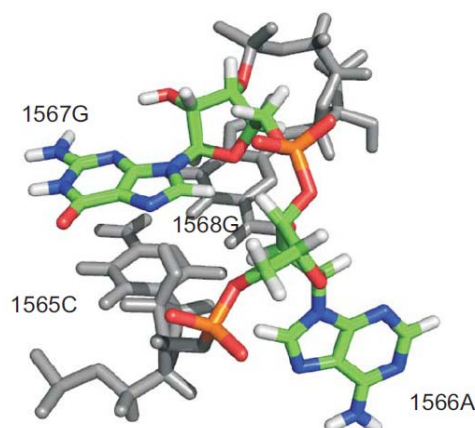
Obrázek 36 – Interakce báze 1567G motivu C s proteinem L2, vyznačena čárkovaně žlutě.

V tomto motivu také můžeme nalézt báze-fosfátové interakce 6BPh mezi bázemi 1428C(N4) a 1570A(OP2). Další báze-fosfátová interakce 5BPh náleží 1427A(OP2) a 1559U(N3), 1BPh mezi bázemi 1558C(OP1) a 1478G(N2), 5BPh mezi bázemi 1431A(OP2) a 762U(N3). Poslední dvě jmenované, 1BPh a 5BPh, neposkytují interakce v motivu ale s okolním ribozomem (obrázek 37).



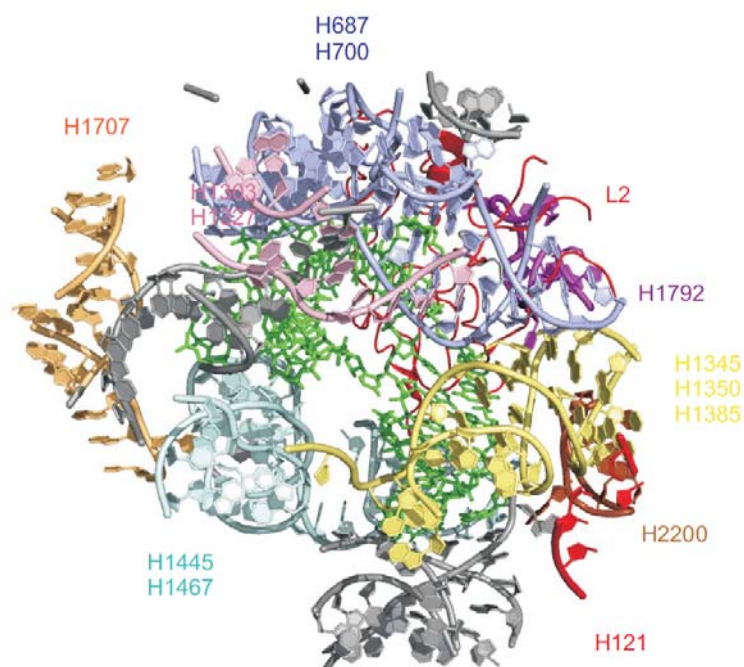
Obrázek 37 – Báze fosfátové interakce motivu C, vyznačeno čárkovaně žlutě.

V kloubu se nachází vyboulená „bulge“ báze 1566A, která neinteraguje s žádnou okolní bází, dochází ke patrové interakci u bází před a za ní (1565C a 1567G) V kloubu se nachází W-C pár mezi bázemi 1568G-1565C (obrázek 38). Ve většině případů spolu báze interagují kyslíkovými atomy náležející riboze.



Obrázek 38 – Kloub motivu C, šedou barvou je znázorněn W-C pár.

Motiv C sousedí ve vzdálenosti 20Å s úseky helixů: H121, H687, H700, H1345, H1350, H1385, H1420, H1437, H1444, H1440, H1467, H1303, H1327, H1707, H1792, H2200. V okolí motivu C se nachází protein L2 (obrázek 39).



Obrázek 39 - Okolí motivu C ve vzdálenosti 20Å. Zeleně v režimu „stick“ je znázorněn motiv C, šedá barva reprezentuje helix na kterém se motiv nachází. K barevným helixům a proteinu v režimu „cartoon“ odpovídají stejné barevné popisky v obrázku.

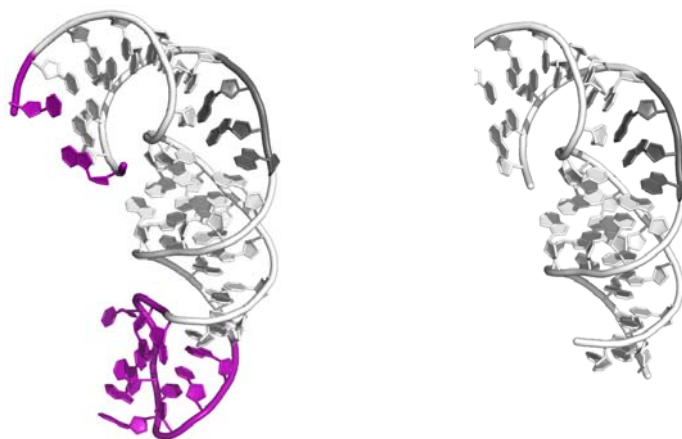
5.4. Motiv D

Motiv D pochází z malé ribozomální podjednotky 30S organismu *E.coli* v doméně III. Motiv D se vyskytuje na helixu 769 (H769) (Příloha 3). Nejdelší studovanou alternativou motivu D je motiv D_L , na obrázcích 41 a 42 bíle a fialově, jemuž náleží 16 párů bází a smyčka (loop) čítající 9 bází. Druhým a kratším motivem je motiv D_N , na obrázcích 40 a 41 bíle, který má na šroubovici rameno_1, báze 769-774 a 805-810, tedy o jeden pár bází méně a také postrádá smyčku (loop). D_N má 15 párů bází.

D_N má na rameni_1 šest kanonických párů. Šroubovice rameno_1 motivu D_L obsahuje navíc jeden pár 811C-768A, který je sice spojen na WC-hraně, ale nejedná se o klasický Watson-Crickový pár (C-●-A) [9]. Šroubovice rameno_2, báze 778-786 a 796-804 je u obou motivů zakončeno čtyřmi W-C páry, jeden W-C pár můžeme nalézt také v blízkosti kloubu. Zbylé čtyři páry jsou tvořeny nekanonicky (obrázek 41).

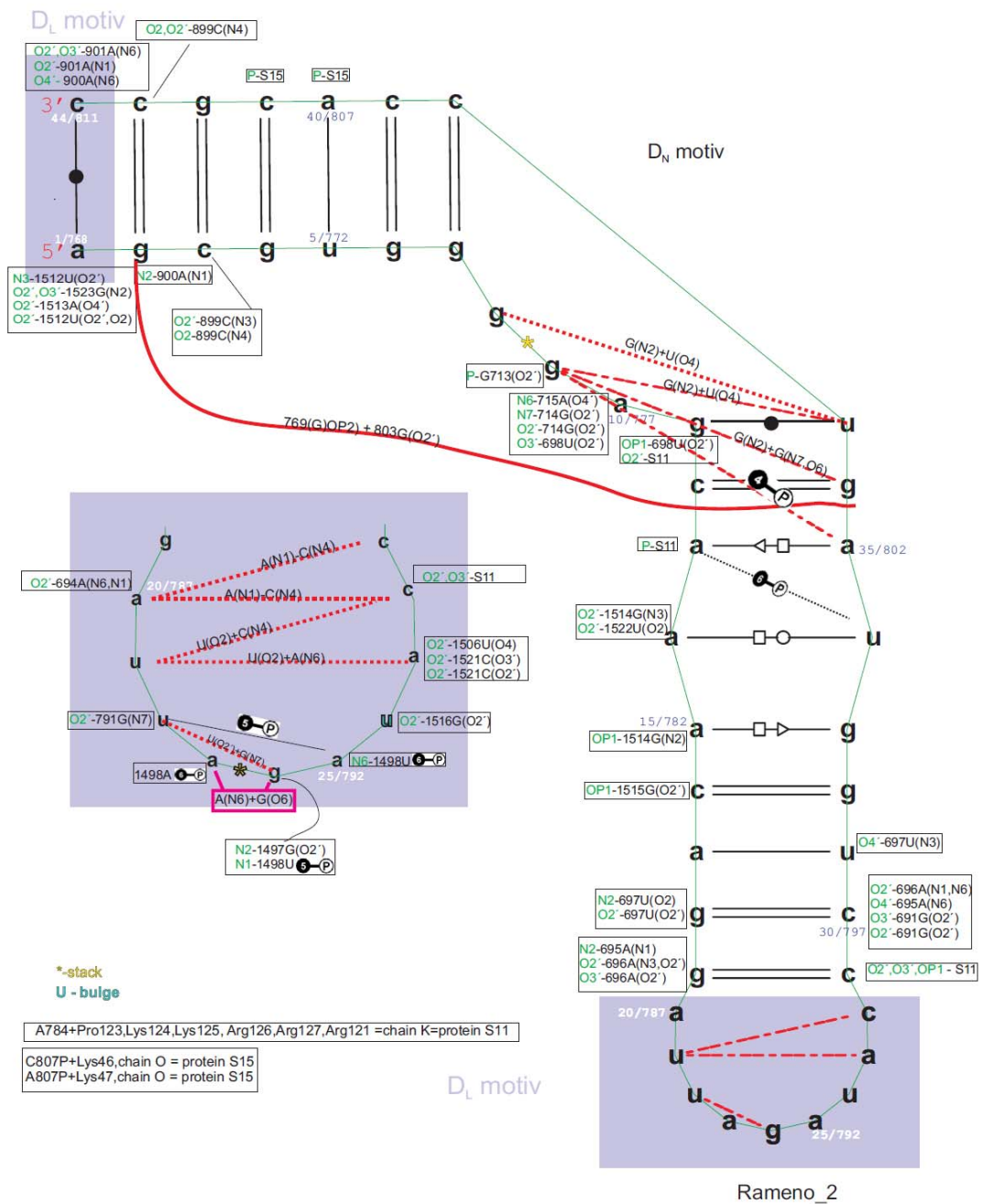
Z pohledu D_L je vlákno_1 tvořeno 19 bázemi (768-786), v kloubu se vyskytují tři nepárové báze. Potom následuje smyčka (loop) s 9 bázemi (787-795). Vlákno_2 se 16 bázemi (796-811) nemá žádné nepárové báze. V X-ray struktuře byla označena pouze jedna báze jako vyboulená „bulge“ (26U). Hodnota úhlu obou ramen je $97,5^\circ$.

Rameno_1



Rameno_2

Obrázek 40 – Dvě různé dlouhé formy motivu D, označené v práci jako D_L , D_{Mg} , D_N . Motivy jsou vyobrazeny od nejdelšího k nejkratšímu. Vytvořeno programem PyMOL. Barvy páteře korespondují s barvami na obrázku 41. Vytvořeno programem PyMOL. Šedou barvou je vyobrazen kloub.

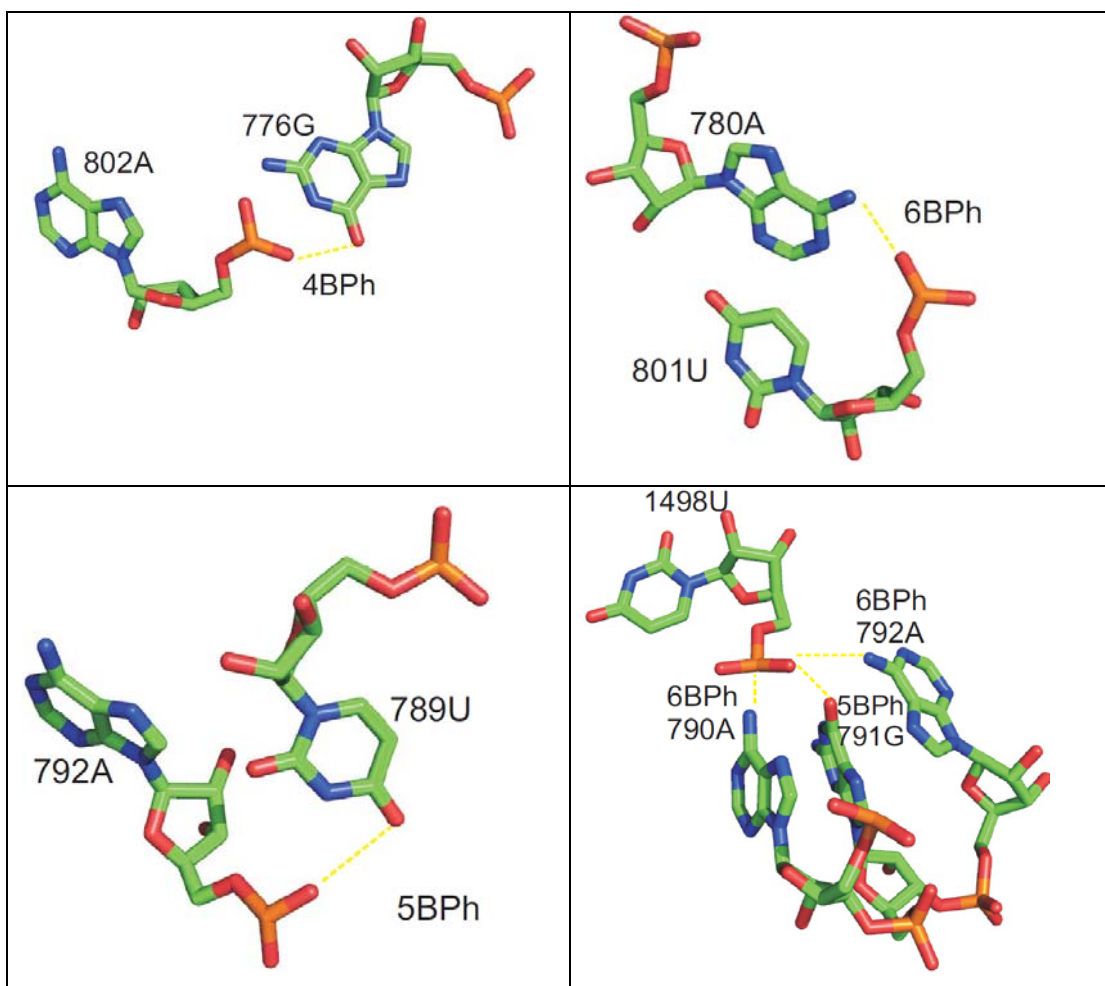


Obrázek 41 - Sekundární struktura motivu D s vyznačenými terciárními kontakty v motivu i s okolím motivu. Orientace odpovídá obrázku 40. Interhelikální kontakty jsou vyznačeny červeně přerušovaně. Interakce s okolním ribozomem jsou definovány v obdélníku u příslušného residua. Vytvořeno v programu RnamlView.

Motiv D je lokalizován v malé podjednotce, v místě kde dochází ke spojení s velkou podjednotkou a velká podjednotka mu může nabízet prostor k interakcím. Samotný D_motiv se vyskytuje spíše na povrchu malé podjednotky.

