

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální chemie



Interakce RNA s lipidy

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Adéla Chadalíková
Studijní program:	B 1407 Chemie
Studijní obor:	Aplikovaná chemie
Vedoucí práce:	Mgr. Petra Kührová, Ph.D.

V OLOMOUCI 2023

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci na téma Interakce RNA s lipidy vypracovala pod vedením vedoucího bakalářské práce samostatně, za použití v práci uvedených pramenů a literatury. Dále prohlašuji, že tato bakalářská práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Olomouci dne _____

podpis studenta

Poděkování

Ráda bych touto cestou vyjádřila poděkování Mgr. Petře Kührové, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost, cenné rady a diskuse při vypracování této bakalářské práce. Rovněž bych chtěla poděkovat Mgr. Markétě Paloncýové, Ph.D. za vstřícnost a pomoc při získávání potřebných informací a podkladů. Také bych chtěla vyjádřit vděčnost a poděkování Katedře fyzikální chemie na Přírodovědecké fakultě Univerzity Palackého v Olomouci a jejím zaměstnancům. Stejně tak bych chtěla poděkovat Českému institutu výzkumu a pokročilých technologií (CATRIN), který mi spolu s Katedrou fyzikální chemie poskytl výpočetní čas na superpočítači, nutný pro mou bakalářskou práci. Tato práce byla rovněž podpořena Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky prostřednictvím e-INTRA CZ (ID:90140).

BIBLIOGRAFICKÁ

IDENTIFIKACE

Jméno a příjmení autora:	Adéla Chadalíková
Název práce:	Interakce RNA s lipidy
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	Katedra fyzikální chemie
Vedoucí práce:	Mgr. Petra Kührová, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2023

Abstrakt:

Lipidové nanočástice jsou aktuálně v centru pozornosti jak teoretických, tak praktických výzkumných skupin. Jedná se o nanočástice tvořené různými typy lipidů, které obklopením RNA umožňují její přenos biologickým systémem. Interakce RNA s těmito lipidy je tedy stěžejní. V současnosti se výzkumné týmy snaží o objasnění všech dějů, ke kterým dochází jak při vzniku, tak při rozpadu této nanočástice, a to nejen experimentálními, ale i teoretickými nástroji. Ideálním teoretickým přístupem popisu chování lipidových nanočástic jsou molekulárně-dynamické simulace. Tato bakalářská práce se zabývala interakcemi mezi lipidy a molekulou RNA. Ve všech simulacích byla použita krátká sekvence RNA – GAGA smyčka. Z řad lipidů byly použity ionizovatelné lipidy, fosfolipidy a cholesterol. Nejprve byly vytvořeny simulační systémy obsahující pouze jednoho zástupce lipidů a RNA, následně byly vystavěny i systémy obsahující všechny používané lipidy v procentuálním zastoupení podobné skutečně používaným lipidovým nanočásticím. Ve všech případech nedocházelo k zásadnímu ovlivňování chování molekuly RNA. Lipidy se s rostoucím počtem začínaly postupně organizovat do kompaktních struktur. Nicméně ani při simulaci obsahující 60 lipidů nedošlo k obalení celé RNA a tím vytvoření lipidové nanočástice.

Klíčová slova:	MD simulace, lipidy, smyčka RNA, lipidové nanočástice, vzájemné interakce
Počet stran:	61
Jazyk:	Český

BIBLIOGRAPHICAL

IDENTIFICATION

Autor' s full name: Adéla Chadalíková
Title: Interaction RNA with lipids
Type of thesis: Bachelor
Department: Department of physical chemistry
Supervisor: Mgr. Petra Kührová, Ph.D.
The year of presentation: 2023

Abstract:

Lipid nanoparticles are currently the focus of both theoretical and experimental research groups. These nanoparticles are composed of different types of lipids that can surround an RNA molecule and allow its transfer through the biological objects. The interaction between RNA and these lipids is crucial. Research teams are currently trying to elucidate all the processes that take place during the formation and disintegration of nanoparticles, using not only experimental but also theoretical tools. Molecular dynamics simulations are an ideal way to describe the behaviour of lipid nanoparticles. This bachelor thesis is focused on the interactions between lipids and the RNA molecule. A short RNA – GAGA tetraloop was used in all simulations. The used lipids were ionizable lipids, phospholipids and cholesterol. Simulation systems containing only one representative of lipids and RNA were constructed first, followed by systems containing all lipids. In these systems, similar proportions were used as for real lipid nanoparticles. In all cases, there was no interference with the RNA molecule. The lipids gradually began to organize themselves into compact structures as their number increased. However, even in the simulations containing 60 lipids, the entire RNA was not enveloped in a lipid nanoparticle.

Keywords: MD simulation, lipids, RNA loop, lipid nanoparticles, mutual interactions
Number of pages: 61
Language: Czech

OBSAH

1	Úvod	7
2	Teoretická část	9
2.1	Nukleové kyseliny	9
2.1.1	Páteř RNA.....	12
2.1.2	Glykosidický torzní úhel.....	12
2.1.3	Konformace cukru.....	13
2.1.4	Helikální parametry párů bází	14
2.2	Struktura RNA	15
2.3	Lipidy.....	17
2.3.1	Fosfolipidy	20
2.3.2	Ionizovatelné lipidy	21
2.3.3	Cholesterol.....	23
2.3.4	Lipidové nanočástice	23
2.4	Molekulové simulace.....	24
2.4.1	Molekulárně dynamické simulace	25
2.4.2	Molekulová mechanika	25
2.4.3	Silová pole.....	25
3	Praktická část	28
3.1	Nastavení simulací	28
3.2	Použité analýzy	29
3.3	GAGA tetraloop.....	30
3.4	Systémy obsahující jeden druh lipidu.....	31
3.5	Systémy obsahující více druhů lipidů	41
4	Závěr.....	56
5	Summary	57

1 ÚVOD

V dnešní době jsou systémy obsahující ribonukleovou kyselinu (RNA, *ribonucleic acids*) a lipidy ve středu pozornosti jak teoretické, tak experimentální chemie. RNA se ukazuje jako životně důležitá biomolekula plnící v organismu řadu důležitých funkcí. V poslední době se ukázalo, že by se RNA, přesněji mRNA (*messenger RNA*) či siRNA (*small interfering RNA*) mohly využívat jako léčivo na mnoho závažných onemocnění. Nejsložitější krok však spočívá v jejich správném, rychlém a efektivním dopravování do příslušných buněk. Jednou z alternativ doručování se ukázaly být tzv. lipidové nanočástice LNP (z angl. *lipid nanoparticles, LNPs*), které se skládají z více typů lipidů obalující RNA tak, aby zabránily její degradaci cestou na místo určení. Doposud publikované práce zkoumající chování RNA a LNP probíhaly na úrovni experimentální (NMR techniky, kryo-elektronová mikroskopie apod.) [1][2][3][4] i teoretické (MD simulace) [5][6][7] chemie. V současnosti je snaha o vylepšování komponent stávajících LNP. [8] Studie zabývající se molekulárně dynamickými (MD) simulacemi lipidových nanočástic, tedy systémů obsahující tisíce lipidů, se simulují primárně v tzv. hrubozrnném rozlišení, kde je více atomů reprezentováno jednou částicí. Ačkoliv toto rozlišení umožňuje díky svému zjednodušení studovat chování celé lipidové nanočástice, je nezbytné popsat i chování v atomárním rozlišení.

Jedna z neaktuálnějších teoretických prací studovala chování LNP, jejichž složení bylo podobné složení LNP použitých při boji proti onemocnění COVID-19 nejen v hrubozrnném, ale také atomárním rozlišení. V případě hrubozrnné simulace byly studovány systémy obsahující až 4000 lipidů a v případě atomárního rozlišení se jednalo o simulace s 400 lipidy. [9] Tento případ krásně demonstruje omezení dané atomárním rozlišením. I když atomární rozlišení poskytuje velice cenné poznatky, se současnou výpočetní technikou nejsme schopni studovat chování systémů dostatečně velkých na to, aby se velikost alespoň blížila velikosti lipidové nanočástice.

Cílem této bakalářské práce bylo pomocí principů molekulové dynamiky sestavit několik simulačních systémů pro zkoumání vlivů molekul lipidů na krátkou sekvenci RNA. Naším cílem bylo určit, zda a jakým způsobem spolu lipidy a RNA interagují a jak se vzájemně ovlivňují. Zástupcem RNA zde byla krátká GNRA smyčka. Z řad lipidů byly vybrány lipidy, které se běžně používají v LNP, tedy ionizovatelné

lipidy a lipidy běžně se vyskytující v těle, fosfolipidy a cholesterol. Nejdříve byly vytvářeny systémy obsahující RNA a jeden druh lipidu, a to ve třech velikostech – po pěti, deseti a dvaceti lipidech. Následně byly vystavěny složitější systémy obsahující všechny ze zmíněných lipidů, v poměrovém zastoupení podobným lipidovým nanočásticím. Zde byly vytvořeny dvě velikosti systémů, a to se 30 a 60 lipidy. Až u 60 lipidových systémů byla struktura systému částečně podobná LNP, nedocházelo však k obalení molekuly RNA lipidy.

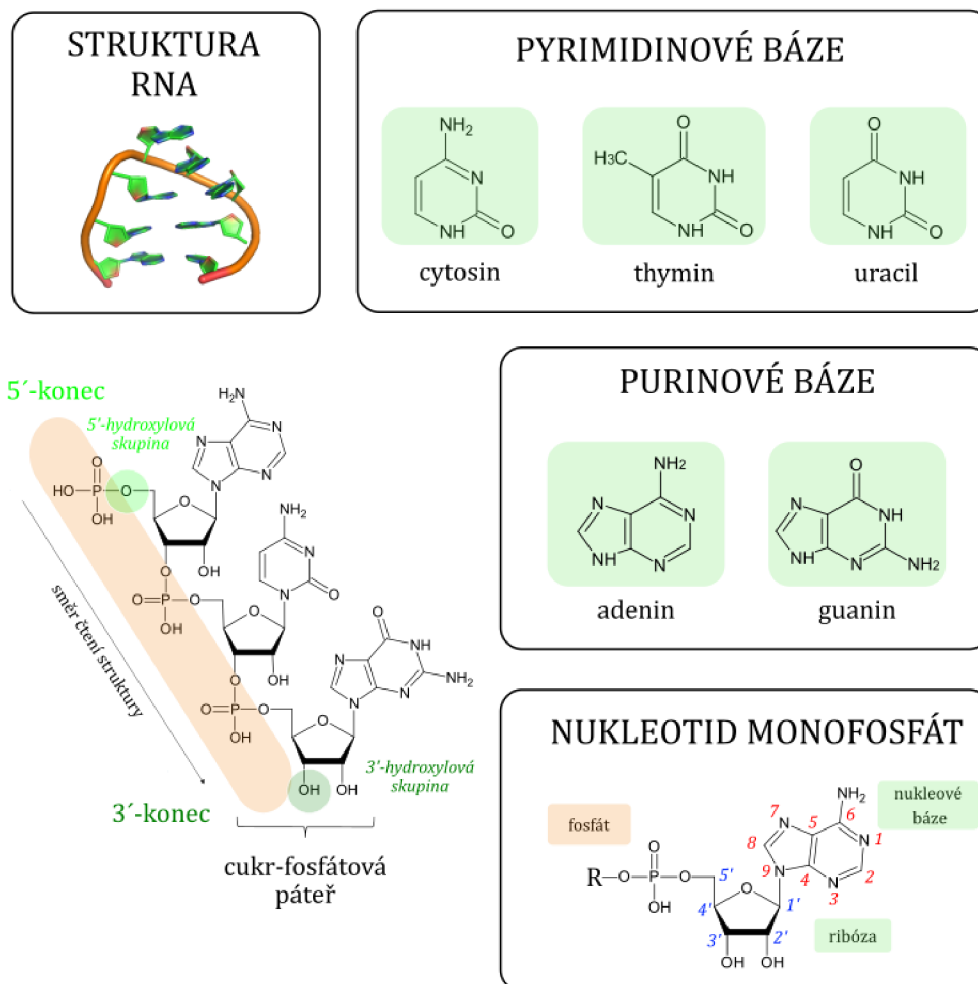
2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 NUKLEOVÉ KYSELINY

Nukleové kyseliny (NK) jsou spolu s lipidy, sacharidy a bílkovinami jednou z nepostradatelných tříd biomolekul. Jsou dvojího typu – DNA (deoxyribonukleová kyselina, *deoxyribonucleic acid*) a RNA (ribonukleová kyselina, *ribonucleic acid*). Ačkoliv se jedná o podobné molekuly, rozdíly, kterými oplývají, mají důležitý vliv na jejich funkce v organismech. Nukleové kyseliny se skládají ze tří komponent: pětičlenného monosacharidu, fosfátu (esterifikovaná kyselina fosforečná) a nukleové báze. Monosacharidy a fosfáty tvoří dohromady **páteř nukleové kyseliny**. Obě uvedené nukleové kyseliny se vzájemně liší svou strukturou. Páteř RNA je tvořena sacharidem ribózou, zatímco páteř DNA je tvořena 2'-deoxyribózou, která na uhlíku C2' nemá navázanou hydroxylovou skupinu. Nukleové báze jsou odvozeny od heterocyklických sloučenin purinu a pyrimidinu. Purin se skládá z kondenzovaně spojeného pyrimidinového a imidazolového kruhu a jsou od něj odvozeny dvě báze, tedy adenin (A) a guanin (G). Pyrimidin je šestičlenný kruh, od kterého jsou odvozeny celkem tři báze – thymin (T), uracil (U) a cytosin (C). V DNA se vyskytují báze adenin, guanin, cytosin a thymin, zatímco v RNA je thymin nahrazen uracilem.

Jednotlivé atomy tvořící strukturu nukleových kyselin, mají pevně stanovený řád pro jejich číslování. Atomy uhlíků a dusíků v nukleových bázích se označují běžnými arabskými číslicemi (1, 2, 3, ...), zatímco při popisu polohy atomů na pětičlenném kruhu jsou používány číslice s čarou (1', 2', 3', ...). V běžné literatuře je možné setkat se s pojmem **nukleosid**, což označuje strukturu skládající se z purinové či pyrimidinové báze, která je připojena N-glykosidovou vazbou na C1' ribózy/2'-deoxyribózy. **Nukleotidy** jsou fosfátové estery příslušných nukleosidů. Jednotlivé nukleotidy se následně vzájemně pojí pomocí fosfodiesterových vazeb mezi 3'-hydroxylovou skupinou jednoho nukleosidu a 5'-hydroxylovou skupinou následujícího nukleosidu. Je tedy zřejmé, že vzniklé konce tohoto libovolně dlouhého řetězce nebudou shodné. Jeden konec bude mít volnou 5'-hydroxylovou skupinu, zatímco druhý konec bude mít volnou 3'-hydroxylovou skupinu. Právě díky rozdílnosti těchto konců označujeme jednotlivé konce jako 5'-konec a 3'-konec. Toto označení je klíčové pro popis všech syntéz nukleových kyselin, které probíhají od 5'-konce po 3'-konec. V tomto směru je také čtena genetická informace, což je

zjednodušeně řečeno návod pro tvorbu proteinů. Výše zmíněné informace jsou graficky shrnuty v níže přiloženém obrázku (Obrázek 1).

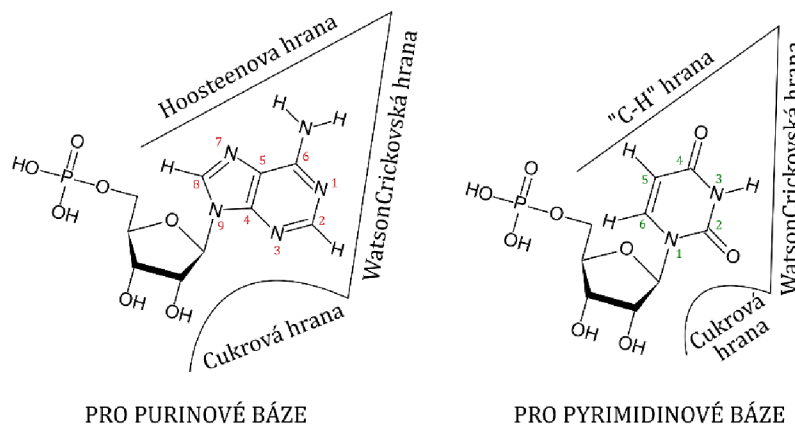


Obrázek 1 Přehled purinových a pyrimidinových bází a jejich číslování, popis struktury nukleotidu a krátkého řetězce RNA na kterém je znárodněna cukr-fosfátová páteř, 5'-konec a 3'-konec a směr čtení řetězce.

Absence hydroxylové skupiny na C2' ribózy v DNA zapříčiňuje, že DNA je stabilnější než RNA. Tato důležitá vlastnost je zapříčiněna skutečností, že DNA je nositelkou genetické informace a musí být tedy co nejvíce chráněna před jakýmkoliv narušením své struktury působením vnějších vlivů. Důvodem, proč se v DNA vyskytuje thymin, a ne uracil je, že uracil je velice nestabilní a může též vznikat deaminací cytosinu, který je mu strukturně podobný. Thymin má však na C5 navázanou methylovou skupinu, která tento problém eliminuje. Další viditelnou odlišností těchto biomolekul je délka jejich řetězců – DNA se vyskytuje ve formě dvoušroubovice a má obecně delší řetězec v porovnání s RNA. Přítomnost druhého vlákna vede k vyšší stabilizaci DNA a

zároveň je možné toto druhé vlákno použít v případě porušení prvního vlákna jako předlohu pro dotvoření porušené části.

Nukleové báze jsou mezi sebou **komplementární**. To znamená, že se mohou pomocí vodíkových vazeb párovat s jinými, pro sebe komplementárními dusíkatými bázemi. Vždy se páruje purinová báze s pyrimidinovou, tedy adenin s uracilem (v případě DNA s thyminem) a cytosin s guaninem. Adenin s uracilem/thyminem jsou vázány pomocí dvou vodíkových vazeb a cytosin s guaninem pomocí tří vodíkových vazeb. Vazba mezi cytosinem a guaninem je tedy stabilnější. Tento způsob párování se označuje jako **Watson-Crickovský (WC)** nebo též kanonický a převažuje hlavně ve struktuře DNA. Dále existuje i nekanonické tzv. **non-Watson-Crickovské (non-WC) párování**, pomocí jiných než Watson-Crickovských hran bází. Toto párování bylo popsáno díky důkladnému zkoumání krystalografických struktur RNA pomocí experimentů se středním i vysokým rozlišením. Zjištěné interakce byly následně rozděleny na základě hran nukleových bází. Každá z těchto hran (Obrázek 2) obsahuje atomy, které mohou být donory nebo akceptory vodíkových vazeb. Non-Watson-Crickovské párování zahrnuje, na rozdíl od Watson-Crickovského párování bází, i párování mezi bázemi purin-purin či pyrimidin-pyrimidin. [10]

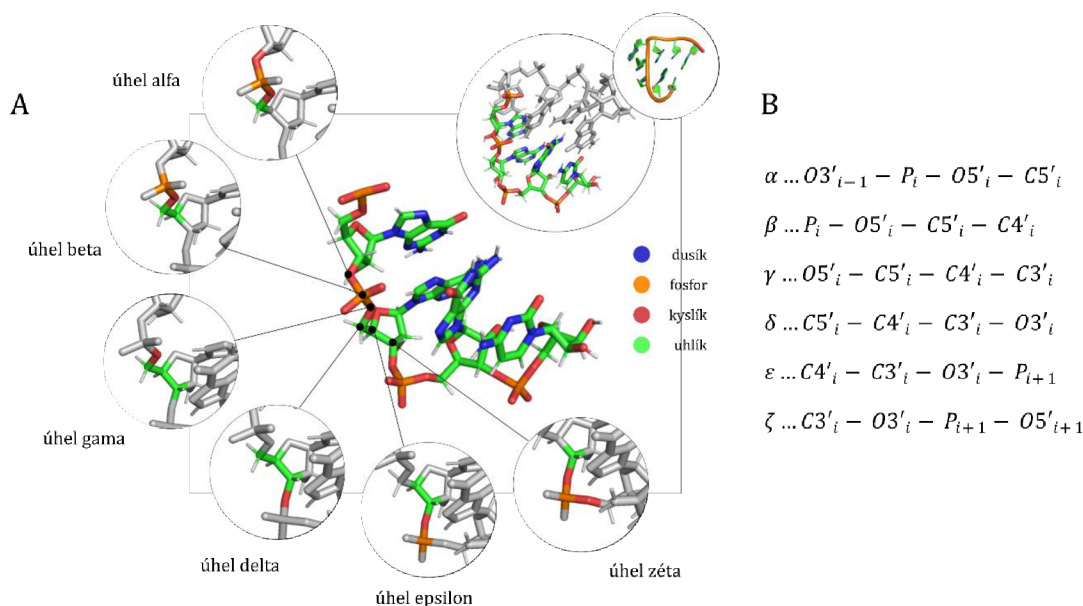


Obrázek 2 Ukázka nukleotidů s purinovou a pyrimidinovou bází, na kterých jsou zobrazeny Watson-Crickovské a Hoogsteenovi hrany, které rozdělují párování bází na kanonické a nekanonické. Nukleové báze jsou číslovány. Inspirováno z [10].