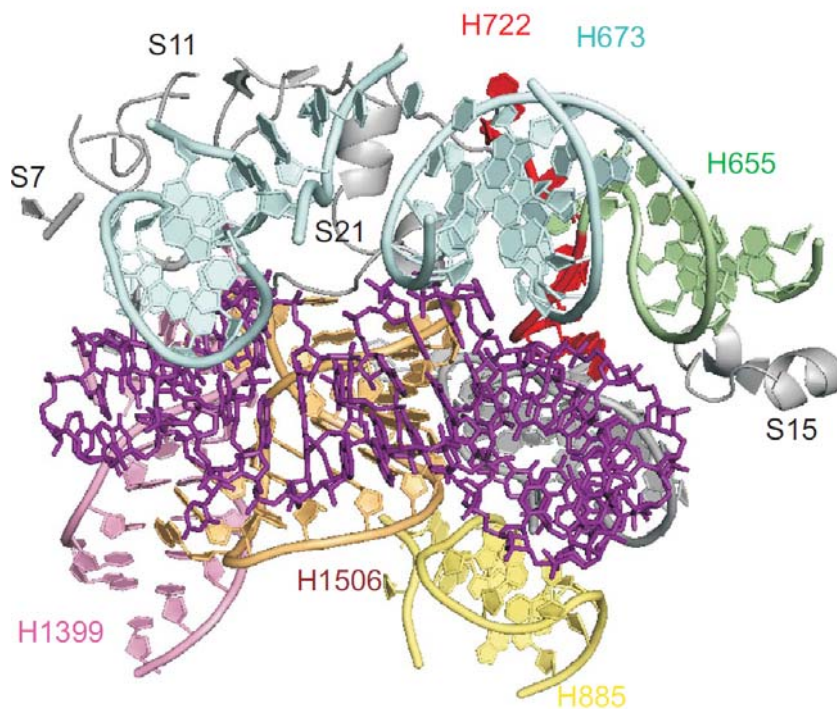
Vyskytují se zde báze-fosfátové interakce a interakce s proteiny. Velice zajímavé jsou interakce ve smyčce (loopu), kde se nachází dlouhý region (9 bází) nespárovaných bází.

Báze-fosfátových interakcí je v motivu D celkem šest (obrázek 42). 4BPh mezi 776G(N1, N2) a 802A(OP1, OP2). 6BPh mezi 780A(N6) a 801U(OP1). 5BPh mezi 790A(N6) a 1498U(P). 5BPh mezi 791G(N1) a 1498U(P). 6BPh mezi 792A(N6) a 1498U(P). 5BPh mezi 789U(N3) a 792A(P).



Obrázek 42- Báze fosfátové interakce motivu D jsou vyznačeny čárkovaně žlutě.

Motiv D sousedí ve vzdálenosti 20Å s úseky helixů: H655, H673, H722, H885, H1399, H1506. Ve 20Å okolí můžeme narazit i na proteiny např S7, S11, S15 a S21 (obrázek 43).



Obrázek 43- Okolí motivu D ve vzdálenosti 20Å. Fialově v režimu „stick“ je znázorněn motiv C K barevným helixům a proteinům v režimu „cartoon“ odpovídají stejně barevné popisky v obrázku.

6. Výsledky a diskuse

V této kapitole jsem shrnula společné či naopak odlišné vlastnosti všech jedenácti motivů.

Tabulka 3 – V těchto tabulkách je shrnuto procentuální zastoupení stability vodíkových vazeb v ramenech motivů A a B, šedou barvou jsou zvýrazněny páry, jejichž stabilita byla pod 80%. U motivu A (vlevo) nejméně stabilní je vazba 275C + 362A, která sousedí s kloubem. Konce ramen jsou stabilní kromě motivu A_N, který vykazuje stabilitu 4,7% u páru 285G+355U. U motivu B (vpravo). Konce ramen jsou stabilní kromě motivu B_N a B_L.

	A _N (%)	A _L (%)	A _{SL} (%)		B _S (%)	B _N (%)	B _L (%)
xG + xC	-	-	99,5	1405U + 1597A	-	-	8,8
xA + xU	-	-	99,4	1406U + 1596A	-	-	78,3
xC + xG	-	-	91,9	1407G + 1595C	-	-	99,3
xC + xG	-	-	99,9	1408G + 1594U	-	-	99,2
271G + 366C	97,7	97,9	99,9	1409U + 1593A	-	-	99,5
272A + 365U	99,6	99,7	100	1410G + 1592C	99	99,7	99,5
273G + 364C	99,7	100	100	1411U + 1591A	99,6	99,9	99,3
274C + 363G	99,7	99,8	99,4	1412U + 1590A	100	100	99,9
275C + 362A	44,1	69,2	37,3	1413A + 1589A	99,7	100	99,9
				1414C + 1588G	100	100	99,9
279A + 361G	98,8	63,0	97,3				
280U + 360U	99,8	99,8	99,9	1415U + 1589G	100	94,4	84,2
281C + 359G	99,9	100	99,9	1416G + 1582C	100	99,5	97,9
282A + 358U	99,9	100	100	1417C + 1581G	100	99,4	96,4
283G + 357C	70,2	99,8	100	1418G + 1580A	95,5	88,8	81,2
284U + 356G	85,6	99,8	99,9	1419A + 1578U	-	4,0	73,0
285G + 355U	4,7	98	99,9	1421G + 1577C	-	-	98,7
286U + 354A	-	97,5	99,1	1422G + 1576U	-	-	98,7
287G + 353C	-	97,5	100	1423G + 1575C	-	-	98,4
xU + xA	-	-	100	1424G + 1574C	-	-	97,6
xG + xC	-	-	100				
xU + xG	-	-	99,4				

Tabulka 4 - V těchto tabulkách je shrnuto procentuální zastoupení stability vodíkových vazeb v ramenech motivu C a D, šedou barvou jsou zvýrazněny páry, jejichž stabilita byla pod 80%. U motivu C došlo k vytvoření narovnané struktury neboli žebříku a tento stav značně destabilizoval vazebné páry 1434A+1558C, 1435G+1557C, 1436G+1556C, 1437C+1555G.

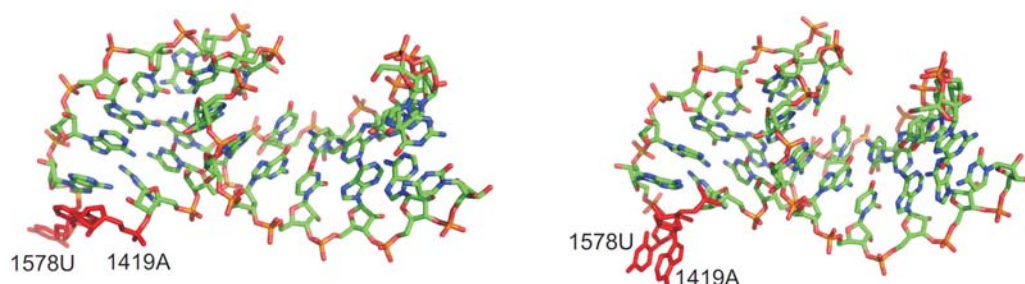
	C _S (%)	C _N (%)		D _N (%)	D _L (%)	D _{Mg} (%)
1421G + 1577C	-	99,3	768A + 811C	-	3	13,1
1422G + 1576U	-	99,5	769G + 810C	99,5	100	99,7
1423G + 1575C	5,5	99,7	770C + 809G	100	99,6	98,6
1424G + 1574C	93,4	100	771G + 808C	99,5	90,4	99,9
1425G + 1573G	17,7	14,9	772U + 807A	88,2	82,4	99,9
1426G + 1572A	77	41,7	773G + 806C	97,3	73,8	100
1427A + 1571A	99,9	67,9	774G + 805C	99	70,2	100
1428C + 1570A	22,2	51,3				
			778G + 804U	98,1	97,3	4
1429G + 1564C	99,9	99,7	779C + 803G	100	99,6	93,5
1431A + 1563U	99,4	99,8	780A + 802A	100	96,5	34,1
1431A + 1562U	97,4	99,7	781A + 801U	99,8	98,4	0,3
1432G + 1561C	85	99,7	782A + 800G	100	99,7	67,4
1433A + 1560G	-	98,8	783C + 799G	98,8	97,2	94,7
1434A + 1558C	-	27,9	784A + 798U	100	99,6	99,4
1435G + 1557C	-	51,8	785G + 797C	99,6	99,6	99,4
1436G + 1556C	-	66,5	786G + 796C	97	95,8	99,3
1437C + 1555G	-	63	788U + 794A	-	9,2	33,3
1565C + 1568G	99,9	99,8	789U + 791G	-	3,8	1,9

Stabilita ramen:

Ve všech třech alternativách motivu A je nestabilní pár 275C + 362A, který sousedí s kloubem. U motivu A_L se navíc nachází nestabilní pár, 279A + 361G, který rovněž sousedí s kloubem a jeho procentuální zastoupení je 63%. Konce ramen jsou stabilní kromě motivu A_N, který vykazuje stabilitu 4,7% u páru 285G+355U, který je však v tomto motivu terminální.

U motivu B_L jsou nestabilní koncové páry ramene₂ (páry 1405U + 1597A, 1406U + 1596A), procentuální zastoupení těchto vazeb je 8,8% a 78,3%. Nestabilní poslední pár se vyskytuje i u motivu B_N, pár 1419A + 1578U, jehož stabilita po dobu simulace činila pouze 4,4%. Báze 1578U se v 6 ns odpojí a pohybuje se volně v prostoru do 36 ns, ve 36 ns se přiblíží ke svému komplementárnímu páru (1419A), nedojde ke klasickému spárování, ale báze vůči sobě interagují prostřednictvím patrové interakce do 52 ns (obrázek 44). Potom

zase báze 1578U se pohybuje volně v prostoru do konce simulace se už nevrátí. Báze 14190A drží na svém místě.



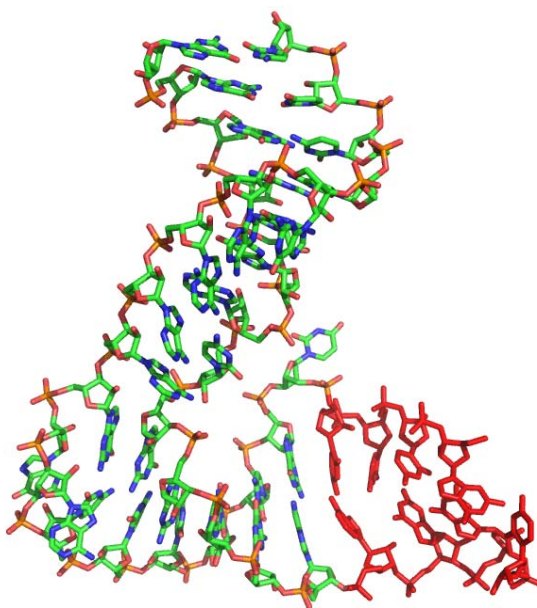
Obrázek 44 - První pár motivu B_N 1578U+1419A. Vlevo se 1578U v odtrhnul od svého páru 1419A (6-36 ns), vpravo tvoří se svým párem 1419A patrovou interakci (36-52 ns).

U motivu C_N se stabilita posledních čtyřech párů ramene_2 pohybuje v rozmezí 28-67%. U obou motivů C_N a C_S vykazuje nestabilitu rameno_1 (pár 1423G + 1575C, 1425G + 1573G, 1426G + 1572A, 1427A + 1571A, 1428C + 1570A). Motiv v ribozomu má kolem sebe specifické prostředí a při přechodu do vodného prostředí, kde specifické látky, došlo v simulaci k jeho relaxaci.

U motivů D_L a D_{Mg} , jsou nestabilní koncové páry na obou ramenech. Na rameni_1 to je pár 768A + 811C, který vykazuje stabilitu u D_L 3% a D_{Mg} 13,1%. Na rameni_2 jsou nestabilní koncové dva páry, 788U + 794A a 789U + 791G. Pár 788U + 794A který vykazuje stabilitu u D_L 9,2% a D_{Mg} 33,3%. Pár 789U + 791G, který vykazuje stabilitu u D_L 3,8% a D_{Mg} 1,9%.

Žebřík:

Žebříkovou strukturou nazýváme takovou strukturu, ve které došlo k porušení struktury helikálního twistu [47]. Žebříková struktura se vytvořila pouze u motivu C_N u dalších deseti simulací ostatních motivů se neprokázala. V motivu C_N se tato struktura objevila ve 26 ns a zůstala do konce simulace (100 ns), (obrázek 45).



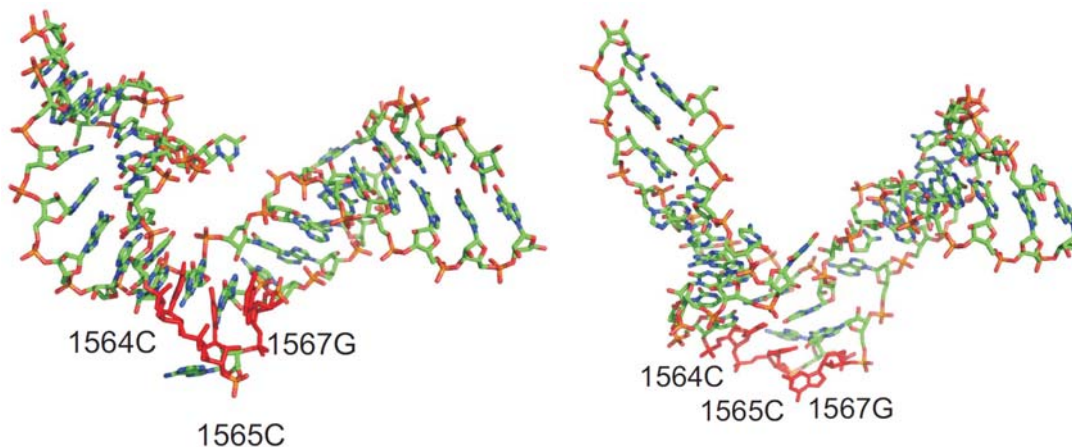
Obrázek 45 - Žebříková struktura motivu C ramene_2 od 26ns do konce simulace.

Patrové interakce:

V kloubu se dostávají do patrové interakce u motivu A_N tyto báze 275C, 276U, 278A. V simulaci motivu A_L se k této patrové interakci ve 20 ns přidává báze 277, původně definovaná jako „bulge“ a tato formace zůstává stabilní do konce simulace. V simulaci A_{SL} se k bázím 275C, 276U přidává v 16 ns ještě 278A a 361G a také tato formace vydrží do konce simulace.

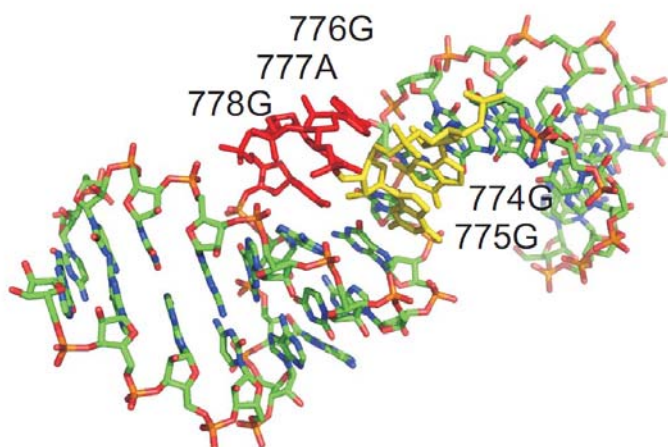
V kloubu u motivu B_N , B_S , B_L jsou v patrové interakci po celou simulaci báze 1414C a 1415U. Další patrové interakce motivu B_N a B_S se zaměřují na druhou stranu kloubu, který obsahuje báze 1586C+1587A+1588G+1589G. U motivu B_L se k této patrové interakci přidává báze 1585C a naopak se do patrové interakce nepřidává báze 1589G.

V kloubu u motivu C_N jsou v patrové interakci báze 1564C+1565C+1567C, interakce setrvá jen do 17 ns, potom zůstává v interakci jen 1564C a 1565C do konce simulace (obrázek 46). Takové podobné chování bylo pozorováno také u motivu C_S - jen s tím rozdílem, že báze 1567C setrvala v patrové interakci až do 90 ns.



Obrázek 46 – Patrová interakce 1564C+1565C+1567G jen do 17 ns, potom zůstane v patrové interakci jen 1564C+1565C.

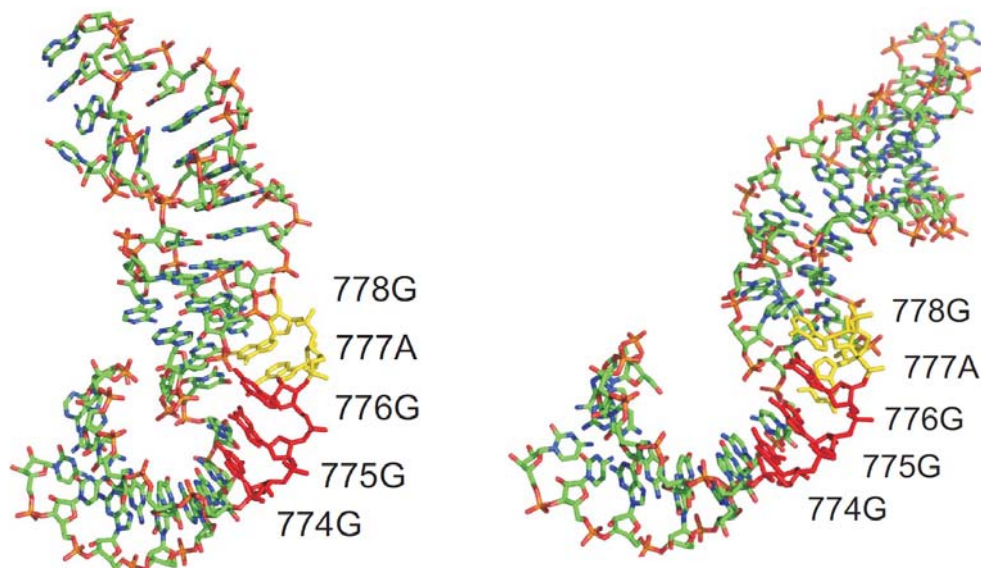
V motivu D_N a D_L se vyskytují patrové interakce v kloubu, které jsou stabilní po celou délku simulace. Jedná se o tyto interakce 774G+775G a 776G+777A+778G. (obrázek 47). U motivu D_L se patrová interakce ztratila u bázi 774G+775G v 1-4 ns, ale potom došlo k jejímu obnovení.



Obrázek 47 - Patrová interakce 774G+775G+776G a 777A+778G

U motivu D_{Mg} je patrová interakce mezi bázemi 776G+777A+778G nestabilní, báze spolu netvořily interakci celou simulaci, ale jen do 16 ns, potom se báze 776G vychýlí z patrové interakce a vrátí se ve 22 ns, od 22 do 100 ns se patrová interakce znovu obnoví.

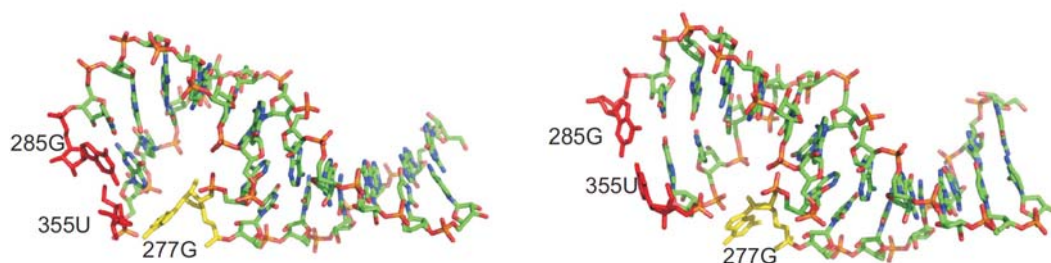
Báze, 777A+778G, jsou na počátku simulace v patrové interakci, ale v první ns se 777A odpojila a do kloubu se vrátila v 7 ns, kde už potom netvořila patrovou interakci, v 61-94ns se přidává k patrové interakci 774G+775G+776G (obrázek 48).



Obrázek 48 – Na snímku vlevo jsou znázorněny patrové interakce v 1ns 777A+778G a 774G+775G+776G, snímek vpravo znázorňuje patrovou interakci v 65 ns 774G+775G+776+777G.

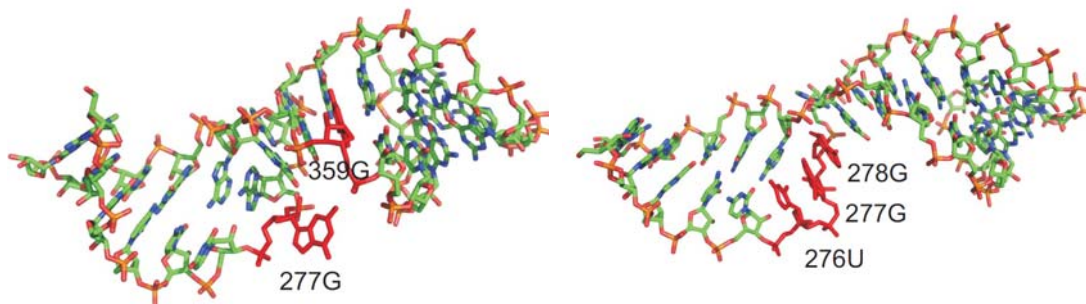
Vyboulené „bulge“ báze

Vyboulená báze 277G se u třech A motivů chová různě. U motivu A_N tato báze interaguje s krajní bází 355U od 3-40 ns, po 40 ns báze 277G interaguje s celým ramenem (355U, 356G, 357C) a tento děj se reverzibilně opakuje několikrát během simulace. Bulge báze tvoří s ramenem báze-fosfát interakce, interakce báze s cukrem, ale dochází k opakovanému trhání (obrázek 49).



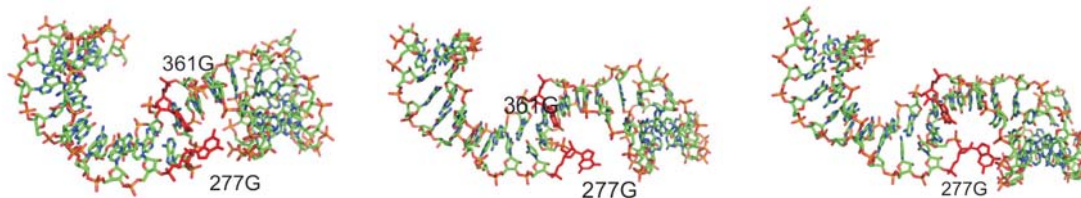
Obrázek 49 – Vlevo interakce motivu A_N „bulge“ báze s okrajovým párem, vpravo interakce „bulge“ báze s ramenem_2 prostřednictvím báze-fosfát interakcí.

V motivu A_L, oproti motivu A_N, se vyboulená báze 277G po uběhnutí 20 ns zanoří do kloubu zůstane v něm do konce simulace. Báze 276U, 277G a 278G jsou po 20 ns naskládány za sebou do patrové interakce a jsou stabilizované do konce simulace (obrázek 50).



Obrázek 50 – Vlevo báze fosfátová interakce mezi 277G a 359G do 20 ns, vpravo po 20 ns vytvoření patrových interakcí 276U, 277G, 278G.

V motivu A_{SL} tato báze 277G interaguje bází 361G do 4 ns, potom je „bulge“ báze volně a od 12 ns dochází k reverzibilnímu osamostatňování a opětovnému přiblížení k bázím *raneme_2* (354A, 355U, 356G), (50-54 ns a 65-68 ns se nachází u ramen). Tyto pohyby se odehrávají až do konce simulace (nejblíže je „bulge“ báze k páteři asi 4 Å a nejdále jsou od sebe vzdáleny 13 Å), (obrázek 51).



Obrázek 51 – Pohyb 277G vyboulené báze u motivu A_{SL}. Na začátku simulace tvoří interakci s 361G do 4 ns, dále se pohybuje volně v prostoru do 12ns a nakonec se naklání k *rameni_2*.

U skupiny motivů B se „bulge“ báze 1583A a 1583U chovali podobně. U všech simulací se báze 1583A hned zpočátku simulace zanořila do kloubu (0,5-1,5 ns) a tvořila ve všech případech patrovou interakci s 1583C do konce simulace kromě motivu B_L, kde došlo k opětovnému vyboulení v čase 79-86 ns. Báze 1584U u motivu B_N zanoří do kloubu v 1,5 ns. V případě B_S dojde k zanoření až v 68-80 ns a 80-100 ns vlaje sama mimo kloub. V případě B_L vlaje v prostoru do 19 ns, potom dojde k zanoření do kloubu do konce simulace.

Motiv C_N obsahuje na rameni_2 nespárovanou „bulge“ bázi 1559U, která směřuje k 1427A prostřednictvím báze-fosfátové interakce 5BPh, jejich počáteční vzdálenost byla 2,88 Å, ale hned v první ns dojde k roztržení a báze vlaje sama prostoru.

Báze v kloubu 1566A má u obou motivů, C_N i C_S , podobné chování. Báze během simulace vlaje sama v prostoru nebo se naklání k páteři, ale ani v jednom motivu nevytvoří patrovou interakci.

U motivů D se vyskytuje pouze „bulge“ báze ve smyčce (793U), která netvoří žádné interakce. Báze 790A a 791G se během simulace dostanou několikrát mimo smyčku a navíc jsou vůči sobě v patrové interakci.

Báze fosfátové interakce

Motivy A_N , A_L a A_{SL} obsahují báze-fosfátovou interakci typu 3BPh (obrázek 28) mezi bázemi 277G(N2)+359G(OP2). Jejich vzdálenost byla v počáteční struktuře 3,14 Å, ihned na začátku simulace se roztrhla a nedošlo k obnovení.

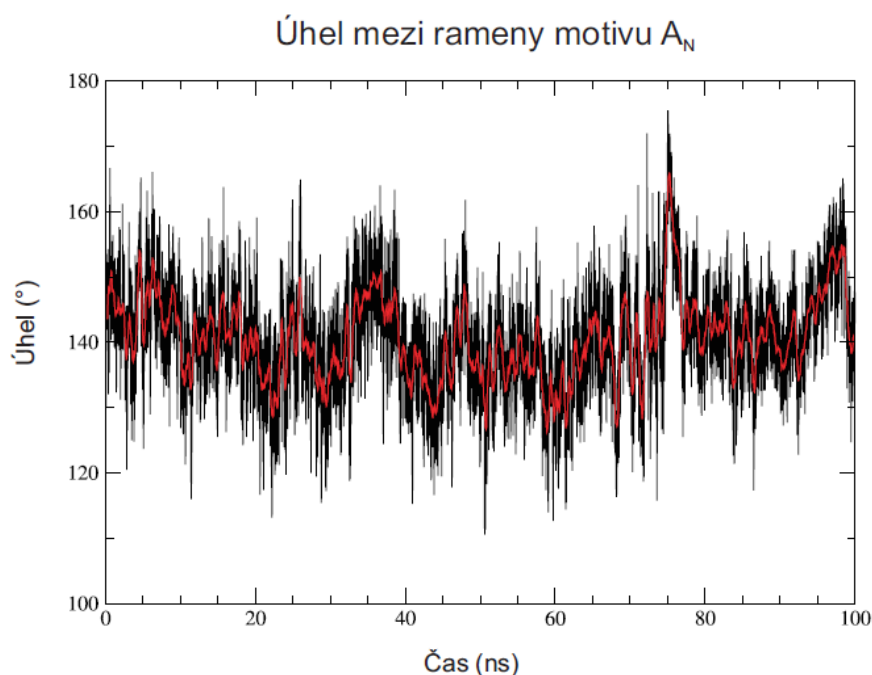
Motivy B_N a B_L obsahují báze-fosfátovou interakci typu 4BPh (obrázek 32) mezi bázemi 1418G(N1, N2)+1579A(OP1). Jejich vzdálenost byla v počáteční struktuře 2,7 Å. U motivu B_N tato vazba setrvala v průměrné vzdálenosti $3,5 \pm 0,3$ Å. U motivu B_L došlo k roztržení vazby a průměrná vzdálenost vazby byla $6,42 \pm 0,7$ Å.

V motivy skupiny C obsahují několik báze-fosfátových interakcí (obrázek 37). Pro motivy C_N i C_S je společná jediná interakce, 6BPh mezi bázemi 1428C(N4)+1570A(OP2). Vzdálenost v počáteční struktuře byla 3,02 Å. U motivu C_N se báze od sebe vzdalují od 20 ns a znovu se přiblíží v 80 ns. U motivu C_S došlo porušení interakce už v prvních deseti ns a nedošlo k obnovení do konce simulace. Další báze-fosfátová interakce, 5BPh mezi bázemi 1427A(OP2)+ 1559U(N3), patří už jen motivu C_N . U této báze-fosfátové interakce došlo už na počátku simulace k roztržení z důvodu natažení motivu. Na počátku simulace byla délka vazby 2,88 Å a průměrná délka vazby v simulaci byla $15,74 \pm 5,36$ Å.

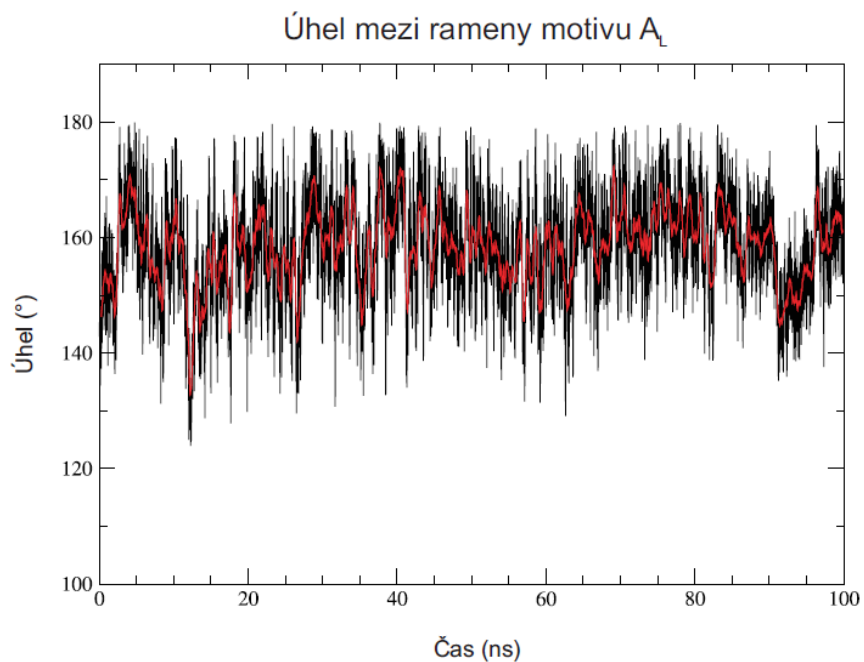
Báze-fosfátové interakce společné pro motivy D_N , D_L , D_{Mg} jsou pouze 4BPh mezi bázemi 776G(N1, N2)+802A(OP1, OP2) a 6BPh mezi bázemi 780A(N6)+801U(OP1). U vazby 4BPh došlo k roztržení už v prvních ns. Vazba 5BPh vydržela celou simulaci. Zbývající báze-fosfátová interakce patříci motivu D_L a D_{Mg} se nachází v kloubu a jedná se o interakci 5BPh mezi bázemi 789U(N3)+792A(OP2) a zde také došlo k zániku vazby už v prvních nanosekundách (obrázek 42).