RNA jsou ve většině případů jednovláknové struktury. Může však docházet ke skládání tohoto jediného polynukleotidového vlákna do dvoušroubovic, vlásenek či jiných motivů. Tyto motivy jsou podrobněji popsány v kapitole 2.2 Struktura RNA.

2.1.1 PÁTEŘ RNA

Páteř RNA se skládá ze dvou komponent – ribózy a fosfátu. Určuje mechanické vlastnosti polynukleotidů a je základním stavebním kamenem nukleových kyselin. Je popisována **torzními úhly**. Torzní úhly jsou definovány čtyřmi navzájem spojenými atomy. Toto spojení je postupné, tedy atom A je spojen s atomem B, který je spojen s atomem C a ten je spojen s atomem D. Tyto čtyři body tak tvoří dvě roviny: ABC a BCD. Torzní úhel je definován jako úhel mezi těmito dvěma vytyčenými rovinami. Páteř RNA je charakterizována pomocí torzních úhlů alfa (α), beta (β), gama (γ), delta (δ), epsilon (ϵ) a zéta (ζ) (Obrázek 3). Navíc se definuje úhel chí (χ), který souvisí s glykosidickou vazbou, tedy vazbou mezi cukrem a bází.

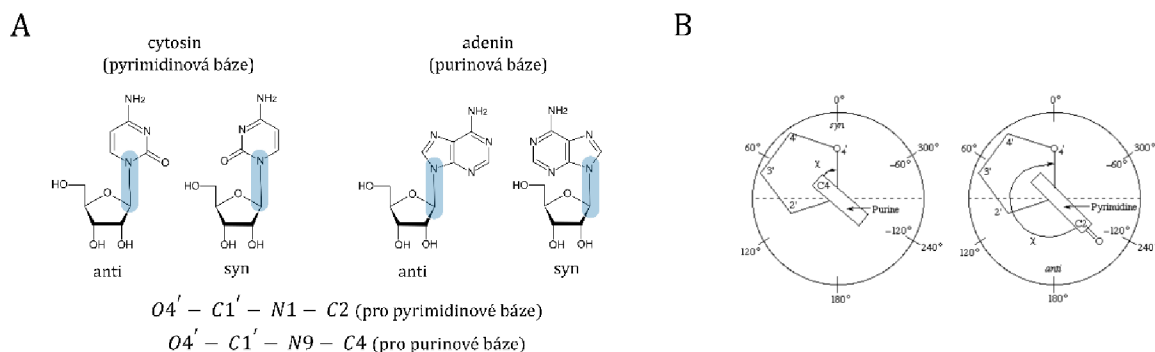


Obrázek 3 **Panel A** znázorňuje strukturu GAGA tetraloopu, na které jsou barevně vyznačeny jednotlivé torzní úhly charakterizující páteř RNA. **Panel B** představuje výpis atomů, ze kterých je daný torzní úhel složen. Torzní úhly jsou vzájemně provázány tak, že druhý atom jednoho torzního úhlu je prvním atomem následujícího torzního úhlu. Dolní indexy „i“ značí jednotlivá rezidua (nukleotidy). Tedy úhel α potřebuje atom z předcházejícího rezidua. Pro lepší názornost je možné torzní úhly vysvětlit na struktuře obsahující osm reziduí. V tomto případě není možné změřit úhel α pro první reziduum. Také není možné definovat úhel ϵ a ζ pro osmé reziduum, protože bychom potřebovali atomy z devátého rezidua.

2.1.2 GLYKOSIDICKÝ TORZNÍ ÚHEL

Glykosidický torzní úhel je úhel, který svírá vazba mezi molekulou sacharidu (v našem případě ribózy) a nukleové báze. Tato vazba vzniká mezi uhlíkem C1' na ribóze a dusíkem nukleové báze. V případě purinových bází se jedná o dusík N9, v případě pyrimidinových bází o dusík N1 (Obrázek 4). Přesný název této vazby je β -N-glykosidická vazba, a právě rotaci kolem této vazby popisuje torzní úhel chí (χ).

Tento torzní úhel je tedy definován čtyřmi atomy (vždy mezi dvěma atomy ribózy a dvěma atomy báze).



Obrázek 4 **Panel A** ukazuje konformace úhlu pro oba typy nukleových bází (purinového a pyrimidinového typu) s barevně vyznačenou β -N-glykosidickou vazbou. **Panel B** hodnoty úhlu χ , kterých může tento úhel nabývat rozděleny podle typu nukleové báze. Převzato z [11]

Pro tento úhel mohou nastat dvě orientace. První nastává, když je báze otočená směrem od cukru, tedy tzv. *anti* konformace, druhým případem je, když je báze otočená blíže k cukru, tedy tzv. *syn* konformace. Nejčastější konformací nukleotidu pro RNA je *anti* konformace. Méně častá je pak konformace *syn*. *Syn* konformace poskytuje kompaktnější formu nukleotidu, bohužel má však vyšší energii, což je důvodem, proč je tato forma vzácnější.[12]

2.1.3 KONFORMACE CUKRU

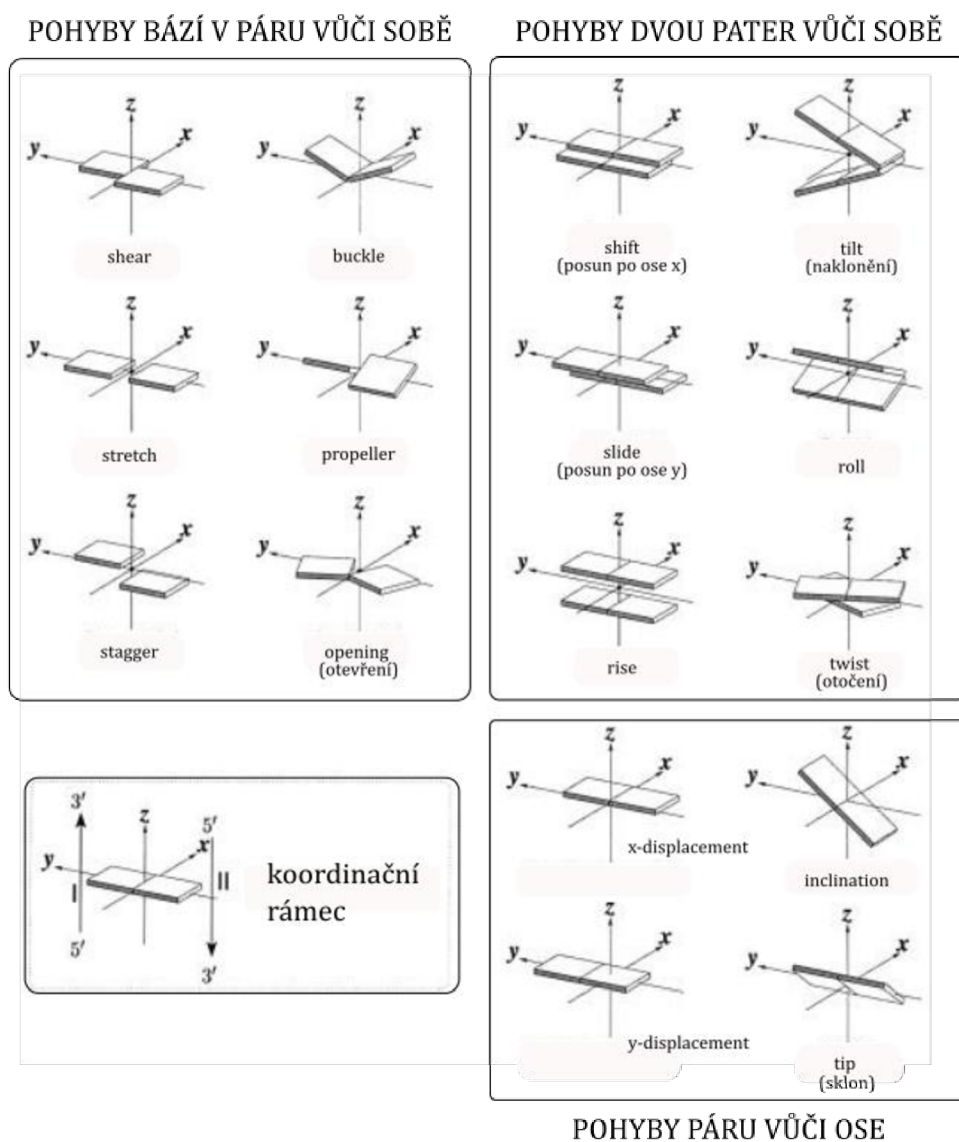
Hydroxylová skupina na C2' uhlíku ribózy je zásadní pro tvorbu intra a intermolekulárních interakcí. Může být jak donorem, tak i akceptorem elektronů při tvorbě vodíkového můstku. To však není jediné, čím je přítomnost či absence této skupiny důležitá. Přítomnost hydroxylové skupiny zvyšuje reaktivitu RNA a tím i její nestabilitu v porovnání s DNA. Navíc, zde také dochází k ovlivnění konformace celého pětičlenného kruhu sacharidu ribózy. Tento pětičlenný kruh není rovinným útvarem, a to ani u DNA, a dochází u něj k vychylování cyklu mimo rovinu (*sugar puckering*). Toto vychýlení snižuje celkové napětí kruhu a následně vede ke vzniku stabilnější konformace.

Konformace cukru je tedy velice důležitou proměnnou nabývající jiných hodnot pro DNA a RNA. To je zapříčiněno právě zmíněnou OH skupinou na druhém uhlíku ribózy. Celková konformace cukru je dána pěti endocyklickými torzními úhly, které se kombinují do tzv. pseudorotačního úhlu (značeno P). Tento úhel umožňuje popis všech konformačních úhlů pomocí jedné hodnoty. Ve struktuře RNA duplexu (dvoušroubovice) převládají C2'endo (P mezi 144° až 180°, nazývána jako

S konformace) a C3' endo (P mezi 0° až 36°, nazývána jako N konformace). Zásadní vliv má právě již zmíněná hydroxylová skupina na atomu C2'. Pokud se zde tato skupina vyskytuje (tedy v případě RNA), dochází k interakci mezi 2' hydroxylem a O3', které vedou k N konformaci. V případě DNA je upřednostňována S konformace. Konformace cukru je však dynamická veličina a v průběhu simulace může docházet k přechodu mezi N a S konformacemi.[13]

2.1.4 HELIKÁLNÍ PARAMETRY PÁRŮ BÁZÍ

Tyto parametry pojednávají o vzájemném trojrozměrném uspořádání párů bází. Cukr-fosfátová páteř nukleových kyselin, která má iontový charakter, zapříčiňuje, že nukleové kyseliny jsou velice citlivé na změnu prostředí, může tedy docházet ke změnám jejich konformačních stavů. Ideální pár bází je takový, který je planární. Při definování konformací je třeba určit základní systém, tzv. **koordináční rámec** (angl. *coordinate frame*), pomocí něhož se všechny koordináty popisují. Ten zjednodušuje strukturu báze do tvaru destičky. Nejdříve je nutné si všechny parametry rozdělit do základních skupin, tedy **pohyby bází v páru vůči sobě**, **pohyby páru vůči ose** a **pohyby dvou pater vůči sobě**. Bohužel se pro pojmenování těchto parametrů využívají primárně jejich anglické názvy. České překlady jsou uvedeny jen pro úplnost a jen v případech, že byl překlad proveditelný (Obrázek 5). Do první skupiny, tedy do pohybů bází v páru vůči sobě, zařazujeme šest parametrů. Pohyby bází se porovnávají vůči osám (x, y a z), jedná se o tři zástupce rotačních pohybů (*buckle*, *propeller* a *opening*) a tři zástupce translačních pohybů (*shear*, *stretch* a *stagger*). Do druhé skupiny, tedy pohybu celého páru po osách, patří čtyři parametry (*x-displacement*, *y-displacement*, *inclination* a *tip*). Poslední skupinu pohybu dvou pater vůči sobě tvoří opět tři rotační pohyby (*tilt*, *roll* a *twist*) a tři translační pohyby (*shift*, *slide* a *rise*). [14], [15]



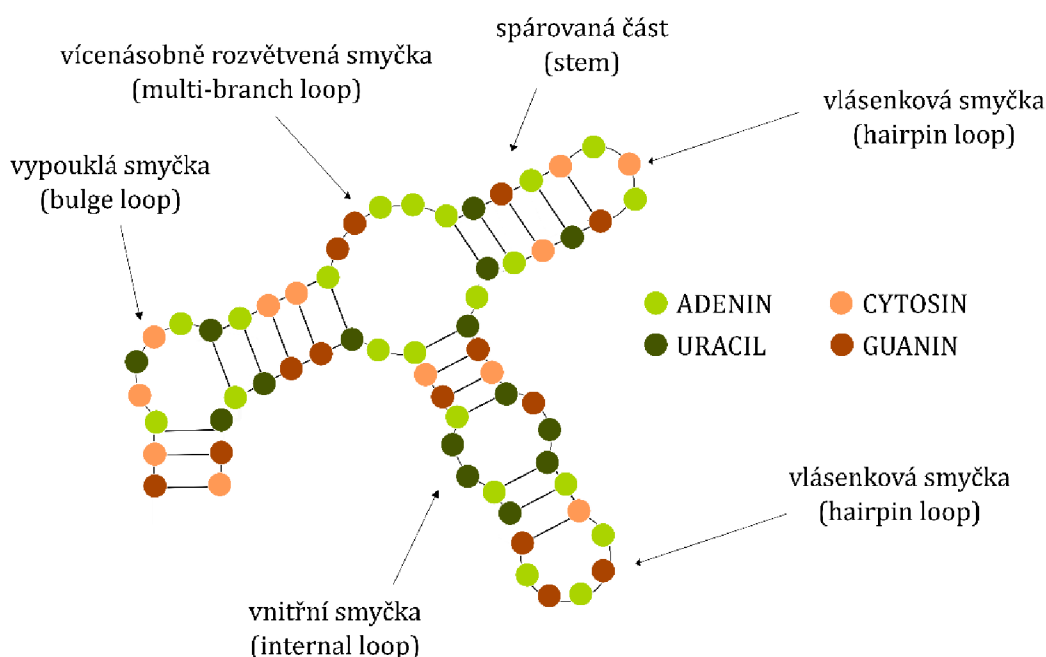
Obrázek 5 Znárodnění parametrů párů bází (převzato a upraveno z [15])

2.2 STRUKTURA RNA

U RNA definujeme čtyři úrovně struktury – primární, sekundární, terciární a kvartérní. Primární struktura je dána pořadím nukleotidů v polynukleotidovém řetězci. Sekundární struktura určuje prostorové vztahy mezi sousedními nebo blízkými nukleovými bázemi. Terciární struktura popisuje strukturu atomů a molekul ve 3D prostoru a kvartérní struktura popisuje její interakce s jinou RNA či dalšími strukturami.

Sekundární struktura funguje jako kontrolní systém před vytvořením trojrozměrné struktury. Jedná se o klíčovou úroveň organizace pro pochopení funkčních mechanismů. Experimentálně bývá pro jednotlivé systémy potvrzována a

prozkoumávána pomocí rentgenové difrakce, nukleární magnetické rezonance či kryo-elektronové mikroskopie.[16] Pro předpověď sekundární struktury bylo stanoveno mnoho technik ať už založených na experimentu či teorii. My si zde na ukázkou můžeme představit tři teoretické techniky založené na matematice a výpočetní technice. První ze zmíněných metod, jak zkoumat sekundární strukturu, je grafický postup. Dalším způsobem může být vypočítání minimální volné energie, tedy za pomoci termodynamických zákonů. Třetí z uvedených možností využívá fylogenezi.[17]



Obrázek 6 Ukáзка základních sekundárních struktur RNA, kdy komplementární pár vzniká mezi purinovou a pyrimidinovou bází. Jeden z komplementárních párů je tvořen červenými a druhý zelenými kuličkami symbolizující zde dusíkaté báze.

Pokud bychom vzali jedno dlouhé vlákno RNA, které podléhá skládání pro dosažení vyšší stability, mohlo by na něm vzniknout mnoho zajímavých struktur. Pro většinu z těchto struktur jsou už v dnešní době zcela běžné spíše anglické výrazy, proto v této práci budou uváděny jak české výrazy, tak jejich anglické ekvivalenty. Mezi ty nejběžněji se vyskytující struktury patří například vláseňkové smyčky (angl. *hairpin loops*), ty se dále pojmenovávají podle počtu volných bází, vnitřní smyčky (angl. *internal loops*), vypouklé smyčky (angl. *bulge loops*) a mnohé další. Tyto struktury jsou přehledně zobrazeny na výše přiloženém obrázku (Obrázek 6). Podle tohoto obrázku je možné dopředu odhadnout, jak dané struktury popsat a umět je najít i v jiných strukturách. Vlášekové smyčky poznáme podle toho, že jsou uzavřeny jedním párem bází, a tudíž nejmenší možná vláseňková smyčka obsahuje tři

nukleotidy. Spárované části (neboli *stem*) jsou útvary, které jsou dány dvěma a více po sobě jdoucími páry bází, které mezi sebou interagují patrovými interakcemi. Vnitřní smyčka je útvar, kdy jsou dva páry bází od sebe odděleny jednou či více nepárovými bázemi na obou stranách, zatímco u vypouklé smyčky je tomu tak pouze na jedné straně. [18]

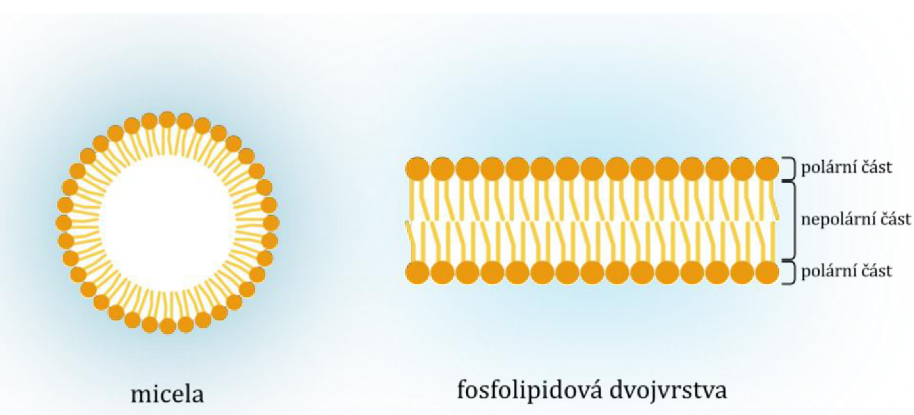
Pro tuto práci je důležitý pojem GNRA tetraloop. Tato smyčka (*loop*) uzavírá A-formu dvoušroubovice. Už z názvu tetraloop vyplývá, že se zde vyskytují čtyři dusíkaté báze (spárované pomocí non-WC párování) ve smyčce a jejich přesnější identifikace je GAGA. Tato identifikace se provádí podle druhu bází tvořících smyčku (guanin → adenin → guanin → adenin). Sekvence nukleotidů se v tetraloopu často opakují, proto dochází k zobecňování těchto sekvencí. Mezi ty nejznámější sekvence můžeme považovat GNRA a UNCG, kde písmeno R značí, že se zde vyskytuje adenin nebo guanin (tedy purinové báze), písmeno N zase značí libovolnou bázi. [19]

Terciární struktura RNA je charakterizována jako trojrozměrné uspořádání RNA. Terciární strukturu lze experimentálně určit za pomoci NMR technik, rentgenové krystalografie a chemické genetiky. Skládání RNA do terciární struktury je komplikováno mnoha aspekty jako je například to, že polymer je záporně nabitý, takže při skládání vznikají velké elektrostatické potenciály, které musí být neutralizovány interakcemi s opačně nabitými ionty. Další velkou nevýhodou může být i velká stabilita sekundární struktury, která může právě svou stabilitou bránit sestavování terciární struktury. Na druhou stranu existuje mnoho faktorů, které ulehčují skládání terciární struktury. Mezi takové patří například hořčnatý ion, který slouží k překonávání elektrostatických bariér. [20]

2.3 LIPIDY

Lipidy jsou značně rozmanitou a nestejnorodou skupinou přirozeně se vyskytujících látek jak rostlinného, tak živočišného původu. Pro ukázkou rozmanitosti skupiny můžeme zmínit jen některé lipidové druhy (třídy), které pojem lipidy zahrnuje. Patří sem mastné kyseliny, triacylglyceroly, alkoholy s dlouhým řetězcem, vosky, sfingoidy, glykolipidy, fosfolipidy, sfingolipidy, isoprenoidy a spousta dalších. Lipidy mají řadu důležitých funkcí, mezi které patří i to, že jsou součástí biologických membrán, fungují jako zásobárny energie, vytvářejí izolační bariéru či ochranný obal organismů. Velice důležitou charakteristikou pro lipidy vyskytující se v biologických

membránách je tzv. **amfipatická struktura**. Znamená to, že obsahují jak hydrofobní (nerozpustnou ve vodě), tak hydrofilní (rozpustnou ve vodě) část struktury. Hydrofobní částí bývá většinou dlouhý uhlovodíkový řetězec, převážně ester mastné kyseliny. Hydrofilní část tvoří tzv. hlavovou část lipidů, která je polární a obsahuje často nabitě skupiny. Je to právě amfipatická struktura, která je klíčová pro vznik lipidové membrány. Při vytváření membrány se tyto dvě části formují tak, aby hydrofilní části směřovaly ven do vodného prostředí, zatímco hydrofobní směřovaly k sobě (Obrázek 7).