Měření úhlů mezi rameny.

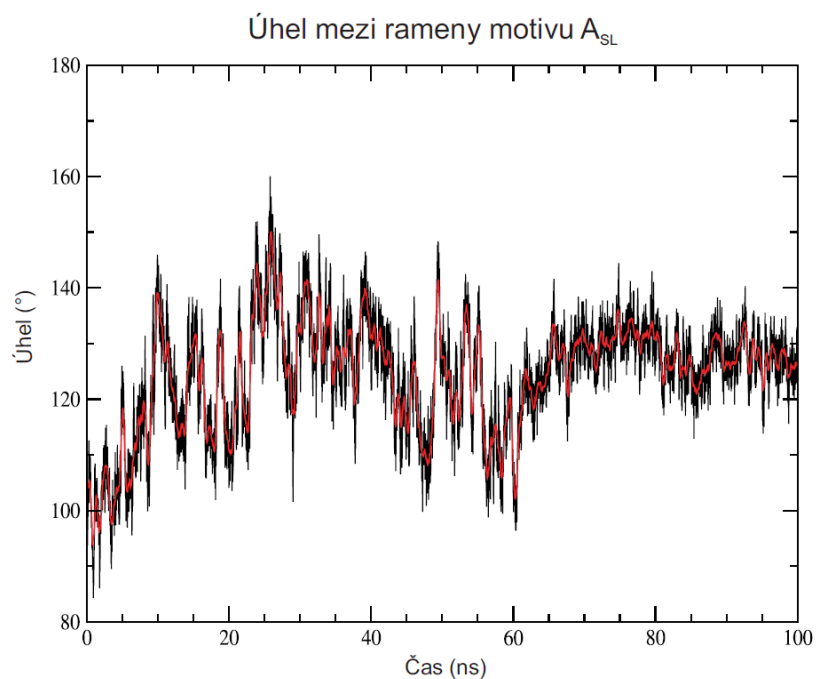
Podle tabulek 3, 4 a také podle vizuální inspekce jsem vybrala stabilní konce ramen a spolu s ohledem na atomy v kloubu jsem vytvořila grafy distribuce úhlů v celé délce simulace. Pod každým grafem se nachází obrázek výrazných stavů, které se vyskytly v simulaci.



Graf 1 - Graf znázorňuje úhel mezi ramenem_1 a ramenem_2, červená linka znázorňuje průměrnou hodnotu úhlu.

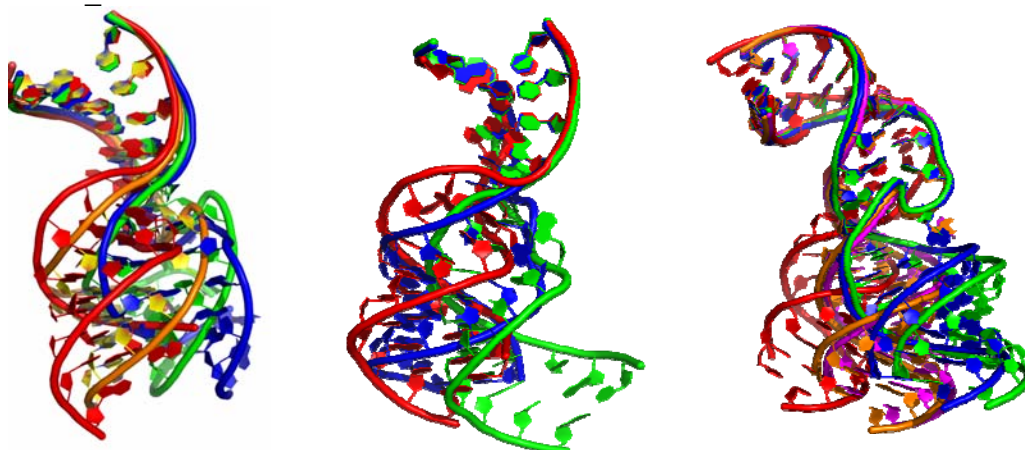


Graf 2 - Graf znázorňuje úhel mezi ramenem_1 a ramenem_2, červená linka znázorňuje průměrnou hodnotu úhlu.



Graf 3 - Graf znázorňuje úhel mezi ramenem_1 a ramenem_2, červená linka znázorňuje průměrnou hodnotu úhlu.

Rameno_1

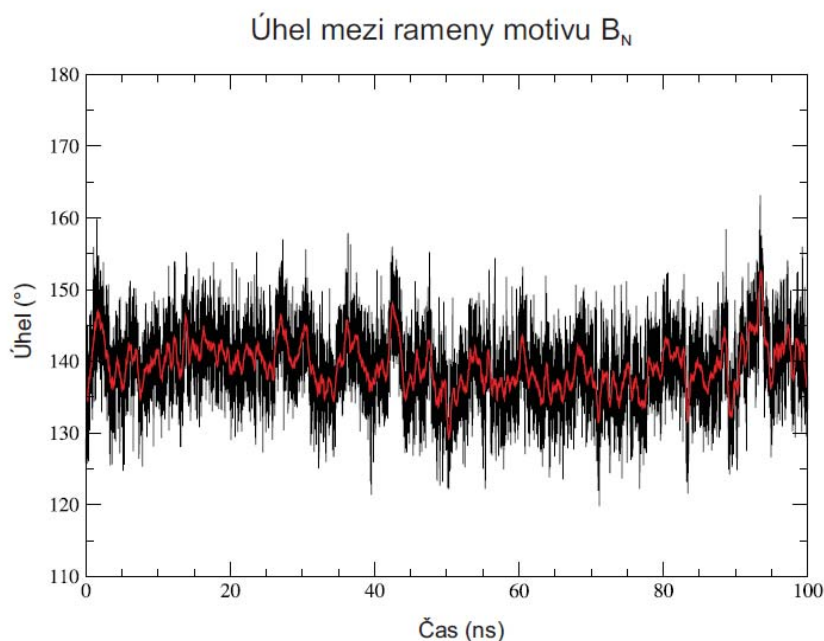


Rameno_2

Obrázek 52- Obrázek vlevo reprezentuje počáteční strukturu motivu A_N (červeně), průměrnou strukturu v čase 35-40 ns (zeleně), průměrnou strukturu v čase 59-62 ns (oranžově) a průměrnou strukturu v čase 80-90 ns (modře).

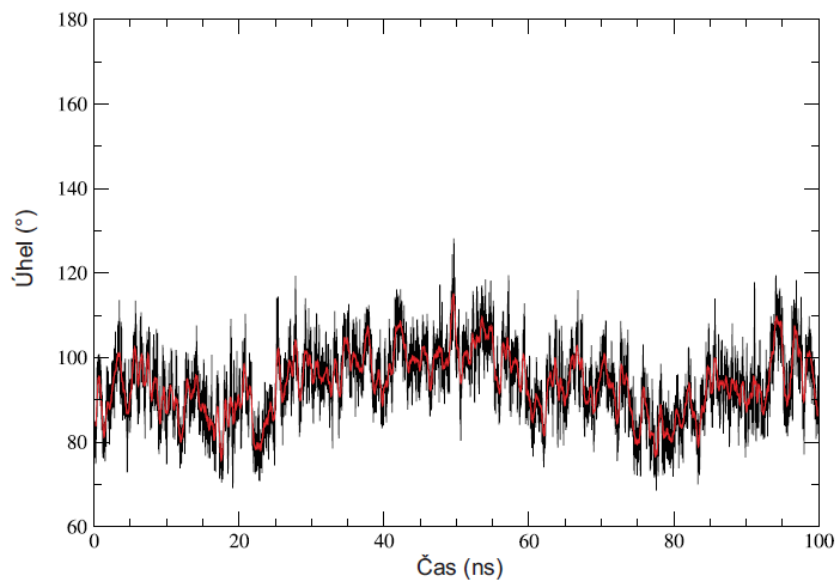
Obrázek uprostřed reprezentuje počáteční strukturu motivu A_L (červeně), průměrnou strukturu v čase 37-42 ns (modře) a průměrnou strukturu v čase 90-95 ns (zeleně).

Obrázek vpravo reprezentuje počáteční strukturu motivu A_{SL} (červeně), průměrnou strukturu v čase 24-27 ns (zeleně), průměrnou strukturu v čase 44-47 ns (růžově), průměrnou strukturu v čase 55-60 ns (oranžově) a průměrnou strukturu v čase 75-80 ns (modře).



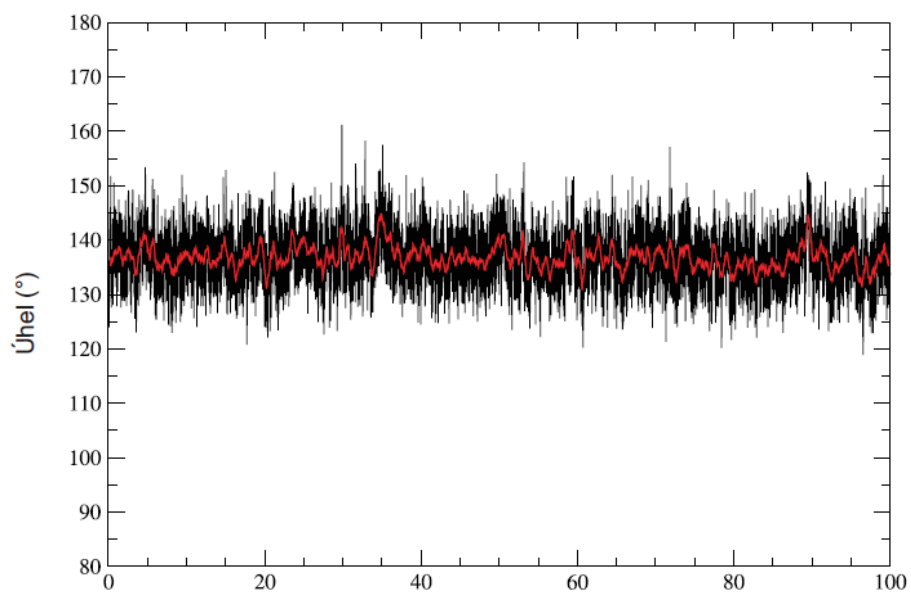
Graf 4 - Graf znázorňuje úhel mezi ramenem_1 a ramenem_2, červená linka znázorňuje průměrnou hodnotu úhlu.

Úhel mezi rameny motivu B_L



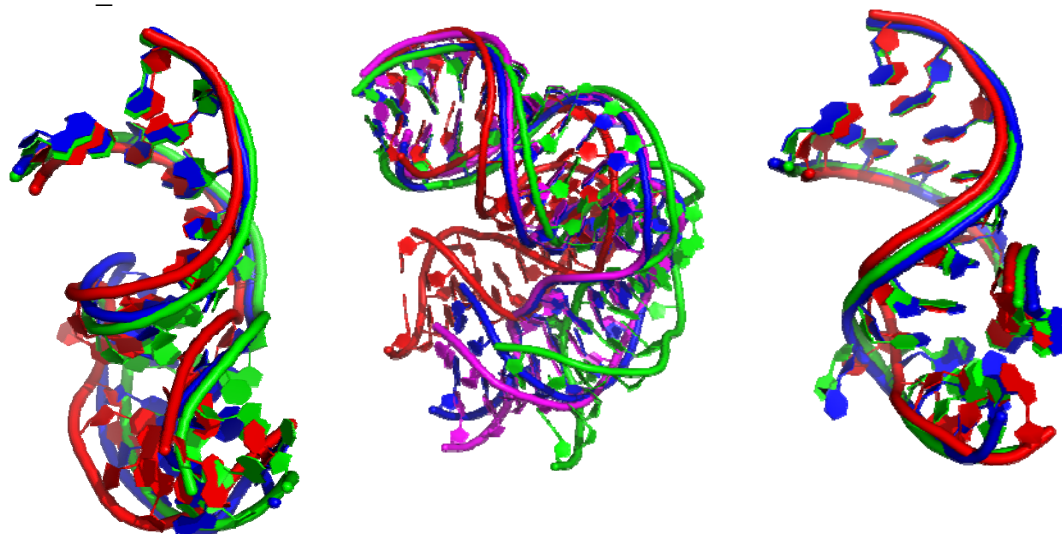
Graf 5 - Graf znázorňuje úhel mezi ramenem_1 a ramenem_2, červená linka znázorňuje průměrnou hodnotu úhlu.

Úhel mezi rameny motivu B_S



Graf 6 - Graf znázorňuje úhel mezi ramenem_1 a ramenem_2, červená linka znázorňuje průměrnou hodnotu úhlu.