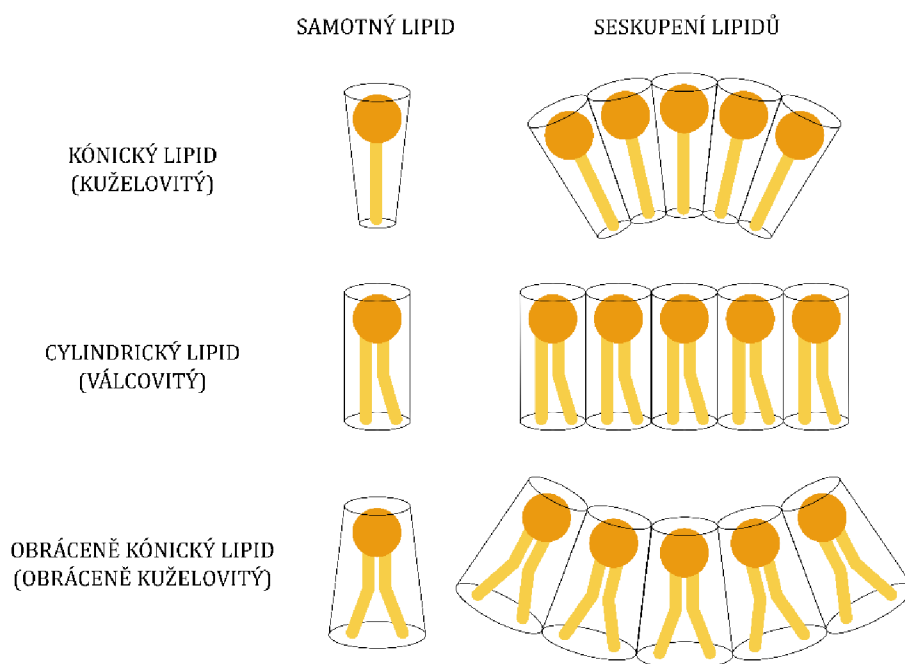


Obrázek 7 Ukázka uspořádání amfifilních lipidů – polární část (oranžová), nepolární část (žlutá), polární prostředí (modré). Amfifilní lipidy se mohou uspořádat buď do lipidové dvojvrstvy (na obrázku přímo zmíněná fosfolipidová dvojvrstva tvořená fosfolipidy, které mají amfifilní charakter) či do micely.

Lipidová dvojvrstva je základem buněčné membránové struktury. Můžeme ji pozorovat pomocí elektronové mikroskopie, k detailnějšímu zkoumání je ovšem zapotřebí technik jako rentgenová difrakce či kryo-elektronová mikroskopie. Vznik dvojvrstvy je umožněn tvarem lipidových molekul a jejich amfifilními vlastnostmi. Nejhojněji se vyskytujícími lipidy v buněčných membránách jsou fosfolipidy, dále se však mohou vyskytovat i sfingolipidy a mnohé další. [21] Buněčné membrány obecně hrají pro život klíčovou roli. Skládají se z různých bílkovin, proteinových komplexů či sacharidů, které jsou zabudovány v membráně dvojvrstevné struktury složené z více než stovek typů lipidů. Různé membrány se svým složením liší, například nádorové buňky mají lipidické složení odlišné od jejich zdravých protějšků. Lipidové složení ovlivňuje fluiditu a viskoelastické vlastnosti membrány, což způsobuje změny funkce proteinů, buněčného dělení a buněčnou migraci. [22]

Pro vznik lipidových struktur je stěžejní tvar samotné lipidové molekuly, který predikuje, k jakému uspořádání lipidů bude docházet, respektive jaký bude

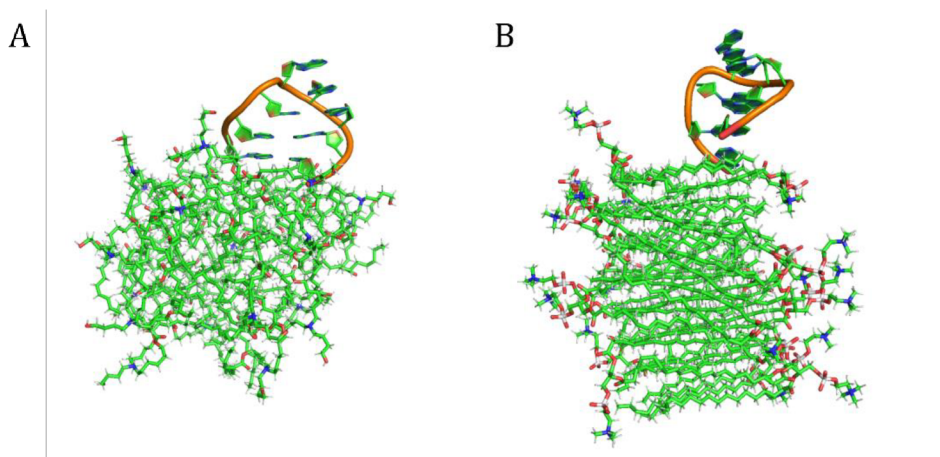
výsledný tvar těchto lipidových struktur.[23] Fosfolipidy fosfatidylcholin (PC) mají spíše cylindrický tvar, který umožňuje vznik velice symetrických a pravidelných fosfolipidových dvojvrstev, zatímco fosfolipidy fosfatidylethanolamin (PE) má obráceně kónický tvar, zapříčiněný jejich negativním zakřivením. Obráceně kónické tvary umožňují vznik kubických nebo hexagonálních struktur druhého typu, kde jsou nabitě polární hlavy směřovány směrem dovnitř a hydrofobní konce směrem ven. Takový tvar mají i ionizovatelné lipidy zásluhou jejich rozvětvených řetězců (v případě ALC-0315 jsou zde čtyři uhlovodíkové řetězce, v případě SM-102 tři uhlovodíkové řetězce). Pokud má lipid kónický tvar, tedy velkou hlavu a malý objem ocasů, vytváří hexagonální strukturu prvního typu, kdy jsou hydrofobní řetězce orientovány směrem dovnitř a nabitě hlavy směrem ven. Velikost hlavy lipidu je ovlivňována jejím nábojem, tedy kladně nabitě hlavové části molekuly lipidů vedou spíše ke kónickému tvaru, zatímco záporně nabitě hlavy spějí k obráceně kónickému tvaru lipidu. Tvar molekuly je též predikován nasyceností alifatických řetězců. [24]



Obrázek 8 Výčet tvarů lipidových molekul, pojmenovaných podle geometrických útvarů, do kterých se dají vepsat.

Pro **lipidové fáze** platí, že lipidy tvořící dvojvrstvy se snaží o jistou prostorovou uspořádanost. Tyto lipid-lipid interakce mohou být rozděleny do tří základních skupin (stavů). Toto rozdělení bylo umožněno pomocí parametrů uspořádanosti acylových řetězců a translačního difúzního koeficientu. Prvním stavem je dvoudimenzionální **neuspořádaná kapalina** (angl. *liquid-crystalline* či

liquid-disordered). Tento stav se vyznačuje svou neuspořádaností. Druhým možným stavem je **pevný gel** (angl. *solid gel*), který svou vnitřní uspořádaností může připomínat krystalovou mřížku v pevných látkách. Třetí stav, **uspořádaná kapalina** (angl. *liquid-ordered*), je jakousi kombinací předcházejících. [25] Struktura lipidové dvojvrstvy je studována již celá léta a nejběžněji se v přírodě vyskytujícím stavem je neuspořádaná kapalina (*liquid-disordered*), která je charakterizována vysokou pohyblivostí lipidů v rovině membrány. Pokud se sníží teplota, dostaneme se na fázové rozhraní a do stavu tzv. gelu. V tomto stavu jsou molekuly uspořádanější a méně pohyblivé. [26] V této práci se vyskytují lipidy, které nabývají jak uspořádané (*solid gel*), tak neuspořádané (*liquid-disordered*) struktury (Obrázek 9).



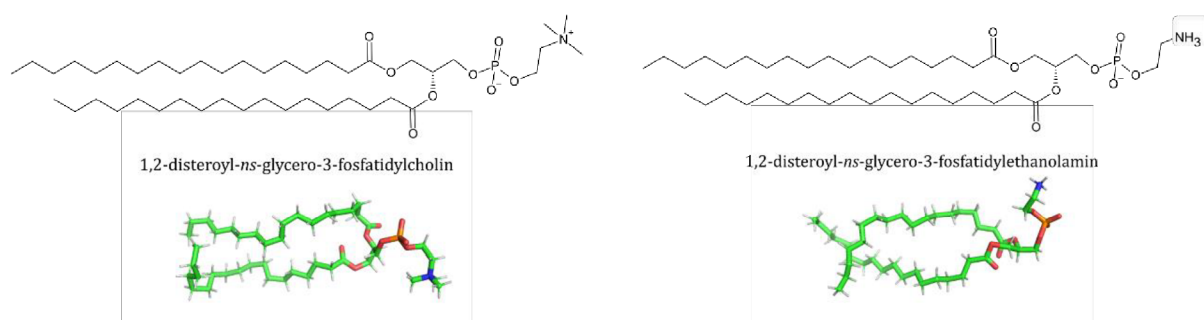
Obrázek 9 Ukázka organizovanosti lipidů u dvou systémů studovaných v rámci této práce. A) systém obsahuje 20 ionizovatelných lipidů AL-0315, B) systém se skládá z 20 fosfolipidů DSPC. Již na první pohled jde vidět rozdíl ve struktuře seskupených lipidů. Nasycené fosfolipidy s dlouhými řetězci jsou známé svou organizovaností, fosfolipidy také tvoří nejčastěji lipidové dvojvrstvy díky svému válcovitému tvaru.

2.3.1 FOSFOLIPIDY

Fosfolipidy jsou skupinou lipidů, skládající se z glycerolu, fosfátové skupiny a dvou mastných kyselin. Tato fosfátová skupinu představuje hydrofobní část struktury a je tvořena dvěma uhlovodíkovými řetězci, které jsou esterovou vazbou navázány na glycerol do pozice sn-1 a sn-2. Fosfát je navázán do pozice sn-3 a má při fyziologickém pH záporný náboj. Často dochází k navázání dalšího alkoholu na fosfát a vzniku dalších typů fosfolipidů. Takovými skupinami jsou např. cholin, ethanolamin, glycerol či serin. **Fosfatidylcholin (PC)** je jedním z nejběžnějších fosfolipidů obsažených v buněčných membránách. Obsahuje kvartérní amin, který nese kladný náboj. Jelikož při fyziologickém pH má kladně nabitou (kvartérní amin) i záporně nabitou (fosfát) skupinu, hlavová část tohoto lipidu je zwitteriontová.

Jako celek hlavová část tohoto lipidu nenesou žádný náboj, pouze je vysoce polární. **Fosfatidylethanolamin (PE)** je též velice známým zástupcem fosfolipidů, vyskytujících se v buněčných membránách. Obsahuje volnou aminoskupinu, která bývá deprotonizovaná při vysokém pH (v oblasti pH 9 až 10). Jelikož za fyziologického pH je zde též kladná (volná aminoskupina) a záporná (fosfát) část, opět tento lipid jako celek nenesou žádný náboj, ale je též polární. [27]

V této práci bylo pracováno se strukturami DSPC a DSPE (Obrázek 10). **DSPC** je zkratka pro 1,2-disteroyl-*sn*-glycero-3-fosfatidylcholin, který patří mezi zástupce fosfatidylcholinů. Tento lipid se přirozeně vyskytuje v buněčné membráně a bývá používán právě při přípravách lipidových nanočástic. Je velice stabilní a netoxický. **DSPE** je zkratkou pro 1,2-disteroyl-*sn*-glycero-3-fosfatidylethanolamin. Spolu s DSPC se používá v simulacích, při kterých je vytvářena fosfolipidové dvojvrstvy. [28]



Obrázek 10 Chemická struktura a 3D vizualizace fosfolipidů DSPC a DSPE používaných v této práci.

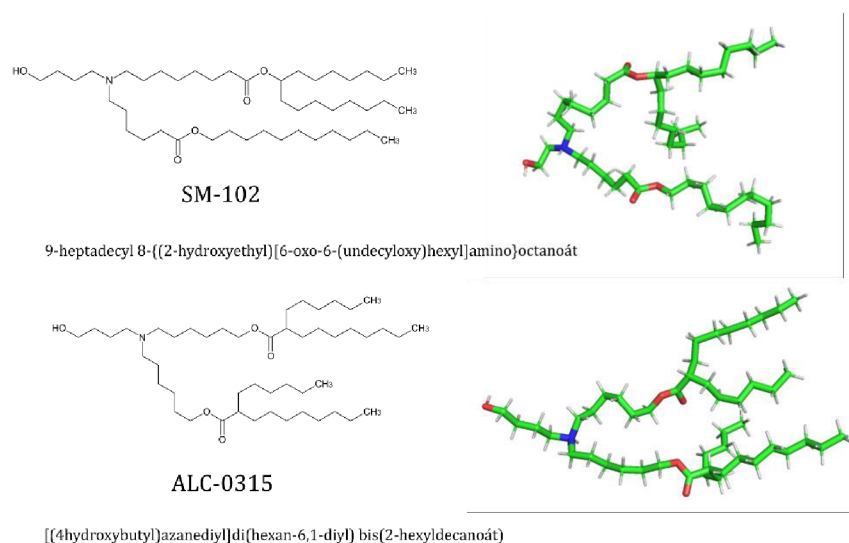
2.3.2 IONIZOVATELNÉ LIPIDY

Kationtové (*cationic lipids*) a **ionizovatelné lipidy** (*ionizable lipids*) patří mezi amfifilní lipidy, které mají uplatnění v široké škále farmaceutických aplikací. Jejich největší výhodou je jejich přirozená tvorba lipofilních komplexů s aniontovými terapeutickými látkami, jako jsou nukleové kyseliny, malé aniontové molekuly, peptidy, proteiny a další. Tvorba těchto komplexů pak výrazně zlepšuje propustnost terapeutických látek buněčnými membránami. [29] Kationtové lipidy měly ovšem jednu významnou nevýhodu, byly stabilně kladně nabitě. To se ukázalo jako velký problém hlavně při přepravě krevním řečištěm, kde působily toxicky. Tento hlavní nedostatek se vyřešil s příchodem nových ionizovatelných lipidů, které se skládají ze tří hlavních částí – hydrofilní skupiny tvořící hlavovou část molekuly, spojovací části a hydrofobních konců. Hydrofobní částí je typicky terciární amin, který se

ukázal jako velice vhodný pro genové doručování (angl. *gene delivery*) a předpokládá se jeho interakce s nabitými nukleovými kyselinami. [30]

Ionizovatelné lipidy byly použity v boji proti onemocnění COVID-19 a to hlavně díky jejich citlivosti na hodnotu pH. V neutrálním pH, tedy pH krevního řečiště, jsou tyto lipidy téměř neutrální, zatímco v kyselém pH dochází k protonizaci terciárního dusíku a lipidy nesou kladný náboj. [31]

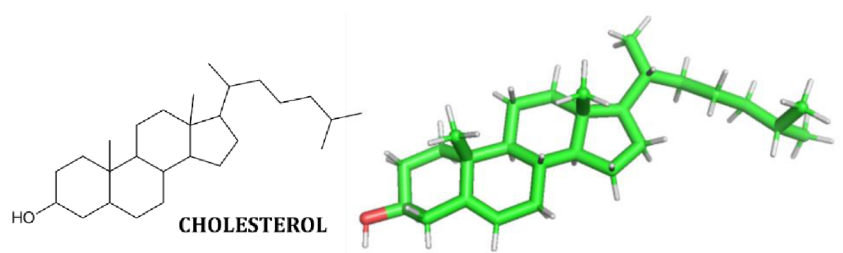
V rámci této práce byly použity dva ionizovatelné lipidy: *[(4-hydroxybutyl)azanediyl]di(hexan-6,1-diyl)bis(2-hexyldecanoát)*, zjednodušeně **ALC-0315**, druhým zvoleným ionizovatelným lipidem byl *9-heptadecyl 8-[(2-hydroxyethyl)[6-oxo-6-(undecyloxy)hexyl]amino]octanoát*, tedy zkráceně **SM-102**. Tyto ionizovatelné lipidy byly úspěšně použity ve vakcínách proti onemocnění COVID-19. [32] Konkrétně ionizovatelný lipid ALC-0315 využila farmaceutická firma Pfizer/BioNTech a ionizovatelný lipid SM-102 naopak farmaceutická firma Moderna. [33] Jejich strukturní vzorce a 3D struktura jsou zobrazeny na obrázku níže (Obrázek 11). Ionizovatelný lipid SM-102 má celkem tři acylové řetězce, ALC-0315 má dokonce čtyři acylové řetězce, což způsobuje kónický tvar jejich molekuly. Z jejich tvaru lze odvodit, že nebude docházet k vytváření symetrických lamelárních struktur. Pokud by byly součástí lipidové směsi, svým výskytem budou spíše destabilizovat systém a vyvolávat tvorbu nelamelárních fází. [31]



Obrázek 11 Chemická struktura a 3D vizualizace ionizovatelných lipidů SM-102 a ALC-0315.

2.3.3 CHOLESTEROL

Cholesterol je asi nejznámějším zástupcem skupiny sterolů. Jeho struktura zahrnuje hydrofobní jádra, polární hydroxylovou skupinu a krátký uhlovodíkový řetězec (Obrázek 12). I když se liší strukturou od výše zmíněných lipidů, stále se jedná o amfipatickou molekulu, jejíž hydrofilní částí je právě hydroxylová skupina. [27] Jelikož se cholesterol běžně vyskytuje v eukaryotických buňkách i tkáních, byly podrobněji zkoumány jeho ovlivnění vlastností lipidové dvojvrstvy. Při vysokých koncentracích zvyšuje mechanickou odolnost membrány a snižuje její permeabilitu. Tyto vlastnosti jsou zapříčiněny rigidnějším uspořádáním lipidů. Díky jeho odlišné struktuře v porovnání s ostatními zmíněnými lipidy, dochází k omezení jeho pohyblivosti v rámci dvojvrstvy. Jelikož je lipidová dvojvrstva anizotropním prostředím, existuje v ní preferovaná a předem určená poloha cholesterolu a sterolových látek. [34]



Obrázek 12 Chemická struktura a 3D vizualizace cholesterolu.

2.3.4 LIPIDOVÉ NANOČÁSTICE

Lipidové nanočástice (*lipid nanoparticles – LNPs*) jsou v době psaní této práce v centru pozornosti mnoha výzkumných skupin. Jedná se o nosiče biomolekul, které mají jednu velkou výhodu a to, že dokáží překonávat přirozené bariéry, ochránit a doručit daný materiál do jejich biologického cíle. Tyto nosiče již byly globálně využity při vakcinaci proti SARS-CoV-2. Jejich hlavním úkolem bylo dopravit krátkou sekvenci RNA (mRNA) do buňky, kde došlo k přečtení této informace a následné tvorbě tzv. spike proteinu, což je část viru, která se vyskytuje na povrchu viru. Tento spike-protein si po vakcinaci syntetizuje jen omezené množství buněk, do kterých se dostala mRNA z vakcíny. Po vytvoření tohoto spike proteinu jsou zapojeny obranné mechanismy organismu a dochází k tvorbě protilátek. Takto vzniklé protilátky pak budou moci být použity při boji se skutečným virem. Lipidové nanočástice představují vícesložkový systém skládající se z několika typů lipidů, mezi které patří ionizovatelné kationtové lipidy, fosfolipidy, cholesteroly a

PEG-lipidy. PEG-lipidy jsou lipidy skládající se z polyethylen glykolu a na něj navázaném lipidu. [31] Každý z těchto lipidů má svou vlastní funkci a přispívá ke zlepšení stability nanočástice a účinnosti doručení RNA do cílových buněk. Dále mají vliv na snášenlivost a biodistribuci. Konkrétním příkladem mohou být molekuly DSPC, jejichž cylindrický tvar molekuly vytváří laminární struktury a slouží ke stabilizaci lipidových nanočástic. Též cholesterol zde slouží k získání vyšší stability zásluhou úpravy integrity a tuhosti vznikající lipidové fáze. Svým charakteristickým tvarem dále též ovlivňuje účinnost a biodistribuci lipidových nanočástic. PEG-lipidy (polyethylen glykol lipidy) mají též vliv na chování LNP. Samotné množství těchto lipidů ovlivňuje velikost lipidové nanočástice a zeta potenciál. Tyto lipidy přispívají ke stabilitě částic a snižují jejich agregaci. Některé modifikace těchto PEG-lipidů dokonce prodlužují dobu výskytu lipidových nanočástic v krevním oběhu. Tedy snižují odstraňování těchto látek zprostředkovaných ledvinami a mononukleárním fagocytárním systémem (MPS). V neposlední řadě PEG-lipidy mohou být použity pro konjugaci specifických ligandů s částicemi pro cílený přenos. Všechny jejich vlastnosti se však odvíjí od jejich procentuálního zastoupení v nanočástici a také od délky řetězce lipidů, které jsou na PEG navázané. [32] Můžeme tedy prohlásit, že všechny lipidy mají opodstatněný důvod svého výskytu v LNP. Doposud nezmíněnými lipidy jsou ionizovatelné lipidy, které určují účinnost transfekce mRNA, vedoucí k syntéze cíleného proteinu v eukaryotické buňce. Tyto lipidy mají takovou disociační konstantu, aby v kyselém prostředí docházelo k jejich protonizaci, kdy kladně nabitě lipidy mohou kondenzovat se záporně nabitou mRNA prostřednictvím elektrostatických interakcí. Při fyziologickém pH jsou ionizovatelné lipidy neutrální.[35] Ačkoliv máme v současné době základní informace o lipidech a jejich funkcích, doposud není celý mechanismus vzniku nanočástice, a především vypuštění RNA do cílové buňky zcela objasněn. V současné době se tyto systémy zkoumají pomocí *in silico* metod, a to primárně v hrubozrnném rozlišení. [31]

2.4 MOLEKULOVÉ SIMULACE

Molekulové simulace jsou numerické metody kombinované s počítačovým výkonem k řešení fyzikálně chemických problémů. Pomocí těchto metod se snažíme o získání nových informací na základě vystavění modelu z informací a zákonů, které již známe. Tento postup nám umožňuje nejen ověřit experimentálně získaná data, ale můžeme

díky tomu objevit i nové vlastnosti systémů, které jsme před tím neznaly. Pomocí teoretické chemie jsme schopni predikovat chování systémů v řádech femtosekund (fs) až mikrosekund (μs).

2.4.1 MOLEKULÁRNĚ DYNAMICKÉ SIMULACE

Molekulárně dynamické simulace (*molecular dynamics, MD*) předpovídají, jak se dané atomy v biomolekulách či jiných molekulárních systémech budou pohybovat, a to na základě obecného fyzikálního modelu, kterým se řídí meziatomové interakce. Takovéto simulace mohou zaznamenávat například konformační změny, změny vazby ligandů a proteinů, přičemž tyto polohy atomů se počítají ve femtosekundových intervalech. Tyto MD simulace bývají často používány v kombinaci s experimentálně určenými strukturními modely pomocí rentgenové krystalografie, kryo-elektronové mikroskopie či nukleární magnetické rezonance. [36]

2.4.2 MOLEKULOVÁ MECHANIKA

Na rozdíl od kvantové mechaniky (angl. *quantum mechanics, QM*), do výpočtu struktury a energie molekuly v molekulové mechanice nejsou zahrnuty elektrony, ale pouze jádra atomů. Je to z důvodu, že hmotnost elektronů je v porovnání s atomovými jádry zanedbatelná, jedná se o výpočetně náročnou metodu vhodnou primárně pro malé systémy. Molekula je považována za soubor jader spojených vazbami, přičemž jsou jádra a elektrony sjednoceny do částice podobné atomu. Tyto částice jsou považovány za koule různých velikostí (podle typu atomu). Vazby mezi jednotlivými atomy jsou považovány za pružiny. Veškeré interakce mezi částicemi popisuje potenciální funkce, přičemž každá interakce je popsána vlastní potenciálovou funkcí. Potenciálové funkce a jejich parametry se označují jako silová pole (angl. *force fields*). Právě díky nezapočítávání elektronů je molekulová mechanika výpočetně méně náročná než kvantová mechanika.

2.4.3 SILOVÁ POLE

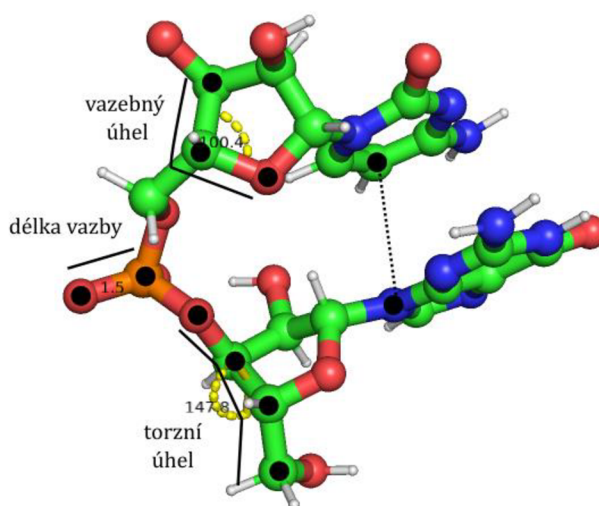
Jedná se o matematické vyjádření, které popisuje závislost energie systému na souřadnicích částic tohoto systému. Molekuly jsou jednoduše definovány jako soubory atomů, které jsou pohromadě drženy jednoduchými elastickými pružinami, a právě silové pole nahrazuje skutečný potenciál zjednodušeným modelem platným v simulované oblasti. V ideálním případě je potřeba, aby byl dostatečně jednoduchý

pro rychlé vyhodnocení, ale zároveň i dostatečně podrobný, aby pravdivě reprodukoval vlastnosti studovaného systému. [37]

Silová pole můžeme vyjádřit pomocí rovnice potenciální energie systému (Obrázek 13). Ta rozděluje členy této rovnice do dvou skupin – **členy vazebných interakcí** a **členy nevazebných interakcí**. Mezi vazebné interakce řadíme délku vazby, vazebné úhly a dihedrální úhly, zatímco mezi nevazebné interakce patří elektrostatické interakce a van der Waalsovy interakce. Rovnice celkové potenciální energie systému se poté vyjadřuje jako suma všech vazebných a nevazebných interakcí.

$$E_{\text{potenciální energie}} = \sum E_{\text{vazba}} + \sum E_{\text{vazebný úhel}} + \sum E_{\text{torzní úhel}} + \sum E_{vdW} + \sum E_{\text{elektrostatické interakce}}$$

Rovnice 1.1



Obrázek 13 Ukázka délky vazby, vazebného a dihedrálního (torzního) úhlu i s jejich hodnotami určenými pomocí programu PyMOL. Atomy, které byly do ukázek přímo zapojeny, byly znázorněny pomocí černé kuličky. Přerušovaná čára znázorňuje možné van der Waalsovy interakce.

Vazba mezi atomem i a j se popisuje pomocí harmonického oscilátoru, tedy že atomy kmitají kolem své rovnovážné délky vazby. Pro určení energie vazby je potřeba znát silovou konstantu vazby (k_{ij}^b), aktuální vzdálenost jader (r_{ij}) a ideální vzdálenost jader (r_{ij}^0).

$$E_{\text{vazba}}(r_{ij}) = \sum_{\text{vazba}} \frac{1}{2} k_{ij}^b (r_{ij} - r_{ij}^0)^2$$

Rovnice 1.2

Pro popis **vazebného úhlu** mezi atomy i, j a k , lze rovnici odvodit podobným způsobem. Tedy též potřebujeme znát silovou konstantu vazebného úhlu (k_{ijk}^θ), aktuální vazebný úhel jader (θ_{ijk}) a ideální vazebný úhel jader (θ_{ijk}^0).

$$E_{\text{vazebný úhel}}(\theta_{ijk}) = \sum_{\text{vazebný úhel}} \frac{1}{2} k_{ijk}^\theta (\theta_{ijk} - \theta_{ijk}^0)^2$$

Rovnice 1.3

Dalším členem potenciální energie je energie **torzního úhlu**, která se skládá z několika členů, kterými jsou k_{ijkl}^n , tedy výška potenciální bariéry v n -té periodě, n značící periodu, skutečný torzní úhel ω_{ijkl} a fázový posun ω_{ijkl}^0 .

$$E_{\text{torzní úhel}}(\omega_{ijkl}) = \sum_{\text{torzní úhel}} \frac{1}{2} k_{ijkl}^n [1 + \cos(n\omega_{ijkl} - \omega_{ijkl}^0)]$$

Rovnice 1.4

Mezi nevazebné členy patří příspěvek **van der Waalsových interakcí**. Van der Waalsovy interakce popisují vzájemné interakce dvou neutrálních atomů. Tyto interakce se nejčastěji popisují pomocí Lennard-Jonesova potenciálu, který je definován pomocí σ_{ij} , značící vzdálenost jader, kdy jsou přitažlivé síly mezi atomy rovny nule. Dalšími členy rovnice jsou r_{ij} představující vzdálenosti atomů a ε_{ij} značící hloubku potenciálového minima.

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

Rovnice 1.5

Posledním členem rovnice potenciální energie systému jsou **elektrostatické interakce**, které popisují vzájemné chování dvou nabitých částic. Při jejich výpočtu se řídíme Coulombovým zákonem. Mezi parametry popisující tento vztah řadíme permitivitu vakua ε_0 , relativní permitivitu prostředí ε_r , parciální náboje na atomech i a j q_i a q_j a vzdálenost mezi těmito atomy r_{ij} .

$$E_{\text{elektrostatické interakce}} = \sum_{i < j} \frac{1}{4\pi\varepsilon_0\varepsilon_r} \cdot \frac{q_i q_j}{r_{ij}}$$

Rovnice 1.6

3 PRAKTICKÁ ČÁST

Tato bakalářská práce se zabývala simulacemi RNA s několika typy lipidů. Konkrétně se jednalo o GAGA tetraloop, který byl simulován v simulačním boxu spolu s daným počtem lipidů. Cílem bylo zkoumat strukturní změny této RNA způsobené přítomností lipidů a také jejich uspořádání kolem RNA molekuly. Tyto simulace byly srovnány se simulací GAGA tetraloopu bez přítomnosti lipidů. Pro tvorbu simulací byl využit programový balíček rodiny AMBER verze 16[38] a verze 21[39]. Pro RNA bylo použito silové pole OL3 (ff99bsc0chiOL3CP) [40][41][42][43] a pro lipidy se v případě fosfolipidů a cholesterolu použil AMBER17 [44], pro ionizovatelné lipidy pak bylo použito speciální silové pole [31]. Pro vizuální hodnocení a vytvoření obrázků byly použity programy VMD [45] a PyMOL [46].

3.1 NASTAVENÍ SIMULACÍ

Pro přípravu simulace je nutné mít k dispozici potřebné vstupní soubory v PDB podobě. V tomto případě se jednalo celkově o šest struktur: GAGA tetraloop, DSPC, DSPE, ALC-0315, SM-102 a cholesterol. Tyto soubory poskytují přesné složení daných molekul (pořadová čísla atomů, jejich souřadnice atd.). Pomocí programu LEaP byly vygenerovány vstupní soubory obsahující jak topologii, tak pozice jednotlivých atomů. Všechny simulace byly v atomárním rozlišení (angl. *all atom*), což znamená, že každý atom zde byl reprezentován jednou kuličkou. Vazby mezi atomy jsou nahrazeny pružinkami, chovající se jako harmonické oscilátory, dle principu molekulové mechaniky popsaného v předchozí kapitole.

MD simulace probíhaly v simulačním boxu. Každý takovýto box splňuje **periodické okrajové podmínky**, které zjednodušují celý průběh simulace. Můžeme si je představit jako periodicky prodloužené boxy ve všech směrech. Díky tomu při simulaci nepřicházíme o žádnou část struktury, a přitom hrana boxu neovlivňuje chování systému. Velikost boxu byla vždy nastavena tak, aby byl box na jednu stranu dostatečně malý, kvůli rychlosti výpočtu simulace, a zároveň dostatečně velký, aby neovlivňoval svou velikostí výsledky simulace.

Do takto předpřipravených simulačních boxů byly postupně vkládány jednotlivé molekuly, se kterými bylo v daný moment pracováno. Dále bylo nutné vykompenzovat náboj celého boxu pomocí iontů – draselných kationtů a

chloridových aniontů. Poslední fází bylo doplnění explicitní vody (jelikož se jedná o tvorbu solvatovaného modelu), která vyplňovala zbylý prostor boxu. Při nastavení simulačních podmínek se snažíme co nejlépe napodobit fyziologické prostředí, kde je přesně stanovená koncentrace iontů a to 150 mM roztok KCl. Pro všechny simulace byl použit explicitní **OPC model vody** (angl. „*optimal*“ *point charge*). Tento model je čtyřbodový se třemi náboji. U tohoto modelu jsou bodové náboje i jejich poloha optimalizovány tak, aby co nejlépe popisovali elektrostatické vlastnosti skutečné vody. Je tedy modelem, který se nejvíce blíží vlastnostem skutečné vody. [47]

Každá simulace před svým samotným spuštěním prošla několika kroky. Nejdříve došlo k minimalizování a ekvilibrování celého systému. Tomuto kroku se musely podrobit, zároveň se strukturou, i použité protiionty a solvatační box. Předně byly zmrazeny pozice všech atomů v systému kromě vodíků vody. Posléze jsme uvolnili molekuly vody a protiiontů, zatímco atomy RNA a lipidů se nepohybovaly. Po tomto kroku se umožnil volný pohyb i atomům lipidů a mohlo dojít k postupnému uvolňování pohybu molekuly RNA, avšak jen v omezené míře. Následně se molekuly vody a protiionty mohly volně promíchat kolem zamražených molekul lipidů a RNA během 500 ps simulace za NpT podmínek, kdy tlak byl roven 1 atm. a teplota činila 298,16 K. Během této krátké simulace došlo k ustálení hustoty vody v rámci celého systému. Následně se postupně minimalizovala struktura RNA, kdy v šesti krocích došlo k postupnému uvolňování silové konstanty aplikované na páteři RNA. Samotná produkční část byla rozdělována do deseti kroků, přičemž každý krok vypočítával chování systému při 100 ns, tedy celkově bylo simulací počítáno chování systému v časovém rozsahu 1 μ s. Jednodušší systémy obsahující pouze jediný druh lipidu a systémy s 30 lipidy byly uskutečněny na počítačových clusterech Katedry fyzikální chemie a CATRIN. Větší systémy (60 lipidové) a analýzy 30 lipidových systémů, byly z důvodu jejich výpočetní náročnosti počítány pomocí infrastruktury IT4I národního superpočítačového centra v Ostravě.

3.2 POUŽITÉ ANALÝZY

Všechny simulace byly na závěr podrobeny vizuální inspekci v programu VMD a setu analýz, které jsou podrobně rozepsány níže. Pokud není řečeno jinak, byly veškeré analýzy provedeny programy v balíčku AMBERTools [48] a následné grafy připraveny pomocí programu Gnuplot (<http://www.gnuplot.info>).

Sledování kontaktů (angl. *contacts*) slouží ke zjišťování počtu vzniklých kontaktů mezi námi definovanými objekty. Prvním objektem byla vždy molekula RNA, tedy GAGA tetraloop, druhým objektem byla vždy celá molekula příslušného lipidu. Dále bylo nutné určit vzdálenost ve které se tyto kontakty budou měřit, vztaženo k molekule RNA. Ve všech případech byla vzdálenost definována jako 0,4 nm.

Jelikož docházelo k vzájemné interakci RNA s lipidy, vytvářely se zde vodíkové vazby, které střídavě vznikaly a zanikaly v závislosti na aktuální orientaci, vzdálenosti a konformaci lipidů u RNA. V průběhu simulace byly monitorovány vodíkové vazby, kdy jak RNA, tak lipidy mohly vystupovat jako akceptory, tak donory vodíkových vazeb.

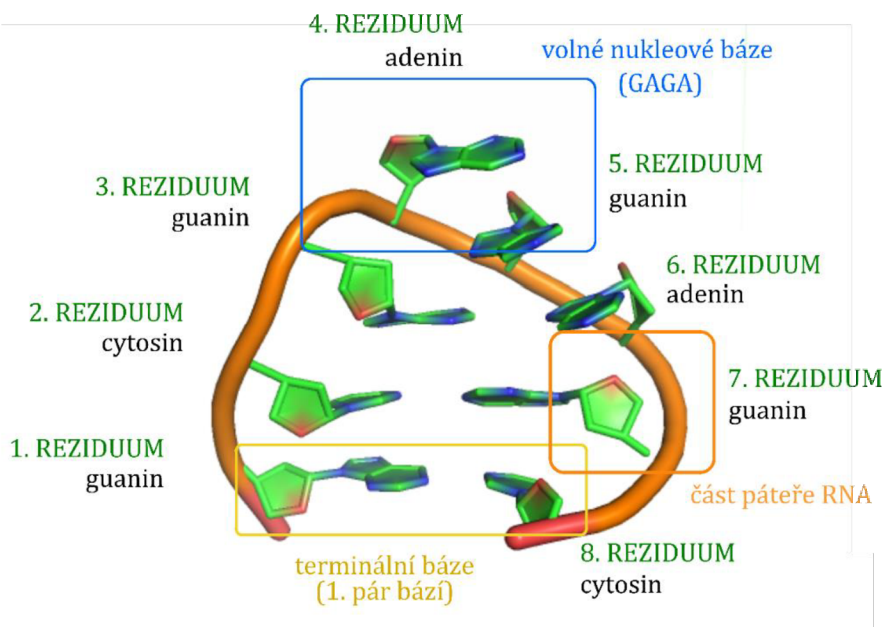
Další z provedených analýz zahrnovala zkoumání změny torzních úhlů páteře RNA, změnu konformace cukrů či změnu helikálních parametrů v průběhu simulací RNA s lipidy. Všechny tyto parametry byly vždy srovnány se systémem obsahujícím samostatnou strukturu RNA.

Hustotní mapy byly vytvářeny pomocí programu VIAMD (angl. *visual interactive analysis of molecular dynamics*)[49][50]. Jedná se o 3D mapy sloužící k vyjádření distribuce (rozložení) částic v prostoru. Hustotní mapy zkoumaly nejen rozložení lipidů, ale také protiiontů (draselné a chloridové ionty) okolo RNA. Při analýze výskytu lipidů v okolí RNA byla snaha o objevení pravidelnosti ve výskytu či jiných definovatelných parametrů. Tyto hustotní mapy byly počítány vždy ze souborů trajektorií systému z posledních 200 ns. Struktury jsou v hustotních mapách zobrazovány pomocí teček, kdy vyšší koncentrace teček znamená, že daná struktura na tomto místě setrvala v průběhu delšího časového úseku. Jedná se tedy primárně o kvantitativní znázornění pozice jednotlivých skupin kolem definované struktury.

3.3 GAGA TETRALOOP

V této práci byl jako zástupce RNA použit GAGA tetraloop, který má ve své struktuře smyčku tvořenou dvěma volnými nukleovými bázemi a jedním nekanonicky spárovaným párem (Obrázek 14). Jedním z cílů této práce bylo zjistit, zda bude docházet k interakci lipidů s touto RNA. Předběžná hypotéza byla, že lipidy budou reagovat se záporně nabitou páteří, volnými bázemi nebo terminálními bázemi. Je nutné podotknout, že tento tetraloop je malý a tím pádem nemusí být na první

pohled zcela biologicky relevantní. Na druhou stranu, pokud chceme studovat systém v atomárním rozlišení, nelze použít reálný systém, tj. celou mRNA, v kombinaci s dostatečným množstvím lipidů tak, aby se vytvořila LNP. Tudíž i simulace takto malých systémů mohou přinést cenné informace o interakci RNA s lipidy a tím pomoci pochopit vznik LNP či fungování LNP v těle.



Obrázek 14 Struktura tetraloopu GAGA včetně popisů jednotlivých bází, se zvýrazněnými předpokládanými místy interakcí RNA s lipidy.

Molekula GAGA tetraloopu obsahuje dva páry bází, které splňují Watson-Crickovské párování bází. Zbývající čtyři dusíkaté báze nejsou zcela volné, reziduum 3 a 6 spolu interagují prostřednictvím nekanonického párování. Volnými bázemi nazýváme 4. a 5. reziduum (na Obrázek 14 se jedná o modře znázorněnou oblast).

3.4 SYSTÉMY OBSAHUJÍCÍ JEDEN DRUH LIPIDU

Jako první byly připraveny tři sady systémů obsahující RNA a jeden typ lipidů lišící se jen v počtu lipidů v systému, kdy počty lipidů gradovaly od pěti do dvaceti (Tabulka 1). Každá simulace byla spuštěna alespoň ve třech provedeních. Tyto simulace sloužily primárně ke zjištění rozdílu chování mezi jednotlivými typy lipidů. Simulace ukázaly, že lipidy mají tendenci se zdržovat blízko terminálních bází, a to nezávisle na rozdílnosti jejich struktur. Nezávisle na typu lipidů také nejdříve docházelo k vytvoření shluku lipidů v rámci simulačního boxu, který následně interagoval s RNA. Vytvoření shluku bylo zapříčiněno hydrofobními interakcemi,

kteře se snařily o dosaření co nejmenří plochy styku lipidů s vodnřm prostředřm. Podobnř vřsledky pro jednotlivř systřmy jsou diskutovány dále.