Rameno_1

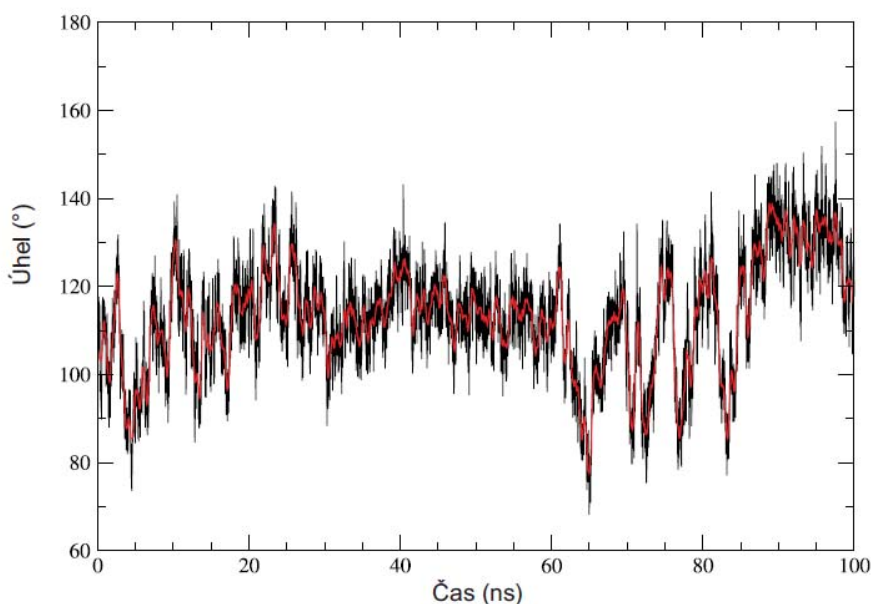


Rameno_2

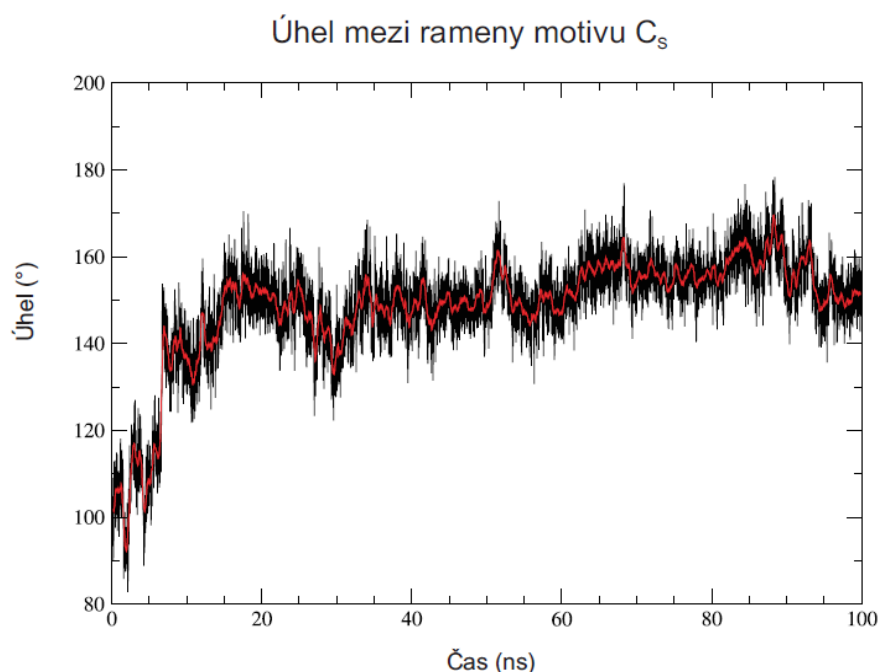
Obrázek 53 - Obrázek vlevo reprezentuje počáteční strukturu motivu B_N (červeně), průměrnou strukturu v čase 40-45 ns (zeleně) a průměrnou strukturu v čase 92-95 ns (modře). Obrázek uprostřed reprezentuje počáteční strukturu motivu B_L (červeně), průměrnou strukturu v čase 42-47 ns (zeleně), průměrnou strukturu v čase 75-85 ns (modře), průměrnou strukturu v čase 85-92 ns (růžově).

Obrázek vpravo reprezentuje počáteční strukturu motivu B_S (červeně), průměrnou strukturu v čase 45-50 ns (modře) a průměrnou strukturu v čase 95-100 ns (zeleně).

Úhel mezi rameny motivu C_N

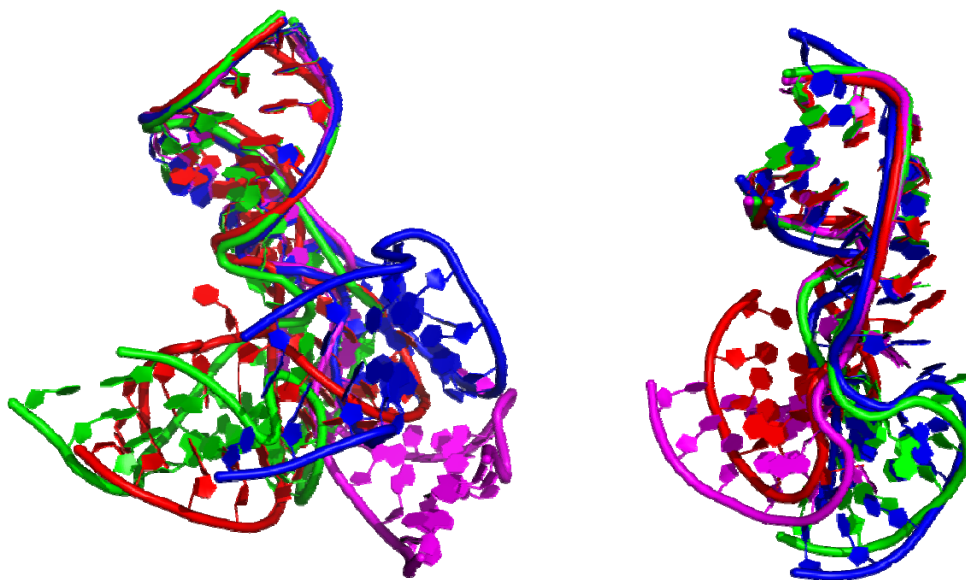


Graf 7 - Graf znázorňuje uhel mezi ramenem_1 a ramenem_2, červená linka znázorňuje průměrnou hodnotu úhlu.



Graf 8 - Graf znázorňuje úhel mezi ramenem_1 a ramenem_2, červená linka znázorňuje průměrnou hodnotu úhlu.

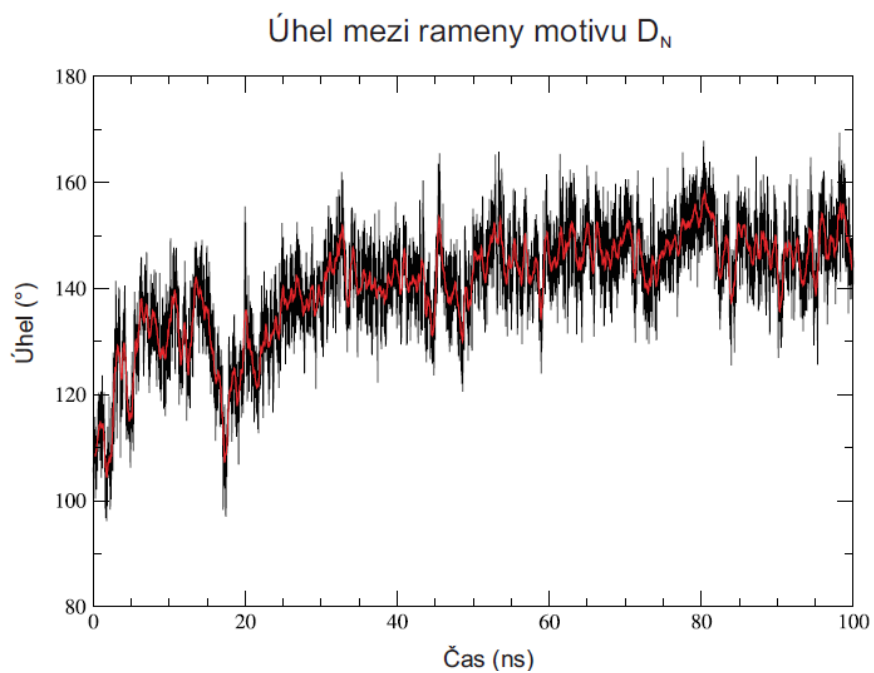
Rameno_1



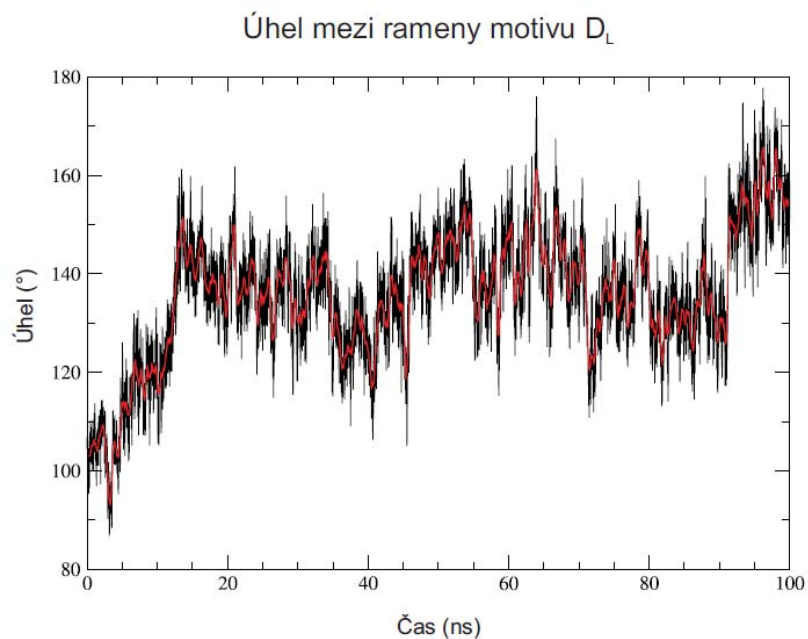
Rameno_2

Obrázek 54 – Obrázek vlevo reprezentuje počáteční strukturu motivu C_N (červeně), průměrnou strukturu v čase 50-55 ns (zeleně), průměrnou strukturu v čase 63-65 ns (modře) a průměrnou strukturu v čase 90-95 ns (růžově).

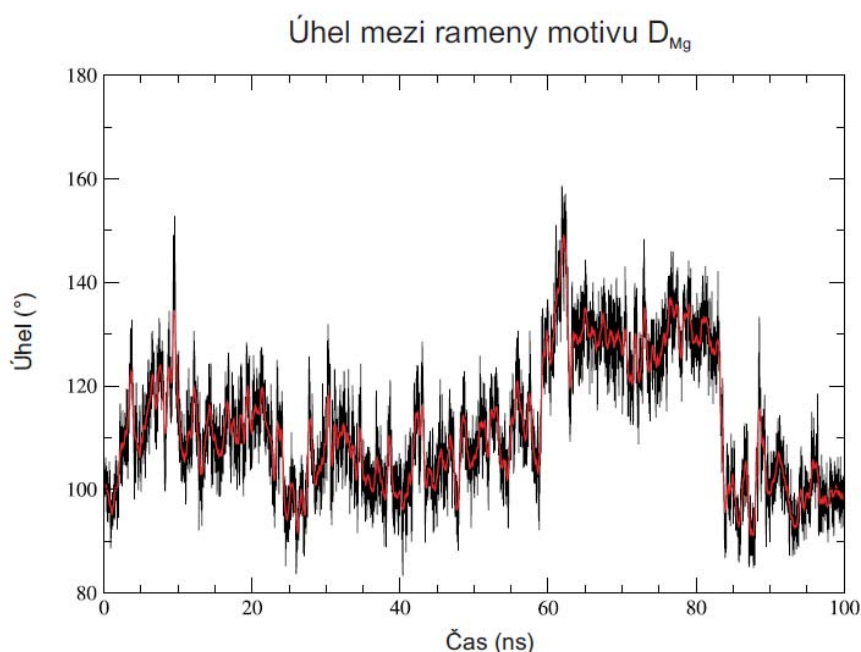
Obrázek vpravo reprezentuje počáteční strukturu motivu C_S (červeně), průměrnou strukturu v čase 2-7 ns (růžově), průměrnou strukturu v čase 7-15 ns (zeleně) a průměrnou strukturu v čase 40-45 ns (modře).



Graf 9 - Graf znázorňuje úhel mezi ramenem_1 a ramenem_2, červená linka znázorňuje průměrnou hodnotu úhlu.

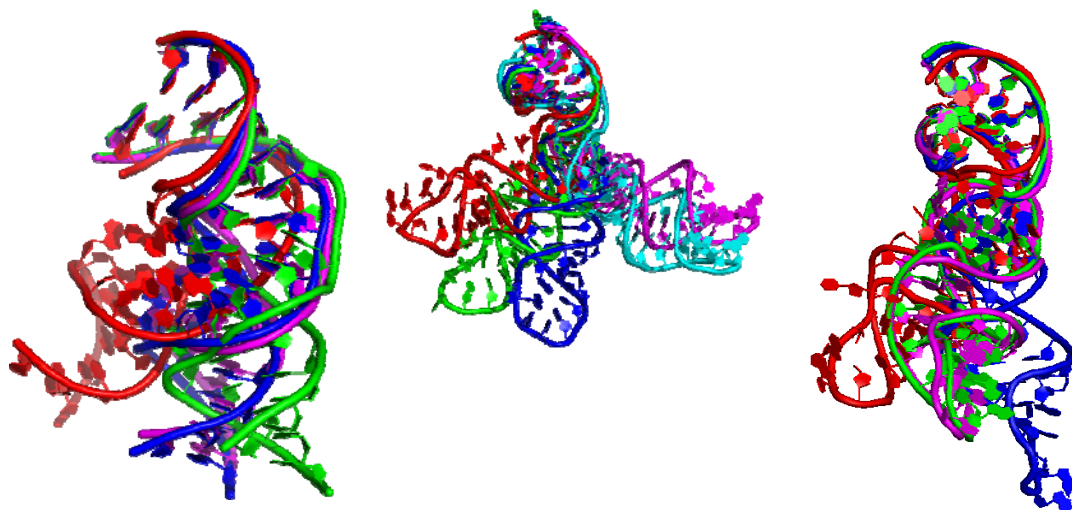


Graf 10 - Graf znázorňuje uhel mezi ramenem_1 a ramenem_2, červená linka znázorňuje průměrnou hodnotu úhlu.



Graf 11 – Graf znázorňuje úhel mezi ramenem_1 a ramenem_2, červená linka znázorňuje průměrnou hodnotu úhlu.

Rameno_1



Rameno_2

Obrázek 55 - Obrázek vlevo reprezentuje počáteční strukturu motivu D_N (červeně), průměrnou strukturu v čase 8-10 ns (modře), průměrnou strukturu v čase 18-20 ns (růžově) a průměrnou strukturu v čase 80-90 ns (zeleně).

Obrázek uprostřed reprezentuje počáteční strukturu motivu D_L (červeně), průměrnou strukturu v čase 5-10 ns (zeleně), průměrnou strukturu v čase 15-35 ns (modře), průměrnou strukturu v čase 80-90 ns (růžově) a průměrnou strukturu v čase 90-100 ns (světle modře).

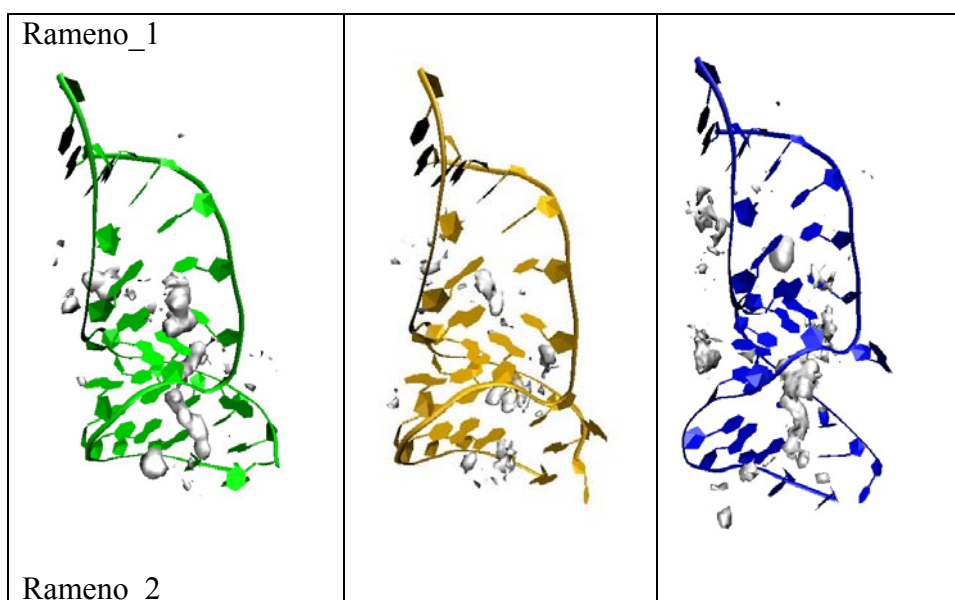
Obrázek vpravo reprezentuje počáteční strukturu motivu D_{Mg} (červeně), průměrnou strukturu v čase 24-28 ns (zeleně), průměrnou strukturu v čase 63-68 ns (modře) a průměrnou strukturu v čase 85-100 ns (růžově).

Analýza hustotních map Na^+ protiontů:

V simulacích se k motivům přidávaly Na^+ ionty, množství jednotlivých iontů je popsáno v kapitole 3.1.2, které zneutralizovali záporný náboj motivů. Motiv A_{SL} je simulován v prostředí KCl a k motivu D_{Mg} se kromě sodných iontů přidávaly ještě ionty hořečnaté.

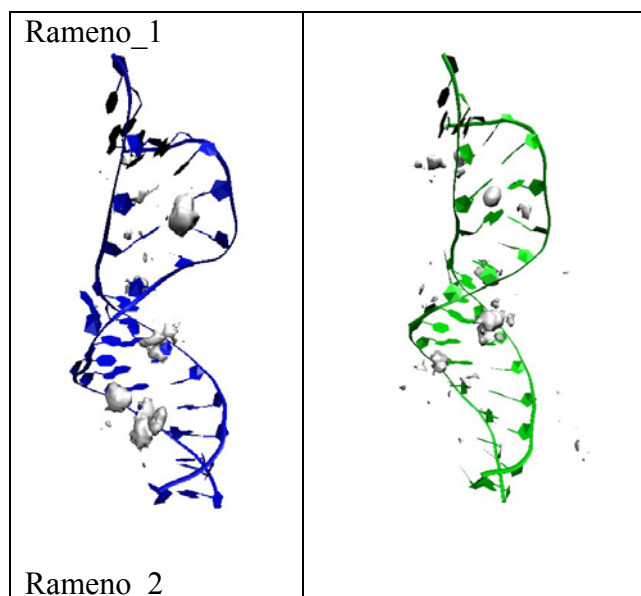
U motivů A_{N} , A_{L} a A_{SL} je největší iontová hustota sodíkových iontů v oblasti kloubu a ramene_2, zejména v okolí dvou G-U wobble párů (báze 284 - 285, 355-356) . U motivu A_{SL} jsou navíc sodíkové ionty lokalizovány i na rameni_1 (báze 270-271, 366-367).

Motiv A_{N} :



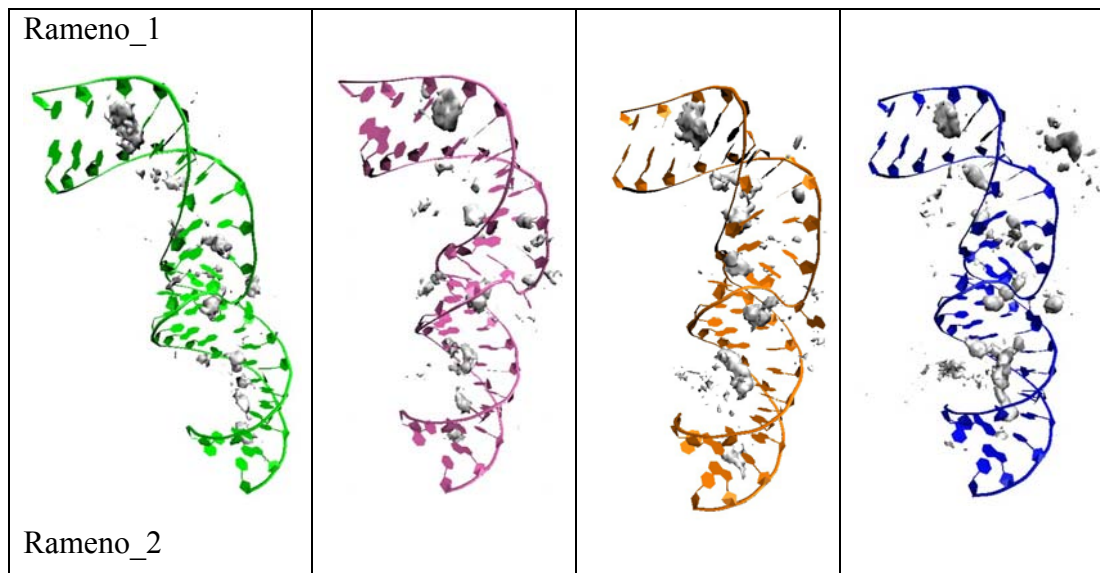
Obrázek 56 – Obrázky reprezentují rozložení sodíkových iontů v určitých momentech motivu A_{N} , které odpovídají grafu 1 a obrázku 52 vlevo. Zeleně je znázorněna průměrná struktura v čase 35-40 ns, oranžově je znázorněna průměrná struktura v čase 59-62 ns a modrou barvou je označena průměrná struktura v čase 80-90 ns.

Motiv A_L:



Obrázek 57 – Obrázky reprezentují rozložení sodíkových iontů v určitých momentech motivu A_L, které odpovídají grafu 2 a obrázku 52 uprostřed. Modře je znázorněna průměrná struktura v čase 37-42 ns a zelenou barvou je označena průměrná strukturu v čase 90-95 ns.

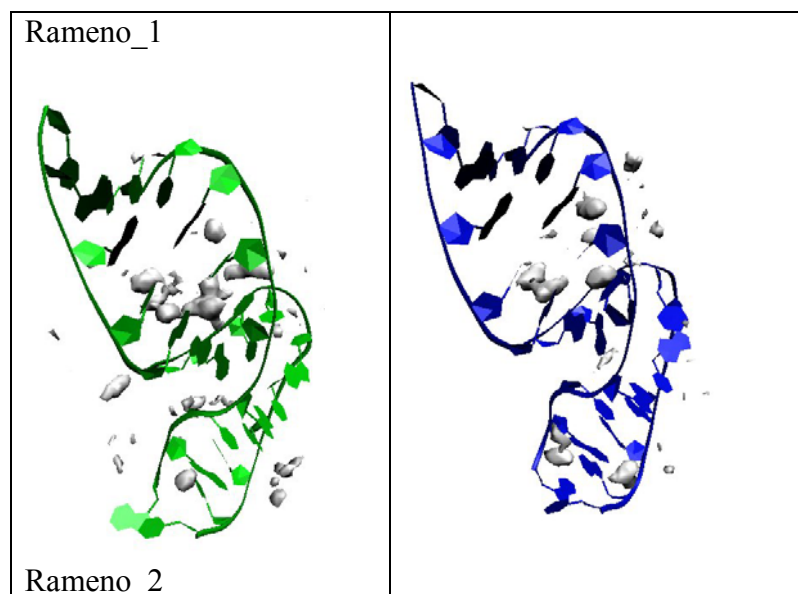
Motiv A_{SL}:



Obrázek 58 – Obrázky reprezentují rozložení sodíkových iontů v určitých momentech motivu A_{SL}, které odpovídají grafu 3 a obrázku 52 vpravo. Zeleně je znázorněna průměrná struktura v čase 24-27 ns, růžovou barvou je označena průměrná struktura v čase 44-47 ns, oranžovou barvou je označena průměrná struktura v čase 55-60 ns modrou barvou je označena průměrná struktura v čase 75-80 ns.

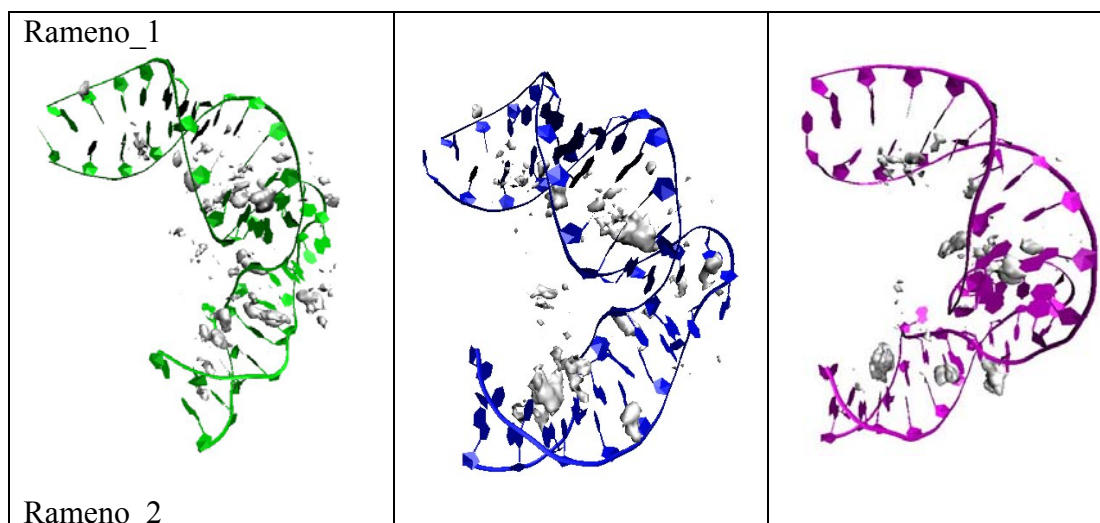
U motivů B_N , B_L a B_S je největší iontová hustota sodíkových iontů v oblasti kloubu a na rameni_2 v okolí nespárované báze 1579A. Motiv B_L obsahuje dva G-U wobble páry (báze 1408+1594, 1422+1576), kde je také prokázán vyšší výskyt sodíkových iontů.

Motiv B_N :



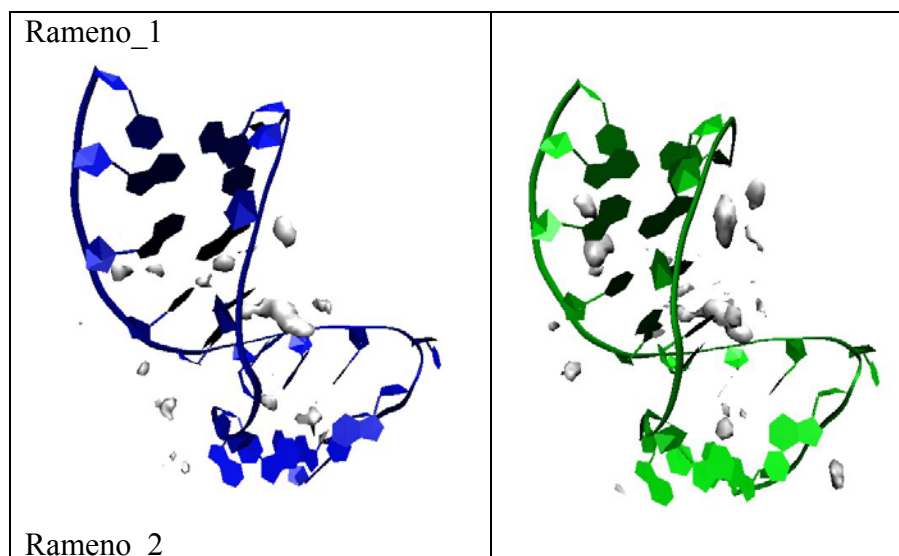
Obrázek 59 – Obrázky reprezentují rozložení sodíkových iontů v určitých momentech motivu B_N , které odpovídají grafu 4 a obrázku 53 vpravo. Zeleně je znázorněna průměrná struktura v čase 40-45 ns a modrou barvou je označena průměrná struktura v čase 92-95 ns.

Motiv B_L :



Obrázek 60 – Obrázky reprezentují rozložení sodíkových iontů v určitých momentech motivu B_L , které odpovídají grafu 5 a obrázku 53 uprostřed. Zeleně je znázorněna průměrná struktura v čase 42-47 ns, modrou barvou je označena průměrná struktura v čase 75-85 ns a růžovou barvou je označena průměrná struktura v čase 85-92 ns.

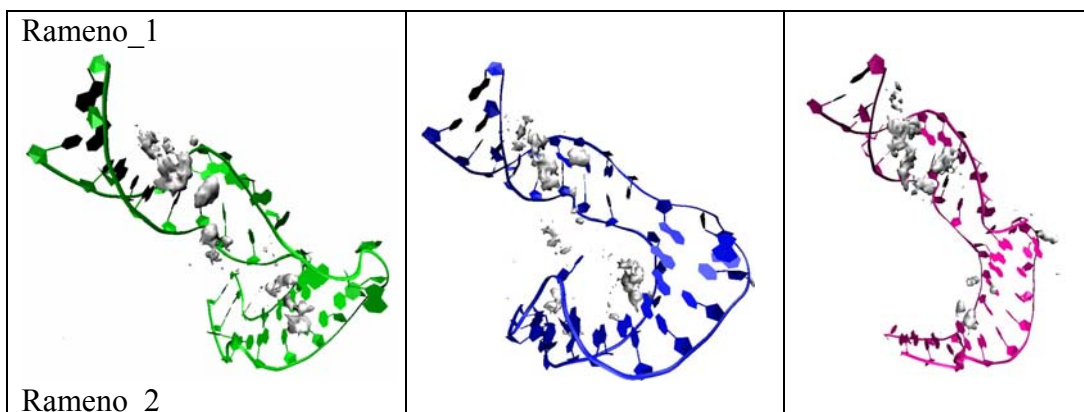
Motiv B_S:



Obrázek 61 – Obrázky reprezentují rozložení sodíkových iontů v určitých momentech motivu B_S, které odpovídají grafu 6 a obrázku 53 vpravo. Modře je znázorněna průměrná struktura v čase 45-50 ns a zelenou barvou je označena průměrná struktura v čase 95-100 ns.

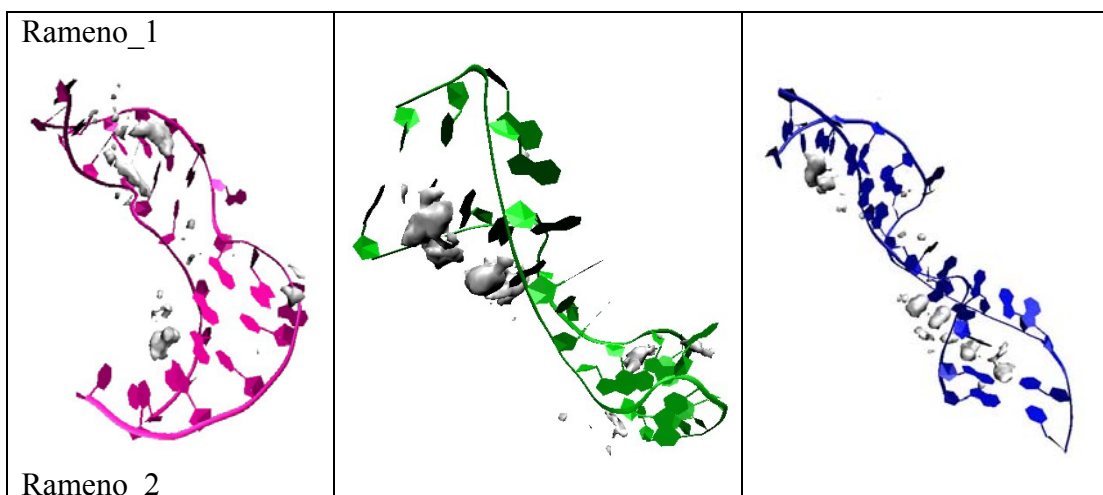
U motivů C_N a C_S je největší iontová hustota sodíkových iontů v oblasti ramene_1. U motivu C_N jsou viditelné sodíkové ionty u páru 1433A+1560G.