Jak je z Tabulka 1 patrnř, v nřkterřch přřpadech (u simulacř obsahujřcřch 10 a 20 lipidů) byly vyzkouřeny různř velikosti boxu z dřvodu otestování vlivu velikosti boxu na vřslednř uspořadání lipidů. I přes vřtřři prostor pro samotnř shromařřování lipidů a jejich nřslednř uchycenř se na molekule RNA, byla konečnř poloha nasednutř uskupenř lipidů na RNA vřdy stejnř.

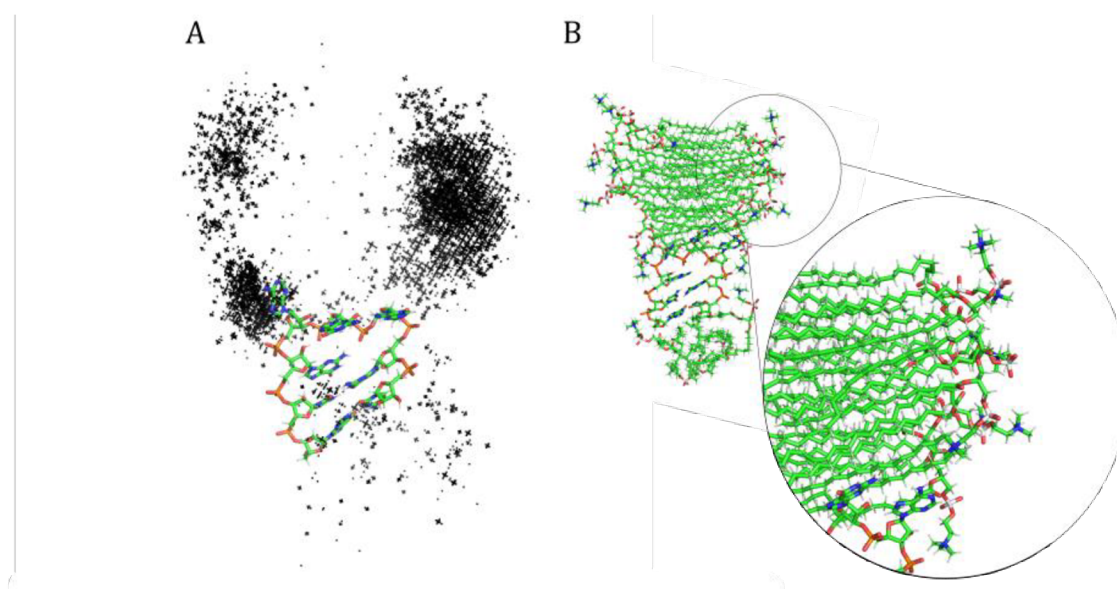
Tabulka 1 Přehled vřech provedenřch simulacř s jednřm druhem lipidu obsahujřcř velikost boxu (jelikoř se jednř o krychli, je uvedena pouze jedna dřlka, v jednotce nm). Navřc u kařdř ze simulacř je uvedeno, zda probřhla alespoň na krátkř časovř okamřik interakce s RNA.

LIPIDY	POČET LIPIDŮ	POČET SIMULACŘ	VELIKOST SIMULAČNŘHO BOXU (nm)	INTERAKCE S VOLNŘMI BŘZEMI	INTERAKCE S TERMINÁLNŘMI BŘZEMI	INTERAKCE S PÁTEŘŘ RNA
IONIZOVATELNŘ LIPIDY (AL-0315)	5	5	7	ANO	ANO	NE
	10	3	7	ANO	ANO	ANO
	20	3	7/9	ANO	ANO	NE
IONIZOVATELNŘ LIPIDY (SM-102)	5	5	7	ANO	ANO	ANO
FOSFOLIPIDY (DSPC)	5	5	7	ANO	ANO	ANO
	10	3	6/7	ANO	ANO	NE
	20	3	9/10	ANO	ANO	NE
FOSFOLIPIDY (DSPE)	5	5	7	ANO	ANO	NE
CHOLESTEROLY	5	5	7	ANO	ANO	NE

Přehled mřst interakcř lipidů s RNA (poslednř třř sloupce Tabulka 1) ukazuje, ře vřdy docházelo k interakci s terminálnřmi břzemi, kterř se zdajř pro lipidy nejpreferovanřřřm mřstem interakce. Toto postavenř sejevř jako nejvřhodnřřř z hlediska hydrofobnřch interakcř, tj. shluk lipidů chrání hydrofobnř rovinu terminálnřch břzř. V nřkterřch přřpadech sice docházelo i k interakcřm s pãteřř RNA, avřak jen velice zřřdka a přřmřrnř na dobu menřř neř 100 ns. V přřpadě interakcř s volnřmi břzemi se sice jednalo o delřř interakce v porovnání s interakcemi s pãteřř, ale pouze v jedinřm přřpadě dořlo k situaci, kdy se ke konci simulace (tedy v době

1 μ s) lipidy nacházely jak u terminálních bází, tak u volných bází smyčky. Jednalo se konkrétně o systém obsahující 20 fosfolipidů DSPC, který je pro názornost zobrazen níže (Obrázek 15).

Rozmístění lipidů nebylo rovnoměrné, vyšší počet lipidů převažoval u volných bází. Simulace nebyla dále prodlužována, proto není jisté, zda by též nedošlo k ustálení všech lipidů pouze u terminálních bází, jak tomu bylo ve všech ostatních případech systémů o stejném počtu lipidů. Na Obrázek 15 je možné si všimnout přiblíženého pohledu na uspořádané lipidy, které svou strukturovaností připomínají lipidovou dvouvrstvu, jedná se tedy o pevný gel (*solid gel*) typický pro fosfolipidové struktury. Tento stav, tedy výskyt lipidů jak u terminálních, tak u volných bází, budeme nazývat jako metastabilní stav systému.



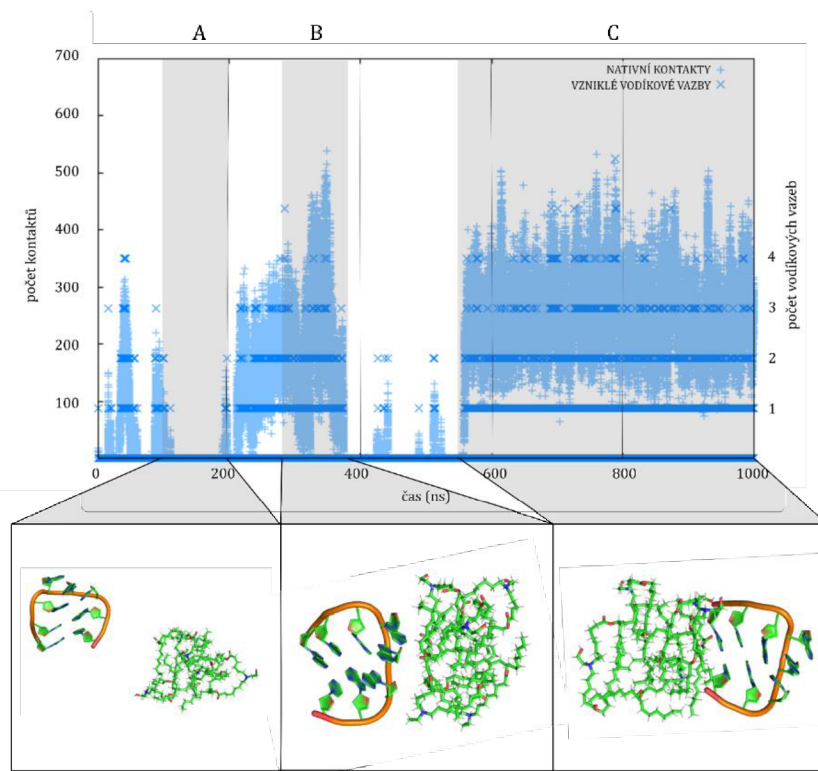
Obrázek 15 A) znázornění hustoty částic (polárních částí - PC - všech fosfolipidů DSPC) kolem GAGA tetraloopu pomocí programu VIAMD. B) zobrazení finální 3D struktury tetraloopu GAGA obklopeného lipidy. Pro lepší ukázkou strukturovanosti byly lipidy nacházející se u volných bází přiblíženy.

Jelikož počet simulací byl značný a výsledky většiny systémů srovnatelné, budou výsledky hodnoceny podle druhu lipidů, které v nich byly obsaženy. V níže uvedených odstavcích budou diskutovány výsledky systémů ionizovatelných lipidů, fosfolipidů a cholesterolů, kdy u každé skupiny bude uveden jeden vybraný systém, na kterém budou provedené analýzy blíže vysvětleny.

V případě ionizovatelných lipidů můžeme říct, že se lipidy chovaly nezávisle na svém počtu. Všechny připravené alternativy (počtem i typem ionizovatelného lipidu) nejvíce interagovaly s terminálními bázemi RNA. Toto chování bylo zajištěno hydrofobními konci lipidů, které se takto vzájemně kryly se strukturou RNA.

Při bližším pohledu na seskupení těchto lipidů uchycených u terminálních bází bylo možné si všimnout částečné organizace. Lipidy se snažily o vytvoření micelární struktury, tedy výskytu hydrofilních hlav na povrchu shluku, aby jim byla umožněna interakce s vodným prostředím, zatímco hydrofobní části se nacházely ve středové části shluku a interagovaly s koncovými bázemi. Průběh simulací lze rozdělit na dva směry, kdy v prvním případě chování lipidů docházelo prvotně k seskupení všech lipidů, které následně jako celek interagovaly s molekulou RNA. Druhou možností byl vznik více samostatných shluků, kdy se jeden uchytil u terminálních bází a druhý u volných bází. Pokud byl vytvořen další lipidový shluk, pohyboval se v prostředí solvatačního boxu, dokud se nespojil s některým z již zmíněným shlukem lipidů u RNA. Postupem času vždy došlo ke sjednocení těchto menších systémů v jeden velký, který se uchytil u terminálních bází.

Pro názornou ukázkou systému s ionizovatelnými lipidy, byl vybrán systém s ionizovatelnými lipidy SM-102. Přesněji se jednalo o systém GAGA tetraloopu s pěti ionizovatelnými lipidy (Obrázek 16). Průběh simulace tohoto ukázkového systému je popsán pomocí grafu, který poskytuje informace o tvorbě vodíkových vazeb a počtu kontaktů vzniklých mezi lipidy a molekulou RNA. Celkem byly ze simulace vybrány tři oblasti (Obrázek 16). Pro popis a vysvětlení nulového (oblast A), zvýšeného (oblast B) a konstantního (oblast C) počtu vzniklých kontaktů a vodíkových vazeb. Na první pohled lze vidět, že systém se stabilizoval v počtu kontaktů až po více než 500 ns, kdy došlo k navázání lipidového shluku na terminální báze.

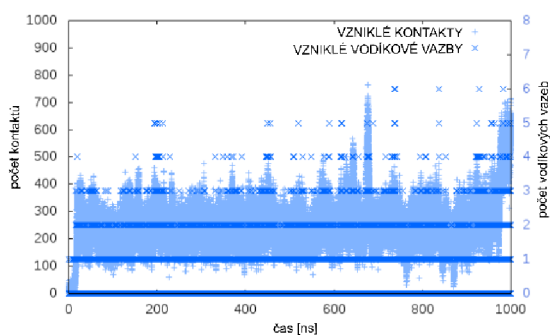


Obrázek 16 Ukázkový průběh simulace GAGA tetraloopu s pěti ionizovatelnými lipidy SM-102 ilustrovaný pomocí grafu počtu kontaktů a počtu vodíkových vazeb mezi RNA s lipidy v rámci celé simulace. Vodíkové vazby jsou vyznačeny tmavě modrými body (x), zatímco kontakty pomocí světle modrých bodů (+). Na grafu jsou vyznačeny zajímavé oblasti (A-C), kterým byly přiřazeny 3D struktury ukazující příslušnou konformaci a navázání lipidů u RNA.

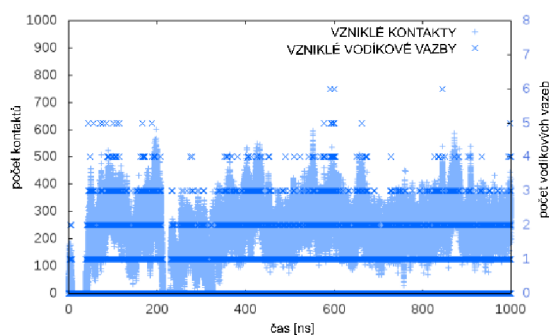
Pokud se v blízkosti RNA nacházel shluk lipidů, došlo ke zvýšení počtu kontaktů, které můžeme vidět ve zvýrazněné oblasti B a C (Obrázek 16). V případě oblasti A je zde nulový počet vzniklých kontaktů způsobený oddálením shluku lipidů od molekuly RNA. Jednoho z nejvyšších nárůstů počtu kontaktů bylo dosaženo v oblasti B (odpovídající zhruba 550 kontaktů), kde došlo ke kontaktu všech lipidů s volnými bázemi RNA. K ustálení systému došlo až v druhé polovině simulace, což je patrné i díky neměnnému počtu kontaktů a vodíkových vazeb (oblast C).

V případě ionizovatelných lipidů ALC-0315 lze říci, že k ustálení systémů průměrně docházelo v první polovině simulace, tedy do času 500 ns. Při srovnávání průběhů simulací ionizovatelných lipidů ALC-0315 a SM-102 se zde nevyskytovaly významné rozdíly. Pro lepší popis je na níže přiloženém obrázku (Obrázek 17) ukázán průběh jednoho vybraného systému z ionizovatelných lipidů ALC-0315 a jednoho vybraného systému z ionizovatelných lipidů SM-102. Tyto simulace byly vzájemně porovnány pomocí grafů vzniklých kontaktů a vodíkových vazeb mezi molekulou RNA a lipidy. V případě lipidů ALC-0315 došlo k okamžitému nasednutí shluku lipidů na terminální báze, kde zůstaly až po zbytek simulace. Lipidy SM-102 nejdříve

v prostředí simulačního boxu vytvářely seskupení, které se následně (stále v době prvních 100 ns) uchýlilo u volných bází. U volných bází zůstaly do doby kolem 300 ns, během které docházelo k jejich přeskupování, následně se posunuly k terminálním bázím, kde zůstaly až do konce simulace. Při vizuálním srovnání dvou grafů je viditelná určitá podobnost, jak v rozmezí počtu kontaktů, tak i v případě tvorby vodíkových vazeb, kde maximální počet vzniklých vodíkových můstků byl šest. Vyšší počet kontaktů na konci grafu lipidů ALC-0315 byl způsoben konformací hydrofilních konců lipidů, které se snažily o vytváření kontaktů i s rezidui 2 a 8. Tato simulace byla proto dále prodloužena až na 2 μ s. Ačkoliv zde byla viditelná snaha o interakci se záporně nabitou páteří, po zhruba 150 ns (tedy simulační čas 1 150 ns) opět došlo k ustálení lipidů u terminálních bází, které přetrvalo až do konce prodlouženého simulovaného času (2 000 ns).



SYSTÉM GAGA TETRALOOP S PĚTI IONIZOVATELNÝMI LIPIDY ALC-0315



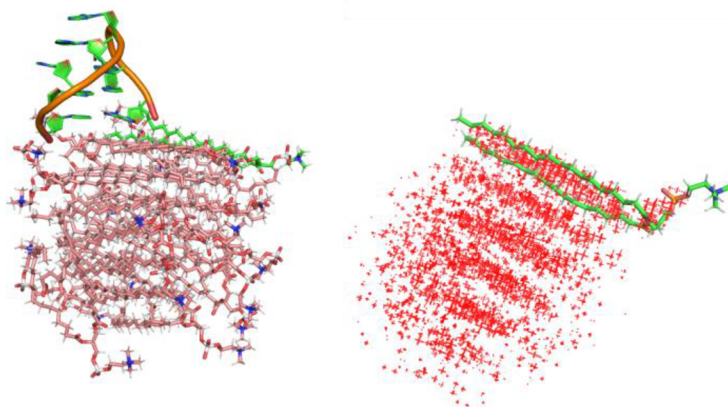
SYSTÉM GAGA TETRALOOP S PĚTI IONIZOVATELNÝMI LIPIDY SM-102

Obrázek 17 Porovnání dvou systémů rozličných ionizovatelných lipidů, ALC-0315 (vlevo) a SM-102 (vpravo), kdy každý systém obsahoval stejný počet lipidů, tedy pět. Srovnání proběhlo za pomoci grafů určujících počet vzniklých kontaktů a vodíkových vazeb (osa x) za čas celé simulace (osa y). Počet kontaktů je zde znázorněn pomocí světle modrých symbolů (+), zatímco počet vodíkových vazeb je znázorněn pomocí tmavě modrých symbolů (x). Celkový čas simulace činí 1000 ns.

Systémy s ionizovatelnými lipidy SM-102 vykazovaly ve 2 z 5 případů složitější nasedání lipidů na RNA, kdy docházelo k hledání nejvhodnější konformace a poloze lipidů u RNA. Ve zbylých případech docházelo k rychlému ustálení lipidů u terminálních bází průměrně do 400 ns. Též ve 4 z 5 případů docházelo k interakci s volnými bázemi, která však nebyla dostatečně silná na to, aby lipidy udržela po celou simulovanou dobu u volných bází.

V případě fosfolipidů bylo typické, že docházelo k vytváření uspořádané lipidové struktury, připomínající lipidovou dvojvrstvou, což je dobře viditelné převážně v systémech s 20 lipidy (Obrázek 18). Na rozdíl od klasické lipidové dvojvrstvy je tato struktura tvořena lipidy navzájem překrytými, tj. její tloušťka odpovídá cca délce jednoho lipidu. Pro jednoduchost ji nicméně budeme nazývat „dvojvrstva“. V těchto

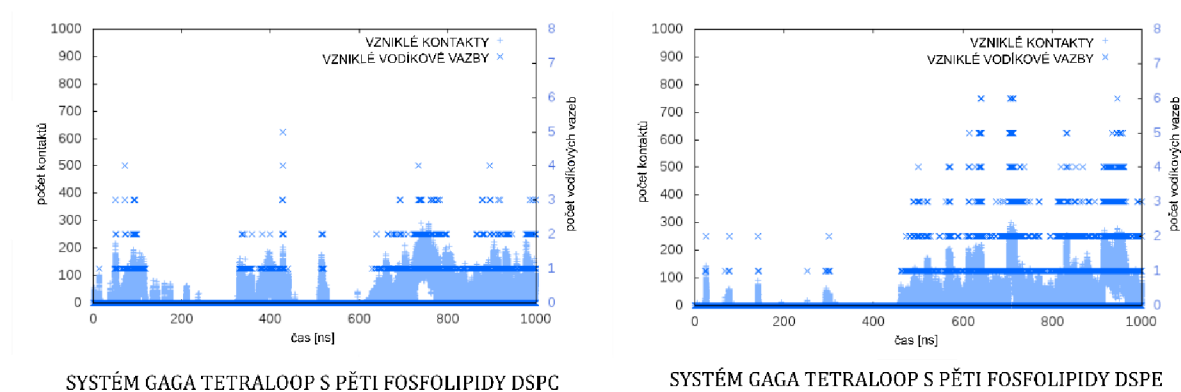
simulacích se vytvářejí vrstvy k sobě přidružených lipidů, ve kterých byly nabitě polární skupiny umístěny na vnějších stranách dvojvrstvy a byly v kontaktu s vodným prostředím, zatímco hydrofobní řetězce byly rovnoběžně zarovnané a tvořily vnitřní prostor. Organizovanost těchto struktur dokazuje nejen vizuální inspekce, ale také hustotní mapy, kde proměnnou, kolem které se hustota částic počítala, byl jeden předem vhodně zvolený fosfolipid DSPC (byly zvoleny tři po sobě jdoucí rezidua odpovídající třem částem fosfolipidu – stearoyl (ST)+ fosfatidylcholin (PC) + stearoyl (ST)). Okolo něj se zkoumal výskyt ostatních lipidů v systému. Tyto hustotní mapy dobře ilustrují, že lipidy jsou vzájemně uspořádané tak, aby nedocházelo k jejich překrývání, jejich vzájemná poloha se po ustálení simulace nemění, tedy je zde patrná vnitřní organizovanost (Obrázek 18).



Obrázek 18 Vizualizace uspořádání lipidů u terminálního páru v simulaci s 20 fosfolipidy. A) Zobrazení konečného uspořádání lipidů; DSPC zobrazený zeleně sloužil jako referenční lipid a hustota ostatních (DSPC zobrazeny růžově) je zobrazena na B) Hustota částic kolem vybraného lipidu DSPC. Pro lepší přehlednost jsou zobrazeny pouze body s nejvyšší hustotou výskytu lipidů.