Motiv C_N:



Obrázek 62 – Obrázky reprezentují rozložení sodíkových iontů v určitých momentech motivu C_N, které odpovídají grafu 7 a obrázku 54 vpravo. Zeleně je znázorněna průměrná struktura v čase 50-55 ns, modrou barvou je označena průměrná struktura v čase 63-65 ns a růžovou barvou je označena průměrná struktura v čase 90-95 ns.

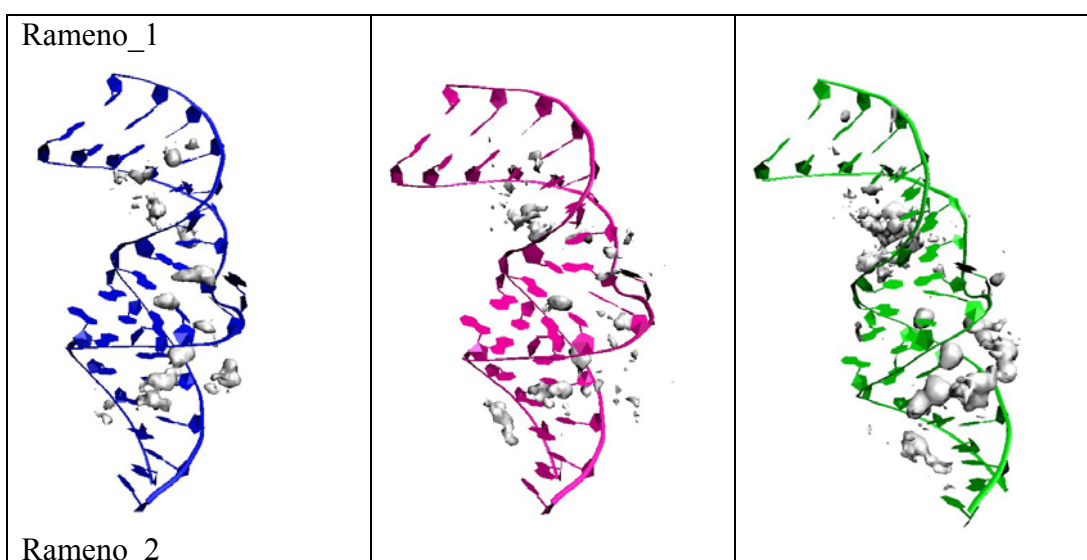
Motiv C_S:



Obrázek 63– Obrázky reprezentují rozložení sodíkových iontů v určitých momentech motivu C_S, které odpovídají grafu 8 a obrázku 54 vpravo. Růžově je znázorněna průměrná struktura v čase 2-7 ns, zelenou barvou je označena průměrná struktura v čase 7-15 ns a modrou barvou je označena průměrná struktura v čase 40-45 ns.

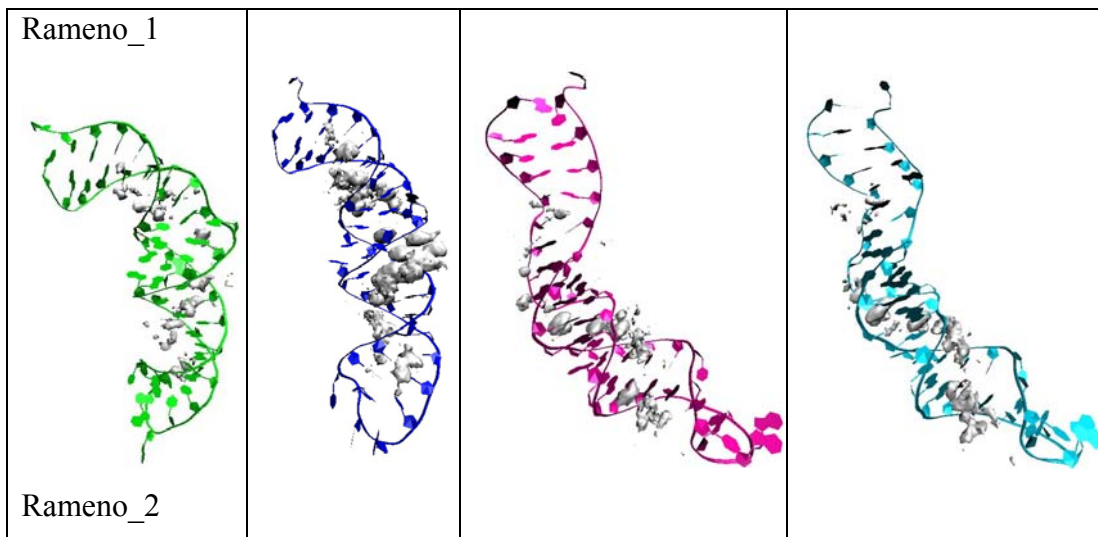
U motivů D_N, D_L a D_{Mg} je největší iontová hustota sodíkových iontů v oblasti kloubu a na rameni_2, zejména ve velkém žlábků.

Motiv D_N:



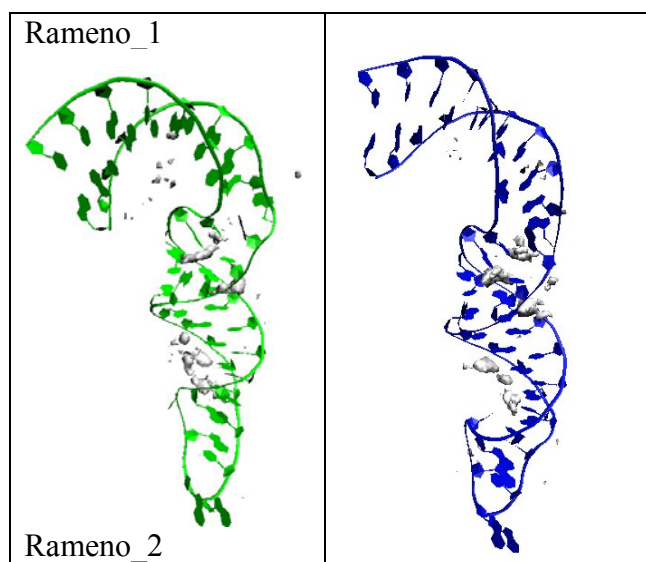
Obrázek 64 – Obrázky reprezentují rozložení sodíkových iontů v určitých momentech motivu D_N, které odpovídají grafu 9 obrázku 55 vlevo. Modře je znázorněna průměrná struktura v čase 8-10 ns, růžovou barvou je označena průměrná struktura v čase 18-20 ns a zelenou barvou je označena průměrná struktura v čase 80-90 ns.

Motiv D_L :



Obrázek 65 – Obrázky reprezentují rozložení sodíkových iontů v určitých momentech motivu D_L , které odpovídají grafu 10 obrázku 55 uprostřed. Zeleně je znázorněna průměrná struktura v čase 5-10 ns, modrou barvou je označena průměrná struktura v čase 15-35 ns a světle modrou barvou je označena průměrná struktura v čase 90-100 ns.

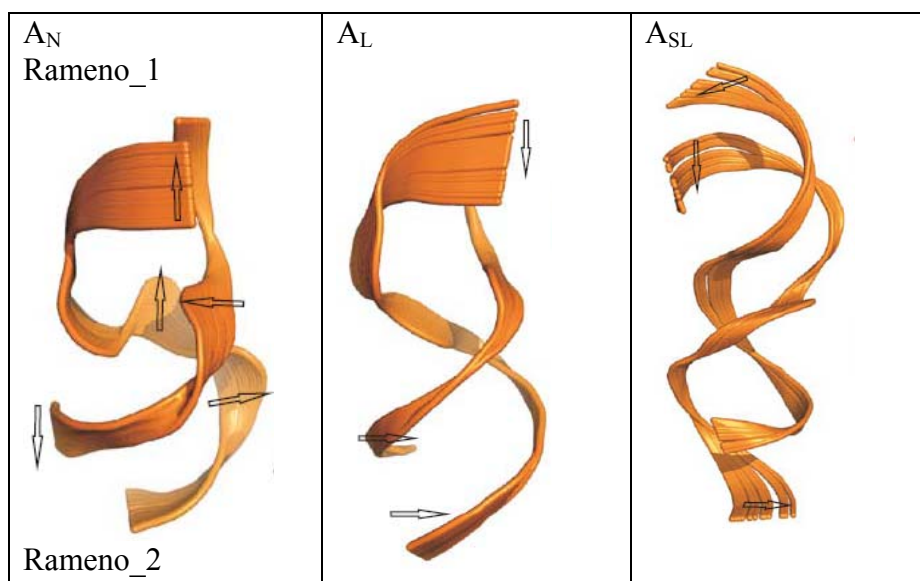
Motiv D_{Mg} :



Obrázek 66 – Obrázky reprezentují rozložení sodíkových iontů v určitých momentech motivu D_N , které odpovídají grafu 11 obrázku 55 vpravo. Zelenou je znázorněna průměrná struktura v čase 24-28 ns a modrou barvou je označena průměrná struktura v čase 63-68 ns.

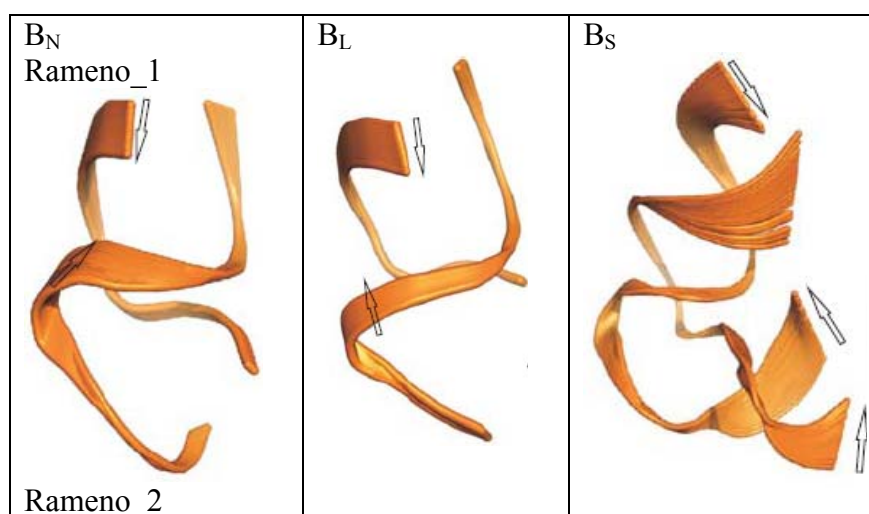
Esenciální dynamika (EDA) :

Motivy A_N , A_L a A_{SL} nevykazují kloubový pohyb, nejpestřejší pohyby každého motivu jsou vyobrazeny na obrázku 67. V motivu A_N pozorujeme, že dochází k pohybům různými směry, které ovšem nelze označit jako kloubové. Dynamika motivu A_L se omezuje pouze na pohyb terminálních částí a jen minimálně v kloubu. Na dynamice A_{SL} je nejvýraznější smršťování motivu.



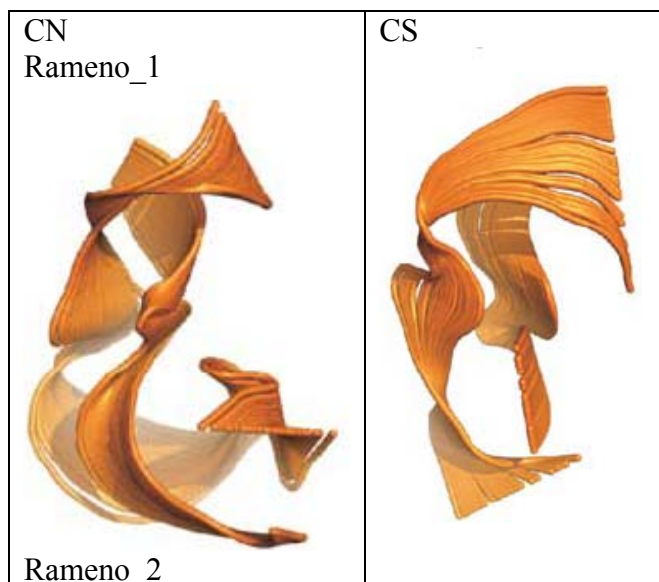
Obrázek 67 - Dynamika motivů A_N , A_L a A_{SL} . Šipky znázorňují směr pohybu.

Motivy B_N , B_S vykazují kloubový pohyb, nejvýrazněji je tento kloubový pohyb ztelný u motivu B_L . Chování motivu B_L se nejvíce podobá typickému kloubovému pohybu kink-turnů, ze všech ostatních motivů, jak lze vidět na obrázku 68.



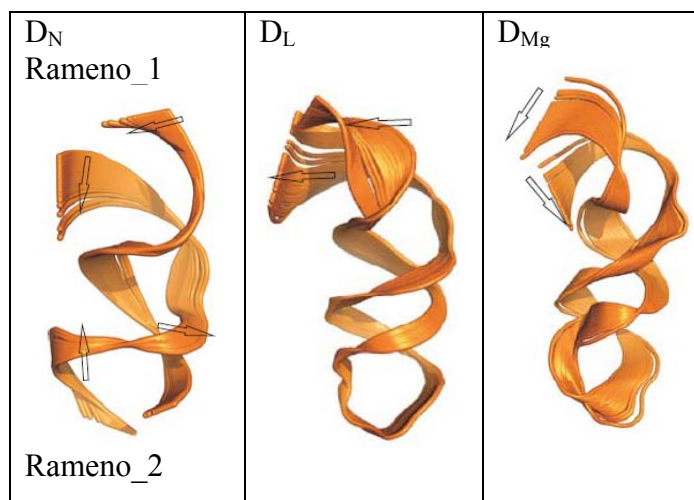
Obrázek 68 - Esenciální dynamika motivů B_N , B_S a B_L . Šipky znázorňují směr pohybu.

U motivů C_N a C_S došlo v simulaci k natažení motivu (obrázek 69). Motiv C_N se natáhne v 76 ns a motiv C_S se natáhne už v 30 ns. U motivu C_N je patrný jeden kloubový pohyb, simulace je ukončena nataženou formou motivu C_N . U motivu C_S lze vidět několik kloubových pohybů, tato simulace je také ukončena nataženou formou motivu C_S .



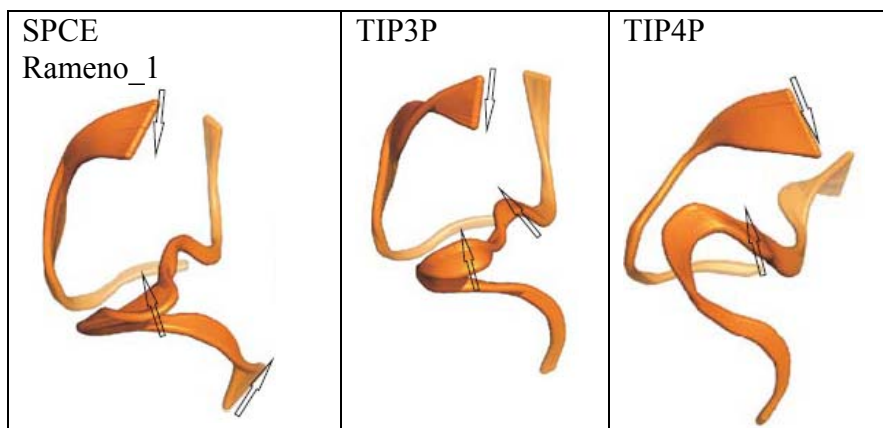
Obrázek 69 - Esenciální dynamika motivů C_N a C_S . U obou motivů došlo k natažení během simulace.

Motivy D_N a D_{Mg} vykazují kloubový pohyb, motiv D_L kloubový pohyb neproказuje (obrázek 70). U motivu D_L je nestabilní první pár a dochází k natahování motivu přibližně od 11 ns.



Obrázek 70 - Esenciální dynamika motivů D_N , D_L a D_{Mg} . Šipky znázorňují směr pohybu. Kloubový pohyb u motivů D_N a D_{Mg} .

Pohyby všech studovaných motivů jsou srovnávány s pohyby Kt-38 (obrázek 71). Kt-38 je zde uveden se třemi druhy vod (SPCE, TIP3Pa TIP4P). Jeho ramena se ohýbají charakteristickým kloubovým pohybem, typickým pro tyto motivy.



Obrázek 71 - Esenciální dynamika Kt-38 s modely vod SPCE, TIP3P a TIP4P. Šipky znázorňují směr kloubového pohybu.

7. Závěr

V posledních letech roste rapidně počet důkazů, které potvrzují, že molekula RNA není jen pouhým nosičem genetické informace. Podobně jako je tomu i u proteinů je funkce molekuly RNA dána spíše její 3D strukturou než sekvencí bází. Metody pro analýzu a kategorizaci jsou stěžejní pro pochopení biologické aktivity RNA. Mnoho metod bylo vyvinuto na úrovni párování bází neboli sekundární struktury. Nevýhodou těchto metod je, že nemohou odhadovat vlastnosti vyšších strukturních celků, jako jsou např. terciární motivy nebo 3D struktury.

Základem diplomové práce bylo studium struktury a dynamiky RNA motivů tvaru L a V, což spočívalo především ve správné a sofistikované selekci motivů a jejich následné simulaci. Cílem práce bylo zjistit zda jsou tyto motivy podobné již dobře známým kink-turn motivům. Po stránce strukturní jsou motivy A, B, C a D podobné motivům kink-turn, které jsou složeny ze dvou ramen a spojeny regionem nespárovaných bází. Motivы postrádají klíčovou interakci A-minor, která způsobuje otevírání a zavírání u kink-turn motivu. Po stránce dynamické se jejich podobnost rozchází. Typickým dynamickým pohybem motivů kink-turn je několika nanosekundový kloubový pohyb, při němž kink-turn osciluje kolem své nativní struktury. U motivů studovaných v práci dochází např. k zalamování konců ramen, rozplétání terminálních párů nebo tzv. dýchání. Kromě motivu B_L, který se nejvíce svou dynamikou podobal motivu kink-turn, nemůžeme o žádném jiném motivu říct, že má podobné chování jako kink-turn. Zřejmě dochází k tomu, že vybrané L-motivy jsou málo stabilní, jelikož ztrácí svou nativní strukturu a tím se výrazně odlišují od kink-turn motivů.

8. Literatura:

- [1] Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello C.C.: **Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans***. Nature, 1998. **391**(6669): 806-811.
- [2] Atkins, P., Paula, J., : **Physical chemistry**. Oxford University Press, 2006.
- [3] Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P.: **The Molecular Biology of the Cell**. Garland Science, 2002.
- [4] Neidle, S.: **Principles of Nucleic Acid Structure**. Oxford University Press, 2008.
- [5] Berg, M.J., Tymoczko, L.J., Stryer, L. : **Biochemistry**. W. H. Freeman and Company, 2002.
- [6] Watson, J.D., Crick, F.H: **A structure for deoxyribose nucleic acid. 1953**. Nature, 2003. **421**(6921): 397-398.
- [7] Leontin, B.N., Westhof, E.: **The annotation of RNA motifs**, Comp Funct Genom, 2002. **3**: 518-524.
- [8] Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. **Základy molekulární biologie**. Espero Publishing, 1998.
- [9] Leontin, B.N., Stombaugh, J., Westhof, E.: **The non-Watson-Crick base pairs and their associated isosteric matrices**. Nucl Acids Res, 2002. **30**(16): 3497-3531.
- [10] Server, M., Zirbel, C.L., Stombaugh, J., Mokdad, A., Leontin, N.B.: **FR3D: finding local and composite recurrent structural motifs in RNA 3D structures**. J Math Biol, 2008. **56**(1-2): 215-52.
- [11] Chastain, M., Finovo, Jr.I.: **Structural elements of RNA**. Prog. Res. Nucleic Acid Res Mol Biol, 1991. **41**: 131-177.
- [12] Mezera, R.A.: **Encyclopedia of Analytical Chemistry**. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2000.
- [13] Woese, C.R., Winker, S., Butelo, RR.: **Architecture of ribosomal RNA: constraints on the sequence of "tetra-loops"**. Proc Natl Acad Sci, 1990. **87**(21): 467-71.

- [14] Hirabayashi, N, Sato, .NS, Suzuki, T.: **Conserved loop sequence of helix 69 in Escherichia coli 23 S rRNA is involved in A-site tRNA binding and translational fidelity.** J Biol Chem, 2006. **281**(25): 17203-11.
- [15] Brot, N., Tate, W.P., Caskey, C.T., Weissbach, H.: **The requirement for ribosomal proteins L7 and L12 in peptide-chain termination.** Proc Natl Acad Sci, 1974. **71**(1): 89-92.
- [16] Gudkov, A.T.: **The L7/L12 ribosomal domain of the ribosome: structural and functional studies.** FEBS Lett, 1997. **407**(3): 253-6.
- [17] Lancaster, L., Lambert, N., Maklan, E., Horan, L., Miller, H.: **The sarcin-ricin loop of 23S rRNA is essential for assembly of the functional core of the 50S ribosomal subunit.** RNA, 2008. **14**(10): 1999–2012.
- [18] Cornish, P.V., Ermolenko, D.N., Staple, D.W., Hoang, Lee., Hickerson, R.P., Miller, H.F., Ha, T.: **Following movement of the L1 stalk between three functional states in single ribosomes.** Proc Natl Acad Sci, 2009. **106**(8): 2571–2576.
- [19] Réblová, K., Lankaš, F., Rázga, F., Koča, J., Šponer, J.: **Structure, Dynamics, and Elasticity of Free 16S rRNA Helix 44 Studied by Molecular Dynamics Simulations.** Biopolymers, 2006. **82**: 504-520.
- [20] Réblová, K., Špačková, N., Štefl, R., Csaszar, K., Koča, J., Leontin, B.N., Šponer, J.: **Non-Watson-Crick Basepairing and Hydration in RNA Motifs: Molecular – dynamic of 5S rRNA Loop E.** Biophysical Journal, 2003. **84**: 3564-3582.
- [21] Nissen, P., Ippolito, J.A., Ban, N., Moore, P.B.: **RNA tertiary interaction in the large ribosomal subunits – the A-minor motif.** Proc Natl Acad Sci, 2001. **98**(9): 4899-4903.
- [22] Šponer, J. E., Réblová, K., Moknad, A., Sychrovský, V., Šponer, J.: **Leading RNA tertiary interaction: Structures, Energie, and WaterInsertion of A-Minor and P-interactions. Quantum chemical View.** J Psych Chem, 2007. **111**: 9153-9164.
- [23] Mokdad, A., Krasovska, V. M., Sponer, J., Leontin, N.B.: **Structural and evolutionary classification of G/U wobble basepairs in the ribosome.** Nucl Acids Res, 2006. **34**(5): 1326-1341.

- [24] Turner, B., Melcher, S.E., Wilson, T.J., Norman, D.G., Lilley, D.M.J., **Induced fit of RNA on binding the L7Ae protein to the kink-turn motif.** RNA, 2005. **11**(8): 1192–1200.
- [25] Winkler, W.C., Grundy, F.J., Murény, B.A., Henkin, T.M.: **The GA motif: an RNA element common to bacterial antitermination systems, rRNA, and eukaryotic RNAs.** RNA, 2001. **7**(8): 1165-1172.
- [26] Bloumin, S., Lafontaine, D.A.: **A loop loop interaction and a K-turn motif located in the lysine aptamer domain are important for the riboswitch gene regulation control.** RNA, 2007. **13**(8): 1256-1267.
- [27] Szewczak, L.B., Gabrielsen, J.S., Degregorio, S.J., Strobel, S.A., Steitz J.A.: **Molecular basis for RNA kink-turn recognition by the h15.5K small RNP protein.** RNA, 2005. **11**(9): 1407-1419.
- [28] Yusupov , M.M., Yusupova, G.Z., Baucom, A., Lieberman, K., Ernest, T.N., Cate, J.H.D., Miller, H.F.: **Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution,** Science, 2001. **292**(5518): 883–896.
- [29] Klein, D.J., Schmeing, T.M., Moore, P.B., Steitz, T.A.: **The kink-turn: a new RNA secondary structure motif.** EMBO Journal, 2001. **20**(15): 4214-4241.
- [30] Goody, T.A., Melcher, S.E., Norman, D.G., Lilley, D.M.J. **The kink-turn motif in RNA is dimorphic, and metal ion dependent.** RNA, 2003. **10**(2): 254–264.
- [31] Cojocaru, V., Klement, R., Jovin TM.: **Loss of G-A base pairs is insufficient for achieving a large opening of U4 snRNA K-turn motif.** Nucleic Acids Res, 2005. **33**(10): 3435-46.
- [32] Liu, J., Lilley David M.J.: **The role of specific 2'-hydroxyl groups in the stabilization of the folded conformation of kink-turn RNA.** RNA, 2007. **13**(2): 200-210.
- [33] Auffinger, P., Westhof, E.: **Simulations of the molecular dynamics of nucleic acids.** Curr Opin Struct Biol, 1998. **8**(2): 227–236.
- [34] Rázga, F., Zacharias, M., Réblová, K., Koča, J., Šponer ,J.: **RNA Kink-Turn as Molecular Elbows: Hydration, Cation Binding, and Large-Scale Dynamics.** Structure, 2006. **14**(5): 825-835.

- [35] Frank, J., Spahn, Ch.: **The ribosome and the mechanism of protein synthesis.** Rep Prog Phys, 2006. **69**: 1383-1417.
- [36] Yonath, A., Mussig, J., Tesche, B., Lorenz, S., Erdmann, V.A., Wittmann, H.G.: **Crystallization of the large ribosomal subunits from *Bacillus stearothermophilus*.** Biochem Int, 1980. **1**: 428–435.
- [37] Trakhanov, S.D., Yusupov, M.M., Agalarov, S.C., Gerber, M.B., Ryazantsev, S.N., Tischenko, S.V., Shirokov, V.A.: **Crystallization of 70S ribosomes and 30S ribosomal subunits from *Thermus thermophilus*.** FEBS Lett, 1987. **220**: 319–322.
- [38] Ramakrishnan, V.: **What we have learned from ribosome structures.** Biochem Soc Trans, 2008. **36**: 567-574.
- [39] Ramakrishnan, V.: **Ribosome structure and mechanism of translation.** Cell, 2002. **108**: 557-572.
- [40] http://www.molgen.mpg.de/~ag_ribo/ag_fucini/index.html (dostupné dne 11.5.2010).
- [41] Rázga, F.: **Structure and Dynamics of RNA: Computational Studies.** Fakulty os Science, Masaryk University, 2007.
- [42] Remko, M.: **Molekulové modelovanie.** Slovak academic Press, 2000.
- [43] Ditzler, M.A., Otyepka, M., Sponer, J., Walter, N.G.: **Molecular dynamics and quantum mechanics of RNA: comformational and chemical change we can believe in.** Acc Chem Res, 2010. **43**(1): 40-7.
- [44] Banáš, P., Jurečka, P., Walter, G.N., Šponer, J., Otyepka, M.: **Theoretical studies of RNA catalysis : Hybrid QM/MM methods and their comparison with MD and QM.** Methods, 2009. **49**: 202-216.
- [45] Schuwirth. B.S., Borovinskaya. M.A., Hau, C.W., Zhang, W., Vila-Sanjurjo, A., Holton, J.M., Cate, J.H.: **Structures of the Bacterial Ribosome at 3.5 Å Resolution.** Science, 2005. **310**(5749): 827 – 834.
- [46] Deng, N.J, Cieplak, P.: **Free energy profile of RNA hairpins: a molecular dynamics simulation study.** Biophys J, 2010. **98**(4): 627-36.
- [47] Mlýnský, V., Banáš, P., Hollas, D., Réblová, K., Walter, N.G., Šponer, J., Otyepka, M.: **Extensive Molecular Dynamics Simulations Showing That**

Canonical G8 Protonated A38H(+)Forms Are Most Consistent with Crystal Structures of Hairpin Ribozyme. J Phys Chem B, 2010. **114**(19): 6642-52.

[48] <http://www.rna.icmb.utexas.edu> (dostupné dne 4.5. 2010).

9. Summary

Living organisms in their cells contain many organelles and one of them is a ribosome. Basic function of the ribosome is the production of proteins which are necessary for an organism. Study of the ribosome is carried out in terms of both experimental and theoretical computational chemistry. Theoretical chemistry allows an unique all atomic view to structures that cannot be achieved by any experimental methods. In recent years a significant progress, enabled an insight not only the composition and structure of the ribosome, but also to some concrete steps that occur during production of proteins. The Kink-turn 42 was identified as a direct participant in translation, which moves the amino-t-RNA synthetase from A to P site on the ribosome. In ribosomes there are also parts of ribonucleic acid of unclear function.

The aim of this diploma thesis was to simulate the behavior of L or V shaped RNA segments in aqueous environment and to compare there it with the known behaviour of Kink-turn motives. Four motives were selected and labeled as A, B, C and D, their lengths were modified and eleven variants created and further analyzed by 100 ns simulations.

In addition to study of the dynamic behavior of rRNA during the simulation, an attention is also paid to the crystal structure of motives in ribosome. Bulged or unpaired bases, stack interactions, loops, base phosphate interactions are reported. Analysis of the dynamic behaviour focusses on e.g. the stability of terminal pairs of arms, behaviour of bulged bases, stability of stack interactions and base-phosphate interactions, formation of artificial structures. Typical hinged behaviour that is characteristic for the Kink-turn motives was found only in the simulation of the motif B. Other motives showed non-specific movements that can not be described as a Hinge-like motions.

Příloha3 - Sekundární struktura malé ribozomální podjednotky organismu *E. coli* [48].