Dále bylo provedeno srovnání jednoho zástupce ze simulace s fosfolipidy DSPC s jedním zástupcem ze simulací s fosfolipidy DSPE (Obrázek 19). Toto srovnání bylo provedeno pomocí grafu vzniklých kontaktů a vodíkových vazeb mezi RNA a lipidy. V obou případech lze vidět, že k interakcím s lipidy docházelo nárazově, nikoli kontinuálně. K seskupení lipidů docházelo v průběhu prvních 100 ns, kdy se následně tento shluk lipidů snažil najít nejvhodnější místo u molekuly RNA. Fosfolipidy DSPC se kolem 100 ns uchytily u cukr-fosfátové páteře RNA, kde ovšem nebyly dostatečně dlouho a došlo k jejich oddálení a pohybu napříč simulačním boxem. K další interakci došlo až kolem 400 ns, kdy se fosfolipidy uchytily u volných bází, avšak ani tato interakce nebyla dostatečně silná a lipidy se opět vzdálily od RNA. Konečnou a nejstabilnější interakcí se ukázala být ta u terminálních bází, kdy následně docházelo pouze k přeskupování molekul lipidů v rámci shluku. Simulace s fosfolipidy DSPE

měly obdobný průběh, na začátku si též hledaly nejlepší možnou interakci s molekulou RNA, kterou se ukázala být opět interakce s terminálními bázemi. Závěrem lze vidět, že lipidy se u terminálních bází navázaly v případě fosfolipidů DSPE již kolem 500 ns, zatímco fosfolipidy DSPC až kolem 650 ns. Nízký počet kontaktů byl způsoben jejich strukturální orientací (Obrázek 18), připomínající fosfolipidovou dvojvrstvou, každopádně v takto nízkém počtu lipidů je jen obtížně rozpoznatelná. Fosfolipidy DSPE vykazovaly mnohem vyšší počet vodíkových vazeb v porovnání s fosfolipidy DSPC, což bylo způsobeno strukturou těchto lipidů. Fosfolipidy DSPE totiž obsahují ve své struktuře ethanolamin s volnými polárními vodíky, které umožňují tvorbu vodíkových můstků s molekulami vody.

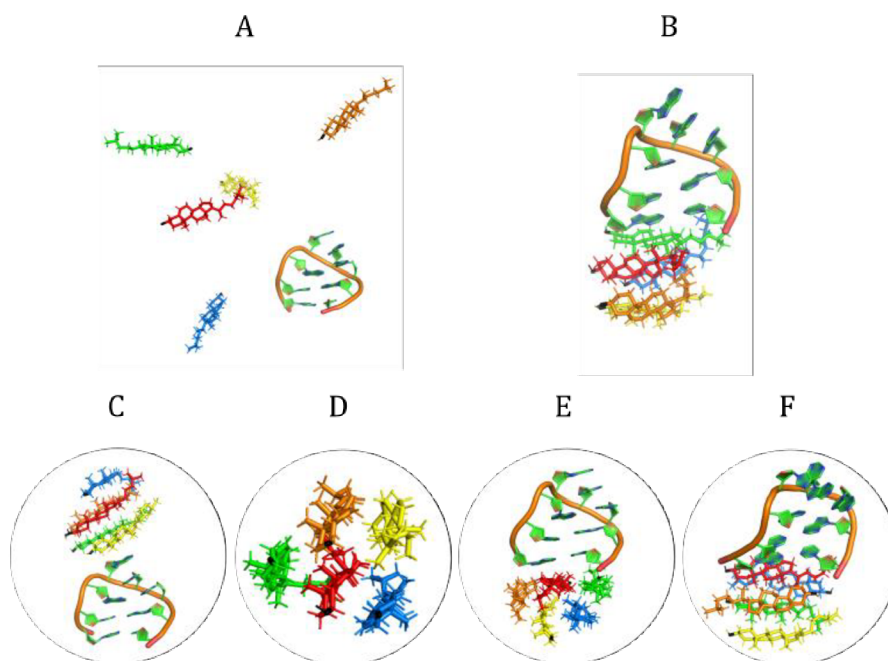


Obrázek 19 Porovnání dvou systémů rozličných fosfolipidů, DSPC (vlevo) a DSPE (vpravo), kdy každý systém obsahoval stejný počet lipidů, tedy pět. Srovnání proběhlo za pomoci grafů určujících počet vzniklých kontaktů a vodíkových vazeb (osa x) za čas celé simulace (osa y). Počet kontaktů je zde znázorněn pomocí světlých modrých symbolů (+), zatímco počet vodíkových vazeb je znázorněn pomocí tmavě modrých symbolů (x). Celkový čas simulace činí 1000 ns.

V případě cholesterolu je možné si též všimnout preference terminálních bází. Pro ilustraci popíšeme jednu z 5 simulací (viz Tabulka 1). Ostatní simulace se chovaly stejně.

Na začátku simulace (Obrázek 20 A) se cholesterolů vyskytovaly rozmístěny volně v prostoru simulačního boxu. Následně docházelo k postupnému seskupování cholesterolů dohromady, pohybu tohoto shluku v rámci boxu až do konečného uspořádání (Obrázek 20 B). Zajímavé je, že nejdříve došlo ke vzniku dvou dvojic – v barevném rozdělení se jednalo o dvojici červený a modrý cholesterol a žlutý a zelený cholesterol. Postupně se ke dvojici modrý a červený cholesterol přidal i pátý (oranžový) cholesterol. To vše se dělo v průběhu prvních 100 ns. Do 200 ns došlo k seskupení všech pěti cholesterolů do kompaktní struktury, která se dále pohybovala jako jeden celek simulačním boxem a postupně interagovala s různými částmi RNA

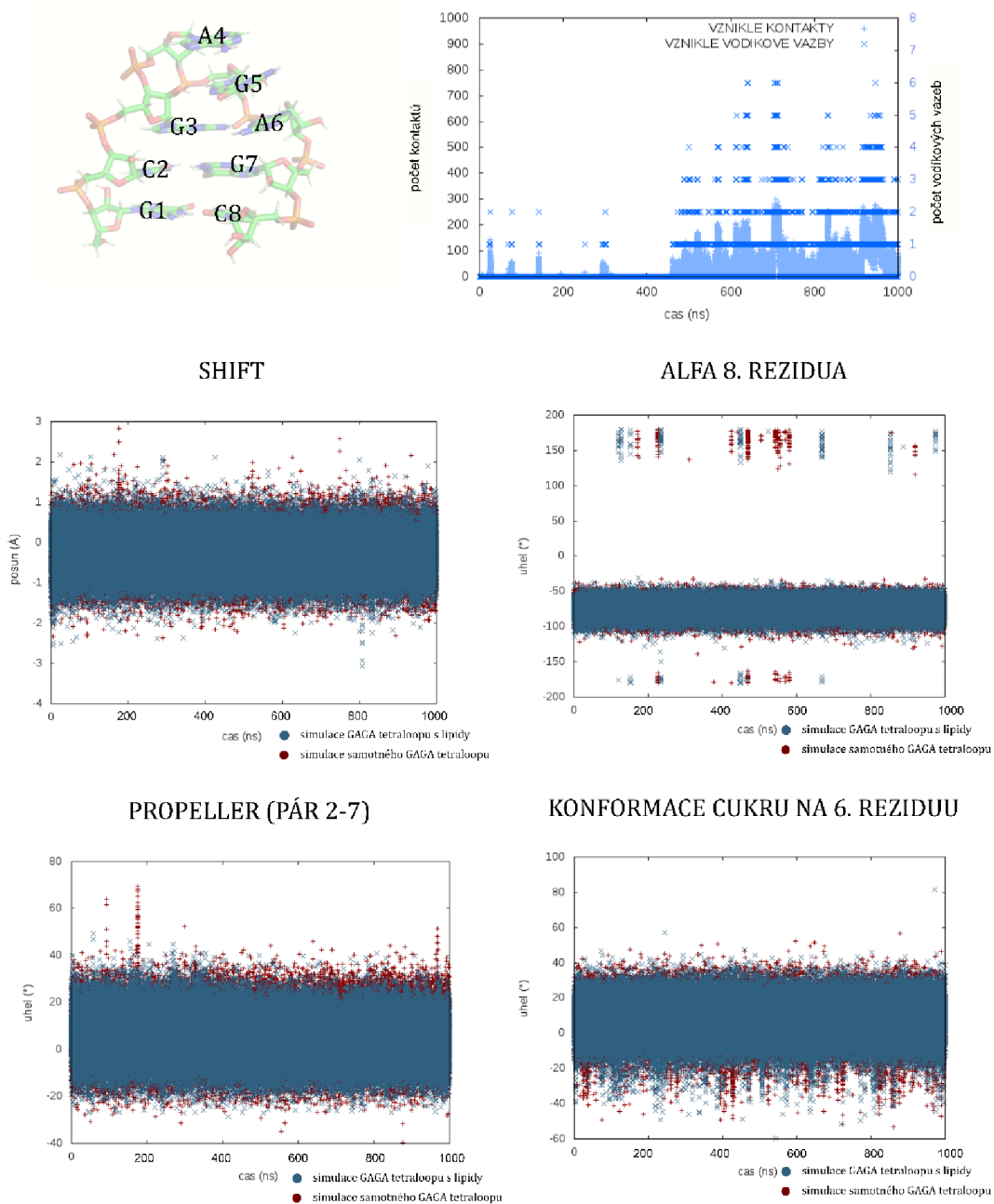
(Obrázek 20 C) než došlo kolem 500 ns k finálnímu nasednutí na terminální báze (Obrázek 20 E). Samotná organizovanost cholesterolů je dobře patrná na Obrázek 20 D. Pro lepší ilustraci jsou lipidy v tomto obrázku orientovány tak, že čtyři z pěti lipidů míří hydroxylovou skupinou směrem k pozorovateli. Po nasednutí cholesterolů na terminální báze ještě došlo k rotaci celého seskupení lipidů o 90°. V rámci tohoto shluku lipidů docházelo k vyměňování pozic jednotlivých lipidů mezi sebou, tj. nešlo analyzovat chování konkrétního cholesterolu s terminálním párem bází. Toto chování cholesterolů je zapříčiněno tendencí cholesterolů ke skládání aromatických jader na sebe, kdy dochází k patrové interakci mezi aromatickými částmi molekul cholesterolu a případně i terminálních bází. Tedy cholesterol nejbližší k RNA se orientuje podle terminálního páru bází a na základě jeho orientace se dále orientuje jiný nejbližší cholesterol. Jedná se o kaskádovité ovlivňování, které se neustále mění. Toto chování je zobrazeno v Obrázek 20 F.



Obrázek 20 Ukázka chování systému obsahující GAGA tetraloop a pět cholesterolů, v průběhu vybrané simulace. Pro přehlednost jsou jednotlivé cholesteroly barevně odděleny. U všech lipidů byla je černě zvýrazněna hydroxylová skupina.

Ve všech simulacích se nevyhodnocovalo jen chování lipidů, ale i ovlivňování RNA molekuly těmito lipidy. U RNA byly sledovány hodnoty torzních úhlů, konformací cukru, parametrů bází a dalších aspektů, vždy prostřednictvím srovnávání simulace samotného GAGA tetraloopu bez lipidů (pro nás výchozí systém), se simulací s lipidy.

Všechny simulace vykazovaly podobný průběh a pro ilustraci chování RNA byla vybrána jedna simulace obsahující pět fosfolipidů DSPE. Typické chování RNA molekuly v průběhu simulace ukazuje Obrázek 21 obsahující různé parametry popisující RNA molekulu. Tyto grafy ukazující, že při porovnání chování RNA v simulaci bez a s lipidy nedochází ke zdatelnému ovlivnění torzních úhlů, konformací cukrů a helikálních parametrů bází (Obrázek 21).



Obrázek 21 Ukázka ovlivňování struktury RNA lipidy pomocí srovnávacích grafů torzních úhlů, helikálních parametrů bází či konformací cukrů. Vždy docházelo ke srovnávání s výchozí strukturou, systému GAGA tetraloopy bez lipidů. Pro jednotlivé grafy byla vytvořena legenda, definující grafy. Aby bylo možné odůvodnit některé závěry, byl též přidán graf vzniklých kontaktů a vodíkových vazeb (nahore vpravo). Dále byla znovu očíslována jednotlivá rezidua GAGA tetraloopy (nahore vlevo).

Pro samotnou analýzu chování RNA s DSPE fosfolipidy, bylo nutné vyhodnotit přesný průběh simulace daného systému, pomocí grafu počtu kontaktů a vzniklých vodíkových vazeb (Obrázek 21). Na začátku simulace nedocházelo k výrazným interakcím lipidů s RNA, molekula RNA tedy nebyla lipidy nikterak ovlivňována. Až po vytvoření uceleného shluku lipidů (kolem 500 ns) lze na grafu počtu kontaktů a vodíkových vazeb vidět postupný nárůst kontaktů lipidů s RNA. Nejvyššího počtu kontaktů bylo dosaženo okolo 700 ns, kdy docházelo k interakcím polárních nabitých hlav lipidů DSPE s reziduem 2 a 7, tedy druhým kanonicky párovaným párem bází. Tato interakce však trvala jen velmi krátce a následně docházelo pouze k přeskupování lipidových molekul ve shluku. Též počet vodíkových vazeb byl ve druhé polovině simulace značně vyšší v porovnání s první polovinou simulačního času. Fosfolipidy DSPE se v rámci této simulace vyskytovaly pouze u terminálních bází RNA molekuly a docházelo k jejich uspořádávání do útvarů připomínající lipidové dvojvrstvy.

Při analyzování rozdílnosti chování GAGA tetraloopu s lipidy a se samotným GAGA tetraloopem (pro nás srovnávací systém) se ukázalo, že nedochází k zásadnímu ovlivňování torzních úhlů ani u jednoho z reziduí, také konformace cukrů nevykazovaly zásadní odlišnosti od srovnávacího systému. Helikální parametry bází zahrnující pohyb bází vůči sobě v páru (*propeller*) jsou prakticky totožné se simulací srovnávacího GAGA tetraloopu. Také pohyb dvou párů bází vůči sobě (*shift*) nevykazuje znatelné změny GAGA tetraloopu bez lipidů a s lipidy.

3.5 SYSTÉMY OBSAHUJÍCÍ VÍCE DRUHŮ LIPIDŮ

Pro zvýšení biologické relevance byly provedeny i simulace se směsí více druhů lipidů v okolí molekuly RNA. Tyto simulace mají co nejvíce napodobovat strukturu LNP, která se ve většině případů skládá z ionizovatelných lipidů, fosfolipidů, cholesterolů a PEG-lipidů. Nicméně PEG-lipidy se v LNP vyskytují v méně než 2 molárních procentech, tj. PEG-lipidy byly v těchto simulacích vynechány a jejich procentuální zastoupení bylo přičteno k zastoupení fosfolipidů, konkrétně DSPC. Celkem byly připraveny dvě velikosti systémů obsahujících 30 a 60 lipidů. Přesný počet použitých lipidů je pro konkrétní systém shrnutý v Tabulka 2. Tyto systémy byly vytvářeny pouze z ionizovatelných lipidů ALC-0315, fosfolipidů DSPC a cholesterolů.

S ionizovatelnými lipidy SM-102 a DSPE již dále pracováno nebylo, a to z důvodu výpočetní a časové náročnosti systémů lipidových směsí.

Tabulka 2 Souhrn lipidů, které byly použity v simulacích s více typy lipidů s jejich přesným počtem.

	PROCENTUÁLNÍ ZASTOUPENÍ (%)	POČET LIPIDŮ (PŘESNÝ/POUŽITÝ)		POČET LIPIDŮ (PŘESNÝ/POUŽITÝ)	
POČET LIPIDŮ CELKEM		30		60	
IONIZOVATELNÉ LIPIDY (AL-0315)	50,00	15,00	15	30,00	30
CHOLESTEROLY	38,50	11,55	12	23,10	23
FOSFOLIPIDY (DSPC)	10,00	3,00	3	6,00	7
PEG-LIPIDY (nebyly použity)	1,50	0,45	0	0,90	0

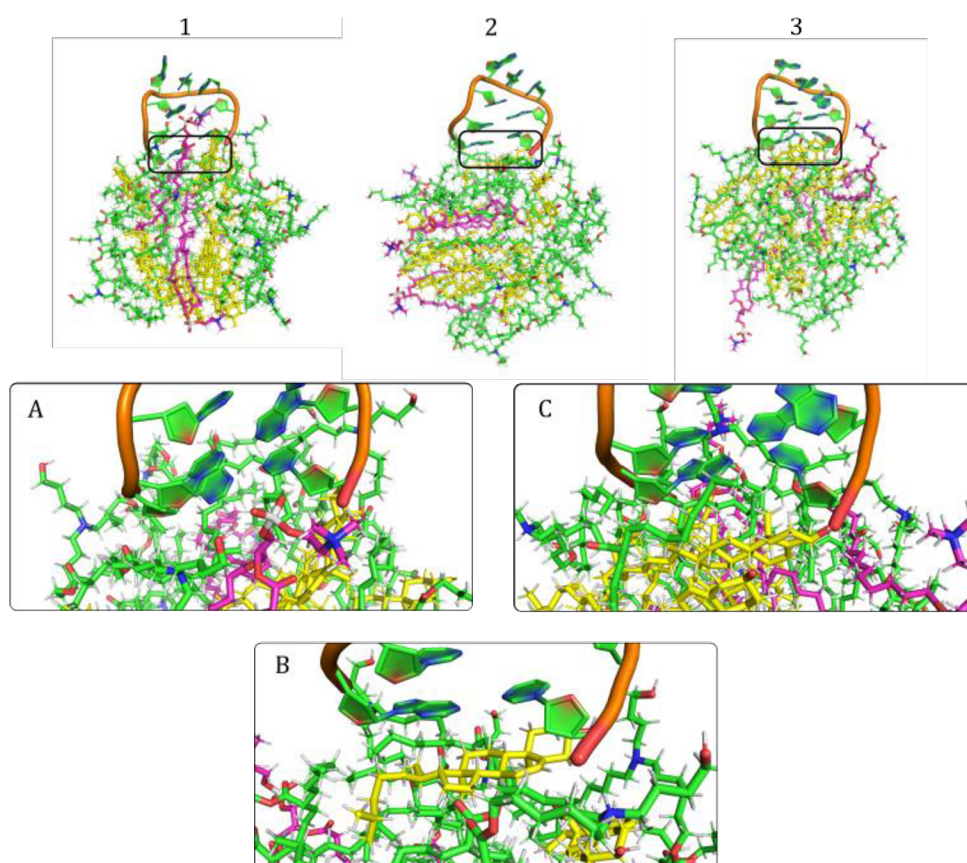
Všechny tyto simulace byly vytvářeny postupným přidáváním lipidů a postupným zvětšováním simulačních boxů. Pořadí v přidávání lipidů do simulačního boxu neovlivňovalo výslednou polohu lipidů. V případě nejmenšího systému, tedy simulaci s 30 lipidy, se ionizovatelné lipidy, které se přidávaly do boxu jako první, nacházely na závěr simulace primárně na rozhraních s vodným prostředím, a nikoliv u terminálních bází (Obrázek 22). Pro přehlednost byly základní informace o systémech s více druhy lipidů shrnuty do Tabulka 3, která obsahuje i konečnou konformaci systémů, které jsou více popsány později.

Tabulka 3 Souhrn všech simulovaných systémů lipidů, velikostí použitých boxů a konečného uspořádání systému.

POČET LIPIDŮ	VELIKOST SIMULAČNÍHO BOXU (nm)	POČET SIMULACÍ	KONEČNÁ POLOHA LIPIDŮ	KONEČNÉ USPOŘÁDÁNÍ LIPIDŮ
30 LIPIDŮ	7	3	u terminálních bází	ionizovatelné lipidy tvoří vnější obal shluku lipidů
			u terminálních bází	
60 LIPIDŮ	8	5	u terminálních a volných bází* terminální báze a simulační box*	ionizovatelné lipidy tvoří vnější obal shluku lipidů, fosfolipidy a cholesterol jsou situovány uvnitř shluku lipidů

* modře znázorněné konečné konformace systémů jsou považovány za metastabilní stavy těchto systémů a předpokládá se, že by se po prodloužení simulačního času všechny lipidy přesunuly k terminálním bázím RNA molekuly

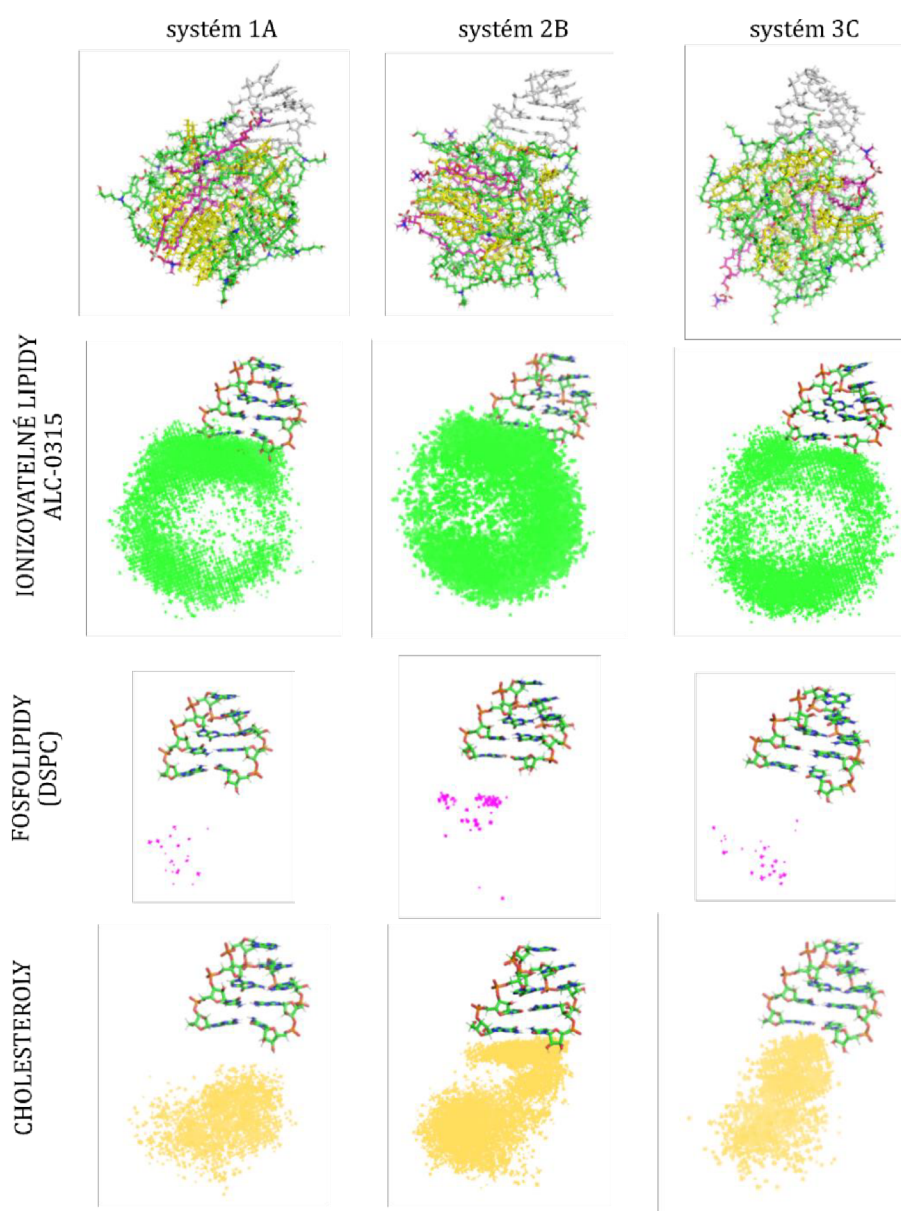
V simulaci s 30 lipidy docházelo opět k asociaci lipidů s RNA v blízkosti terminálních bází. Výsledné rozložení lipidů ukazuje, že ionizovatelné lipidy tvoří vnější obal celého seskupení lipidů (Obrázek 22), v souladu s jejich preferencí ke kontaktům s vodou a se zakřivenými strukturami [31] Jelikož jsou zde zástupci více druhů lipidů, nedocházelo k tvorbě struktury podobné lipidové dvojvrstvě jako tomu bylo u systémů se samotnými fosfolipidy. Celkem byly simulovány tři systémy. Průběh těchto simulací a finální rozložení systému je detailněji popisováno v následujících odstavcích.



Obrázek 22 Přehled všech systémů s 30 lipidy (1-3), kdy ke každému systému přísluší obrázek (A-C), umožňující bližší pohled na místo kontaktu lipidů s RNA, tedy terminální báze. Na všech obrázcích jsou ionizovatelné lipidy ALC-0315 znázorněny zelenou, fosfolipidy DSPC růžovou a cholesteroly žlutou barvou. Takto barevně odděleny jsou pouze uhlíky, tvořící většinu struktury, barvy ostatních atomů (kyslík, fosfor, dusík) jsou nechány v barvách vygenerovaných programem PyMOL.

Při kompletním popisu všech systémů můžeme podotknout, že pouze v jednom případě (Obrázek 22. 2B) můžeme nalézt strukturu cholesterolu u terminálních bází, ve zbylých dvou případech jsou zde pozorovány hydrofobní konce ionizovatelných lipidů (Obrázek 22. 1A a 3C). V prvních dvou systémech 1A a 2B je též viditelné rozdělení lipidů, kdy se zástupci stejného druhu lipidů snaží vyskytovat v těsné blízkosti. Tyto lipidové shluky se dále snaží o vrstevnaté uspořádání v systému,

kdy nejvíce ve středu jsou v případě systému 1A fosfolipidy, u systému 2B cholesteroly. Druhou vrstvu tvoří v případě 1A systému cholesteroly, u systému 2B fosfolipidy. V případě systému 3C dochází k jistému vysunutí molekul fosfolipidů směrem ven ze shluku. Pro všechny systémy platí, že nejsvrchnější vrstvu tvoří ionizovatelné lipidy. Tyto ionizovatelné lipidy jsou situovány do struktury micely, tedy hydrofilní části jsou orientovány směrem ven a hydrofobní části směrem dovnitř. Toto uspořádání je dobře viditelné pomocí hustotních map lipidů. Tyto hustotní mapy ukazují cílené rozdělení lipidů do vrstev, kdy ionizovatelné lipidy ALC-0315 se vyskytovaly primárně na povrchu a v místech styku s RNA, tedy terminálními bázemi (Obrázek 23). Detailnější průběh simulací pro každý ze systémů je popsán dále.

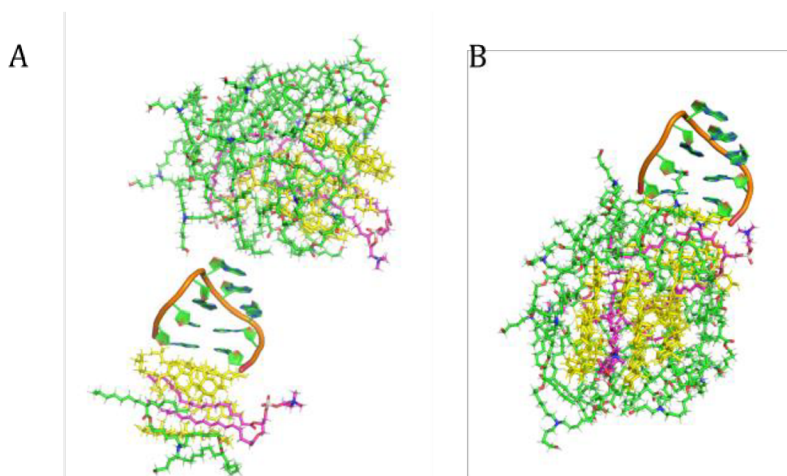


Obrázek 23 Přehled hustotních map všech tří 30 lipidových simulací. V řádcích jsou hustotní mapy rozděleny podle typu lipidu (tedy ionizovatelné lipidy, fosfolipidy a cholesteroly), ve sloupcích jsou pak hustotní mapy

rozděleny podle simulovaného systému. Značení systémů obsahuje pořadové číslo simulace a přesný počet lipidů. Pro přehlednost jsou zde uvedeny i samotné systémy, kdy ionizovatelné lipidy ALC-0315 jsou znázorněny zeleně, fosfolipidy DSPC růžově a cholesteroly žlutě. Hustota zobrazení hustotních map je ve všech případech stejná.

Při bližším pohledu na Obrázek 23 si lze povšimnout, že ionizovatelné lipidy vytvářejí obal celého lipidového shluku, a tedy tento kulovitý tvar ve svém středu neobsahuje žádné ionizovatelné lipidy. V tomto prostoru se naopak nachází molekuly cholesterolů a fosfolipidů, které vykazují jistou strukturovanost. Vyšší hustota ionizovatelných lipidů je též patrná u místa styku lipidů s RNA, tedy u terminálních bází. Toto chování ionizovatelných lipidů je zapříčiněno jejich kladně nabitým dusíkem, který je v kontaktu se záporně nabitou RNA.

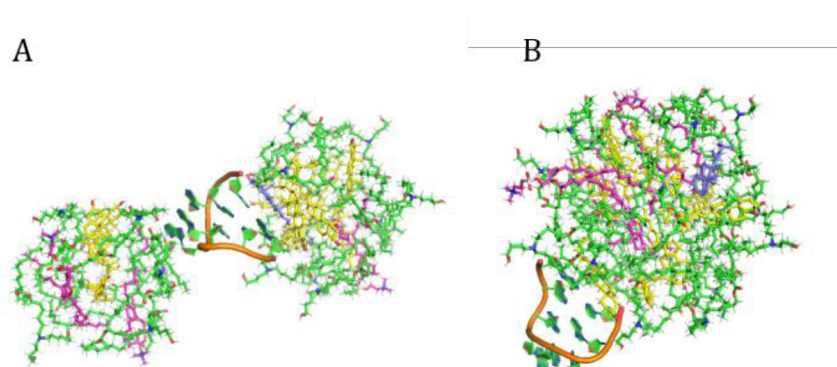
Při bližším popisu systému 1A (Obrázek 22. 1A) na začátku simulace, docházelo k rozdělení lipidů, kdy se jejich znatelně menší množství vyskytovalo u terminálních bází a zbylé lipidy u volných bází. Kolem 150 ns se však celý systém lipidů spojil a stejně jako v předchozích menších systémech zůstal u terminálních bází (Obrázek 24).



Obrázek 24 Popisovaný systém 1A (Obrázek 22) obsahující 30 lipidů. A) Struktura kolem 150 ns simulace, kdy jsou lipidy nerovnoměrně rozmístěné ve dvou shlucích kolem RNA. B) Systém po sjednocení shluků lipidů, tedy kolem 200 ns, kdy došlo k seskupení lipidů u terminálních bází.

U systému 2B (Obrázek 22. 2B) došlo ke konečnému seskupení lipidů do jednoho shluku až v průběhu 800 ns. Do té doby byly lipidy rozděleny na dva velké komplexy, kdy jeden se uchytil u terminálních bází a druhý u volných bází (Obrázek 25). Částečně šla vidět snaha o spojení těchto shluků v jeden kompaktní celek, která by mohla vést k obalení celé molekuly RNA. K tomu však nedošlo a oba komplexy se chovaly nezávisle na sobě u příslušných bází. Poté došlo k jejich sjednocení u terminálních bází, jak bylo zmíněno již výše. V rámci uspořádání uvnitř shluku

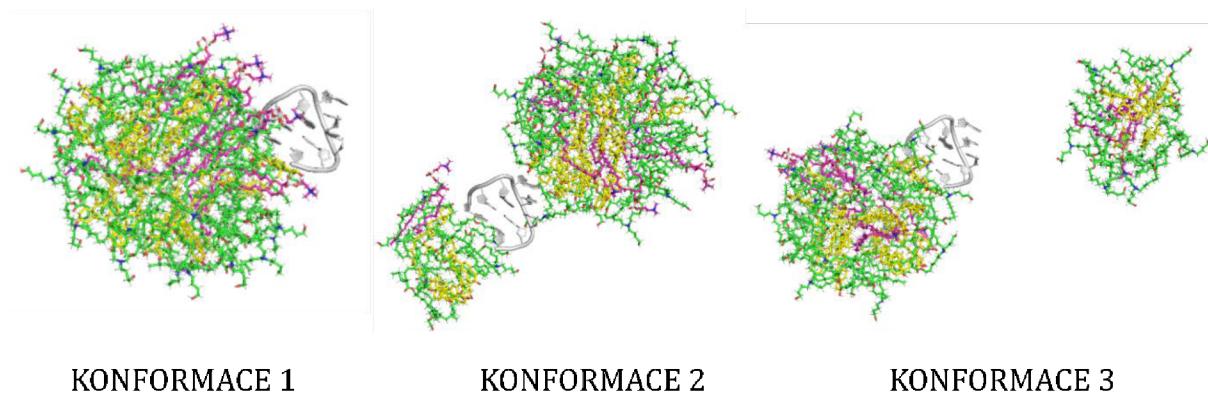
lipidů si lze povšimnout, že se u terminálních bází vyskytuje cholesterol, ovšem v jeho blízkém okolí se vyskytují primárně pouze hydrofobní konce ionizovatelných lipidů (Obrázek 22. 2B).



Obrázek 25 Systém 2B (Obrázek 22) obsahující 30 lipidů. **Panel A** ukazuje uspořádání struktury, která se, ač na svůj dlouhotrvající výskyt, nestala finálním uspořádáním tohoto systému. Na obrázku je též znatelná snaha o spojení dvou shluků lipidů. Modře znázorněnou strukturou je jeden z cholesterolů, na které bylo názorně ukázáno k jak rozsáhlým přeskupováním lipidů v průběhu simulace dochází. **Panel B** ukazuje finální konformaci systému, kdy i zde je zvýrazněný modrý cholesterol (stejný jako v bloku A), který se nachází až ve svrchní části shluku lipidů, tedy za zhruba 600 ns dokázal postupně projít celým seskupením lipidů od pozice u terminálních bází až na okraj tohoto seskupení.

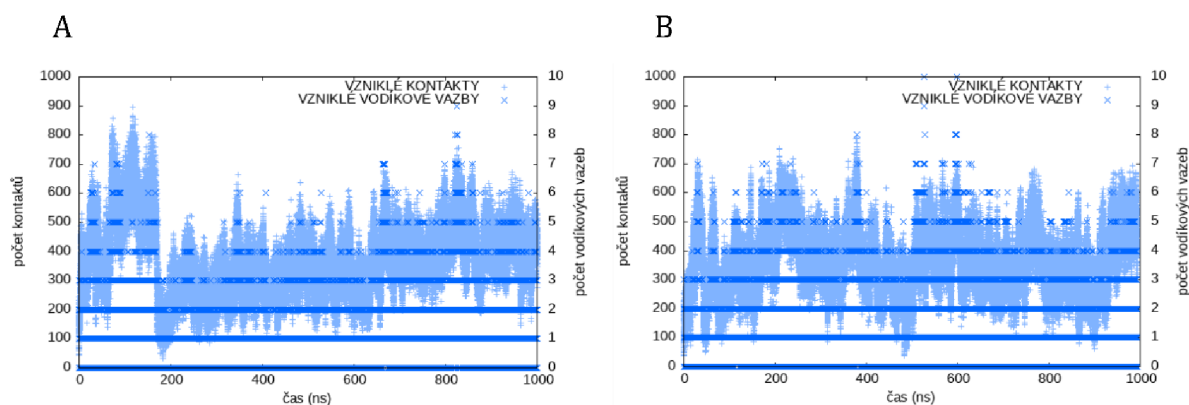
Systém 3C (podobně jako systém 1A na začátku simulace) obsahoval dva shluky lipidů, kdy převaha lipidů byla u terminálních bází, tedy opačně v porovnání se systémem 1A. Současně se však tyto dva systémy shodují v čase, kdy došlo ke sjednocení lipidů, tedy kolem 150 ns.

Pro systém s 60 lipidy byla připravena pětice simulací s procentuálním zastoupením podle Tabulka 2. Z důvodu vysoké výpočetní náročnosti těchto systémů byly simulace počítány pomocí infrastruktury IT4I národního superpočítačového centra v Ostravě. Výsledky simulací lze rozdělit do tří konečných konformací (dále označovány jako KONFORMACE 1, KONFORMACE 2 a KONFORMACE 3). KONFORMACE 1 je finálním stavem dvou simulací, kdy došlo k seskupení všech lipidů u terminálních bází (dále tyto simulace budou označovány jako systém A a B). KONFORMACE 2 se také jako finální stav objevila u dvou simulací a obsahovala dva shluky lipidů, kdy jeden obklopoval terminální báze a druhý se vyskytoval u volných bází smyčky (dále budou tyto simulace označovány jako systémy C a D). KONFORMACE 3 se vyskytla pouze u jedné simulace (dále označena jako systém E), kdy se část lipidů uchytila u terminálních bází a část se volně pohybovala simulačním boxem. Přehledněji jsou výsledky shrnuty v Tabulka 3 a vizuálně též prezentovány v Obrázek 26.



Obrázek 26 Konečné uspořádání simulací s 60 lipidy označené jako KONFORMACE 1-3, kde jsou skupiny lipidů barevně rozlišeny – ionizovatelné lipidy ALC-0315 (zeleně), fosfolipidy DSPC (růžově) a cholesteroly (žlutě).

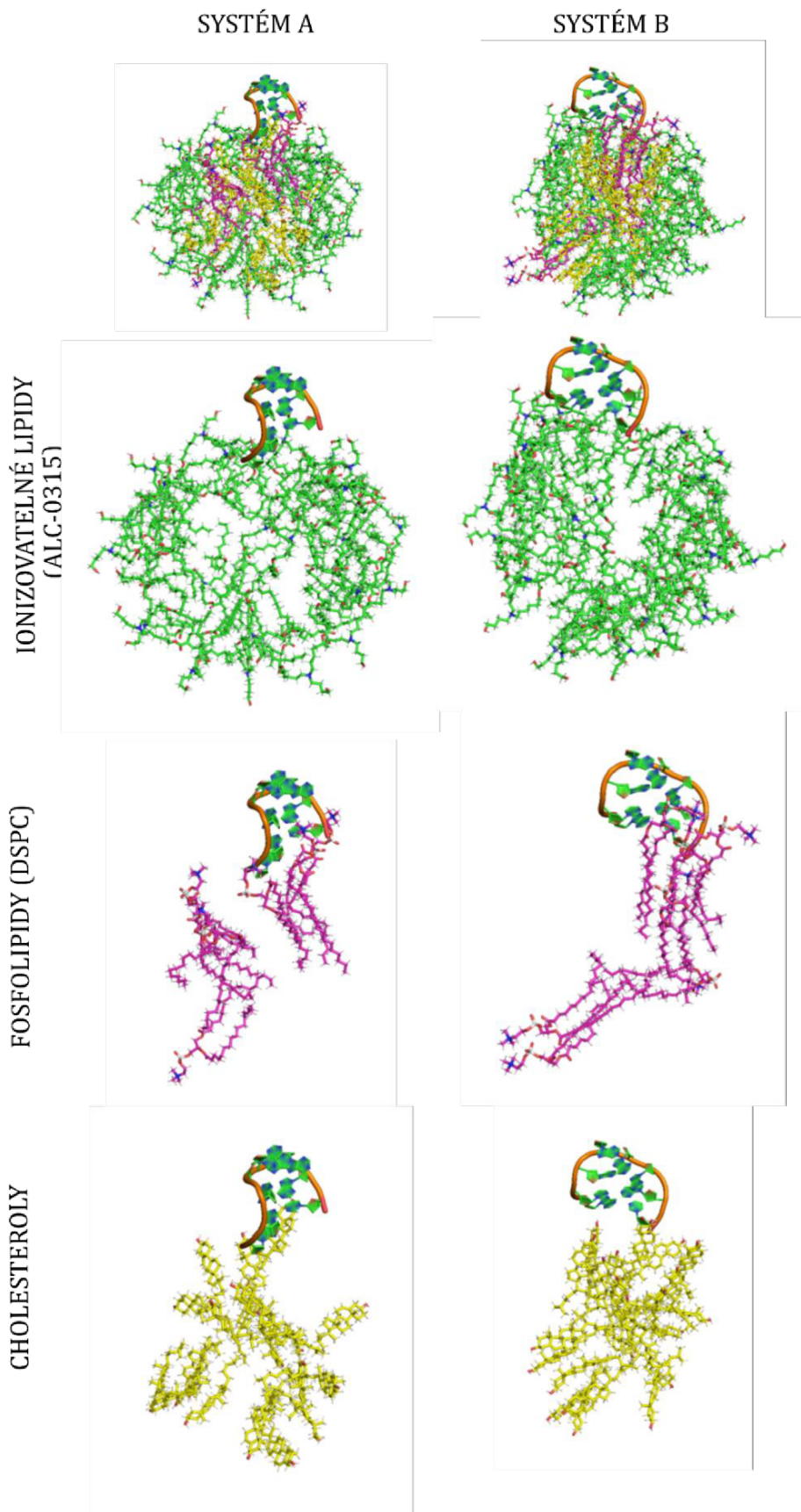
V případě KONFORMACE 1 lze vidět z počtu vzniklých kontaktů (Obrázek 27, příslušné simulace označeny jako systémy A a B), že lipidy se v okolí molekuly RNA vyskytovaly po celou dobu simulace, což bylo způsobeno i jejich vysokým zastoupením v simulačním boxu. V obou systémech došlo k tvorbě až osmi vodíkových vazeb. V případě systému A (Obrázek 27) je patrný vysoký počet kontaktů kolem 100 ns, který byl způsobený uskupením téměř poloviny lipidů u volných bází. Ostatní lipidy mezitím vytvářely malé shluky a pohybovaly se volně simulačním boxem. Podobně tomu bylo i v případě systému B (Obrázek 27). Avšak žádná interakce případného velkého seskupení lipidů s RNA nebyla dostatečně stabilní a uskupení lipidů molekulu RNA spíše míjelo na své cestě boxem. U simulace A je možné vidět mírný pokles kontaktů okolo 200 ns. Tento pokles byl způsobem vznikem lipidových seskupení. Kolem molekuly RNA se tedy už nevyskytovaly samostatné molekuly lipidů, ale došlo ke vzniku tří shluků lipidů – jeden velký (přibližně 48 lipidů) a dva malé. Velký shluk se uchytil u volných bází, jeden z menších shluků u terminálních bází a poslední shluk se pouze pohyboval boxem. Uskupení shluků se neustále promíchávalo a přeskupovalo, kdy nakonec nejvíce preferované bylo uskupení velkého shluku u terminálních bází, ke kterému se postupně připojily i ostatní lipidy a vznikl tak jeden velký kompaktní celek všech lipidů, což se stalo až na konci simulačního času, tj. v jedné mikrosekundě. V případě systému B (Obrázek 27) došlo již kolem 300 ns ke sjednocení všech lipidů u terminálního páru bází, které bylo stabilní až do konce simulačního času.



KONFORMACE 1

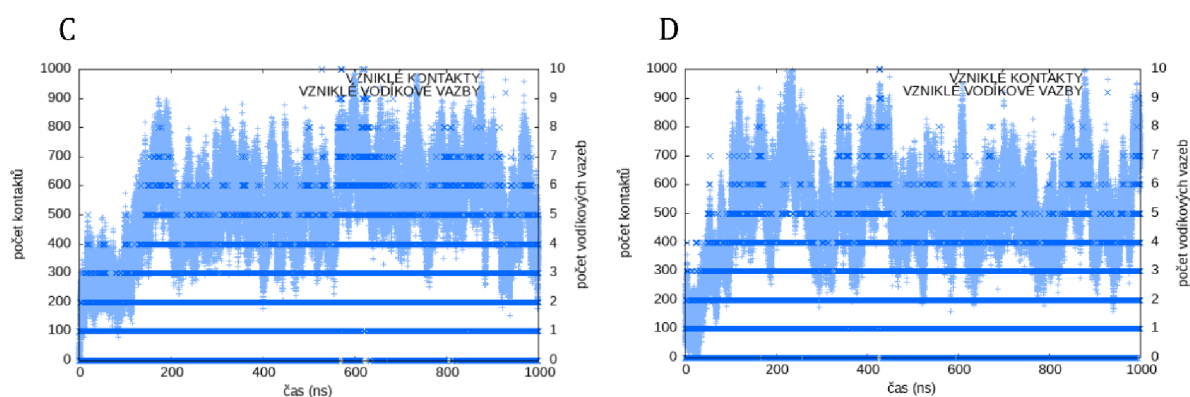
Obrázek 27 Grafy tvorby kontaktů a vodíkových vazeb, popisující chování KONFORMACE 1, která byla v simulovaných systémech dominantní u dvou systémů A a B. Počet nově vzniklých kontaktů je zobrazen pomocí světle modrých symbolů (+), zatímco vzniklé vodíkové vazby jsou značeny tmavě-modrým symbolem (x).

Pro lepší popis uskupení lipidů byly lipidy rozděleny podle svého druhu do tří skupin a zobrazeny samostatně (Obrázek 28). Můžeme vidět, že v případě **ionizovatelných lipidů** ALC-0315 dochází k vytváření obalu, tedy tyto lipidy se vyskytují primárně na povrchu celého lipidového seskupení. Jsou orientovány polárními částmi směrem ven, a je jim tedy umožněna interakce nejen s vodním prostředím, ale také s molekulou RNA. Ač ionizovatelné lipidy obsahují protonizovaný terciální amin, nebyla zde pozorována změna hustoty výskytů chloridových aniontů v okolí lipidového shluku. V uskupení **cholesterolů** je patrná orientace jejich hydroxylových skupin směrem ven do vodného prostředí, tedy dochází k dalším hydrofilním interakcím, v tomto případě hydroxylové skupiny s molekulami vody. Molekuly cholesterolů jsou rovnoměrně rozloženy v celém shluku lipidů a jejich struktury se mírně dotýkají ve středu celého shluku lipidů. **Fosfolipidy** jsou zastoupeny málo a vytvářejí uspořádaný stav prostřednictvím vzájemně rovnoběžných uhlovodíkových řetězců. Můžeme vidět, že dochází k vytváření fosfolipidových zón, ve kterých jsou tyto lipidy nahromaděny. Stále však dochází k zachování jejich orientace, kdy hydrofilní polární hlavové části směřují směrem ven, zatímco hydrofobní uhlovodíkové řetězce jsou zasunuty do shluku lipidů.



Obrázek 28 Vizualní zobrazení 3D struktur konečného uspořádání simulovaných systémů - KONFORMACE 1 (systém A a B). Barevně jsou rozlišeny ionizovatelné lipidy ALC-0315 (zelené), fosfolipidy DSPC (ružové) a cholesteroly (žluté).

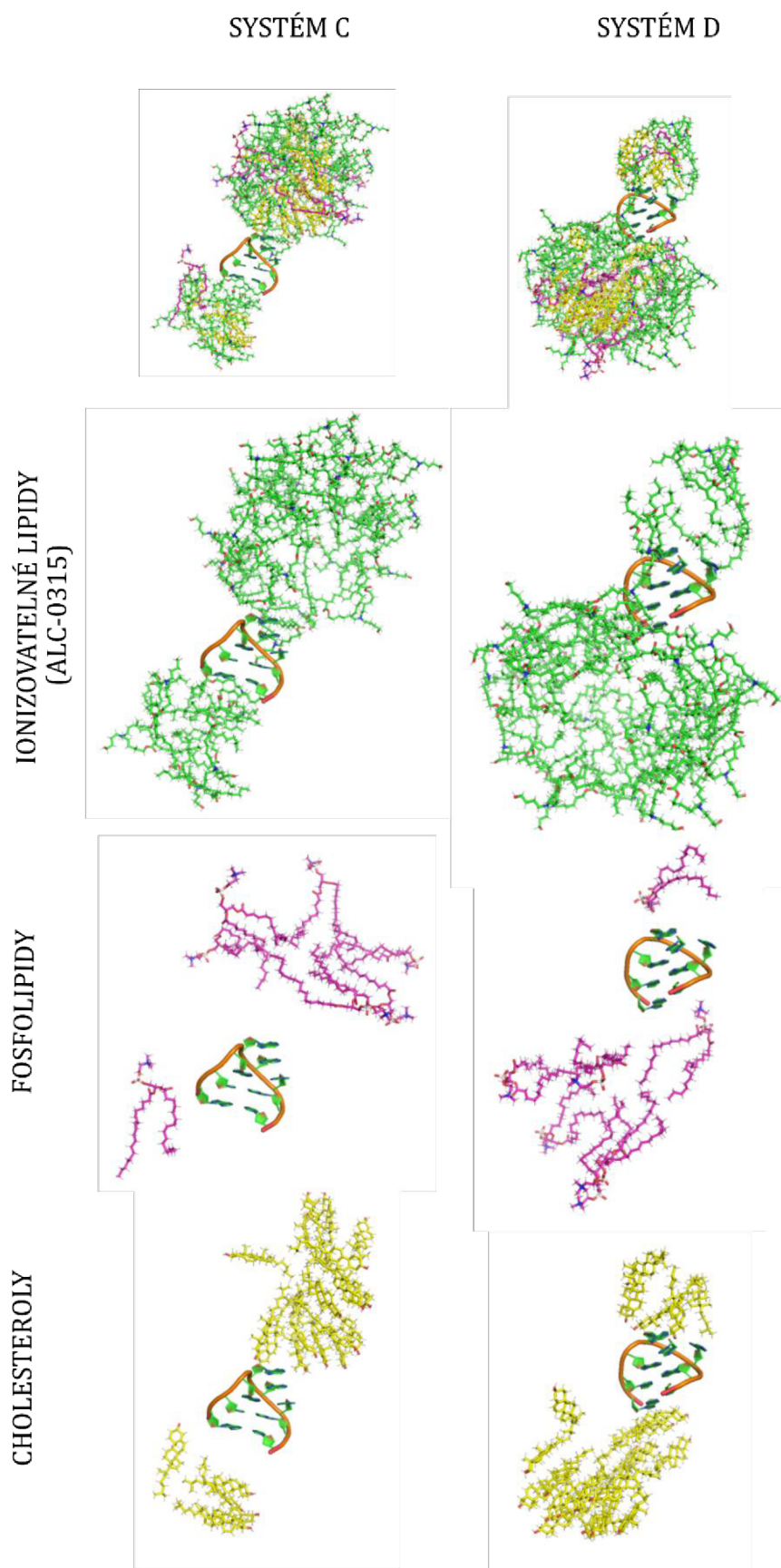
KONFORMACE 2, zahrnuje konečné uspořádání systémů (dále označované jako systém C a D), kdy jsou lipidy ve dvou shlucích na terminálních a volných bázích. Průběh těchto simulací lze vidět na níže uvedených grafech (Obrázek 29). V případě simulace systému C byl výrazný nárůst kontaktů v době kolem 200 ns způsoben snahou o spojení obou lipidových shluků, a tedy obklopení molekuly RNA. To zapříčinilo, že se lipidy vyskytovaly i u reziduí 2 a 7, tedy jinak lipidy neobklopených reziduí RNA molekuly. K tomuto chování docházelo v průběhu simulace vícekrát, což je viditelné i na grafu, kde znatelnější nárůst kontaktů značí snahu o obklopení RNA. Rozmístění lipidů u volných a terminálních bází se jeví jako metastabilní, a přestože přetrvává až do konce simulace (1 mikrosekundy), pravděpodobně by po prodloužení simulace došlo k seskupení obou shluků do jednoho u terminálních bází RNA. V případě simulace systému D vidíme na začátku pozvolný nárůst kontaktů, způsobený postupným sjednocováním lipidů do dvou shluků a jejich kontaktu s RNA. Ačkoliv dle grafů by se zdálo, že se systémy C a D chovají stejně, není tomu tak. V případě simulace systému D se vyšší počet lipidů vyskytuje u terminálních bází, kdežto v případě simulace systému C je vyšší výskyt u volných bází. Nicméně stejně jako u systému C, v případě systému D, lze vidět v grafu počtu kontaktů, že systém vykazuje snahu o obalení molekuly RNA a konečnému vytvoření lipidové nanočástice. U systému D také docházelo k dlouhodobému rozložení lipidů u terminálních a volných bází (kolem 800 ns – od 200 ns do konce simulačního času), ale opět lze usuzovat, že tato konformace je metastabilní a při prodloužení simulace by došlo ke splynutí obou shluků do jednoho, jako jsme pozorovali u simulací s menším počtem lipidů.



KONFORMACE 2

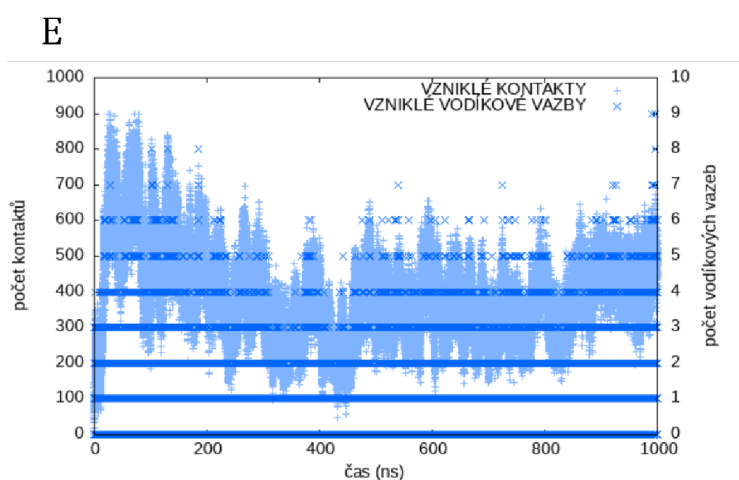
Obrázek 29 Grafy počtu kontaktů a vodíkových vazeb popisující chování systémů C (graf vlevo) a D (graf vpravo), které se vyskytovaly v KONFORMACI 2. Počet nově vzniklých kontaktů je zobrazen pomocí světle modrých symbolů (+), zatímco vzniklé vodíkové vazby jsou značeny tmavě-modrým symbolem (×).

Při bližším pohledu na rozvrstvení lipidů je zde patrná organizovanost stejně jako v předchozím konečném uspořádání KONFORMACE 1 (Obrázek 30). Ionizovatelné lipidy ALC-0315 opět tvoří vnější obal celého lipidového komplexu. Více znatelný je u větších shluků lipidů, nicméně i u nižšího počtu lipidů ve shluku je patrná snaha o organizovanost. V případě cholesterolu opět dochází k rozmístění jeho molekul po celém shluku a k vystrčení hydroxylových skupin směrem ven ze shluku. Cholesteroly jsou zde vzájemně více přiblíženy a dochází k jejich vrstvení a rozmístění do všech stran. Fosfolipidy DSPC jsou situovány na základě jejich amfifilních vlastností, tedy hydrofilní část směrem ven a hydrofobní část směrem dovnitř. Z důvodu jejich nízkého zastoupení nedochází ke vzniku složitějších či kompaktnějších struktur.



Obrázek 30 Konečné uspořádání systémů – KONFORMACE 2 (systém C a D), kdy jsou barevně rozlišeny na ionizovatelné lipidy ALC-0315 (zelené), fosfolipidy DSPC (růžové) a cholesteroly (žluté).

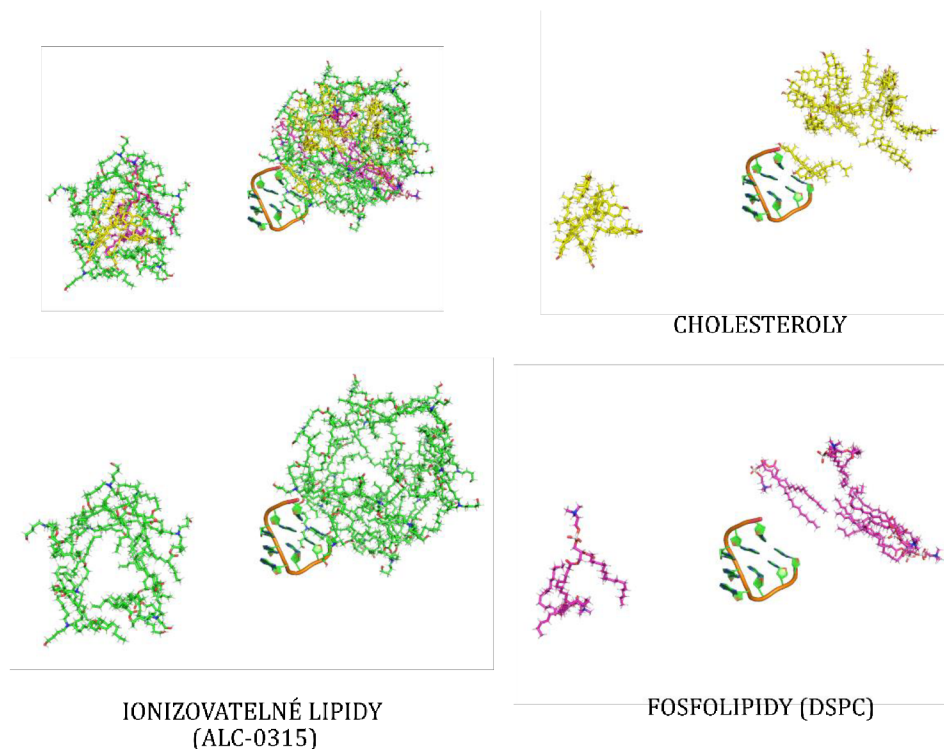
V případě KONFORMACE 3 docházelo k neustálému přeuspořádání systému a přeskupování shluků lipidů jak v rámci druhu lipidů, tak i počtem lipidů. Počáteční úbytek kontaktů byl způsoben vysokým množstvím lipidových shluků, který se postupně snižoval, protože docházelo k jejich postupnému agregování ve větší celky. V době kolem 400 ns se v simulovaném systému vyskytovaly pouze dva velké shluky lipidů, kdy jeden byl po celou další dobu navázán u terminálních bází, zatímco druhý se volně pohyboval simulačním boxem. Ačkoli spolu oba shluky lipidů vzájemně interagovaly, nedošlo k jejich definitivní asociaci či k uchycení druhého shluku u volných bází RNA molekuly.



KONFORMACE 3

Obrázek 31 Graf tvorby kontaktů a vodíkových vazeb, hodnotící chování KONFORMACE 3, který byl v simulovaných systémech zastoupen jedním systémem E. Počet nově vzniklých kontaktů je zobrazen pomocí světle modrých symbolů (+), zatímco vzniklé vodíkové vazby jsou značeny tmavě-modrým symbolem (x).

Při bližším studování systému E bylo rozpoznáno stejné uspořádání lipidů jako v ostatních 60 lipidových systémech (Obrázek 32). Tedy i v této simulaci došlo k rozvrstvení ionizovatelných lipidů ALC-0315 tak, že tvořily vnější vrstvu pro všechny ostatní lipidy. Jejich nabitě části (protonovaný terciální amin) směřují směrem do vodného prostředí, aby byla umožněna interakce s ionty, solvatačním prostředím a též s molekulou RNA. Cholesteroly jsou opět rovnoměrně rozmístěny ve shluku, směřovány hydroxylovými skupinami směrem ven. Fosfolipidy DSPC zde částečně vytvářejí strukturu fosfolipidové dvojvrstvy na základě jejich amfifilní struktury.

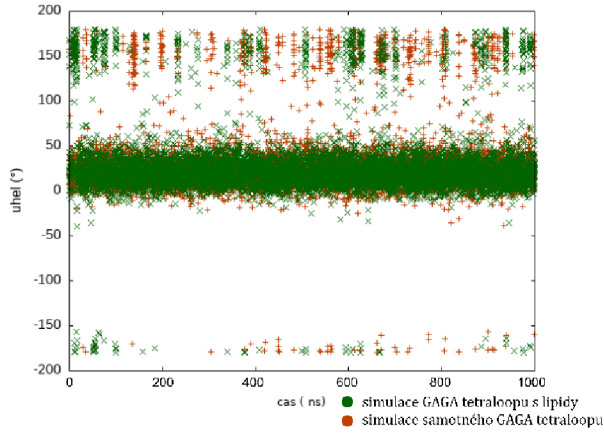
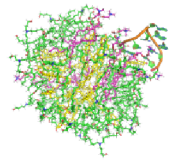


Obrázek 32 Vizualní zobrazení 3D struktur konečného uspořádání KONFORMACE 3 (systém E), kdy jsou barevně rozlišeny na ionizovatelné lipidy ALC-0315 (zelené), fosfolipidy DSPC (růžové) a cholesteroly (žluté).

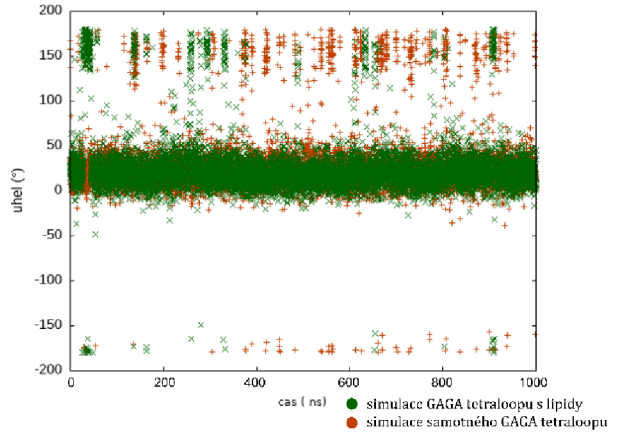
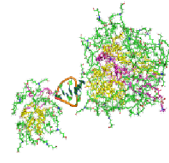
Ve všech případech simulací s 60 lipidy nedocházelo ke ztelnějšímu výskytu chloridových iontů u ionizovatelných lipidů ALC-0315. Naopak byla pozorována zvýšená hustota výskytu draselných iontů v okolí páteře RNA, která díky fosfátům nese záporný náboj. Dále také stejně jako u simulace s 30 lipidy, lipidy nemají vliv na samostatnou RNA a pomocí analýzy změn konformací cukrů, torzních úhlů a helikálních parametrů všech RNA reziduí, lze vidět, že nedochází k významným změnám při porovnání se simulací samotné GAGA smyčky (Obrázek 33).

Závěrem, v případě systémů obsahujících 60 lipidů docházelo k primární interakci s terminálním párem bází GAGA tetraloopu, což představovalo finální konformaci pro dva z pěti simulovaných systémů (KONFORMACE 1). Navázání shluku lipidů u volných bází lze považovat za metastabilní stav, který by se pravděpodobně po dostatečně dlouhé simulační době sloučil se shlukem u terminálních bází (v KONFORMACI 2). Stejně tak v případě KONFORMACE 3 lze očekávat, že dojde k asociaci dvou shluků lipidů v jeden, a to hned ze dvou důvodů. Prvním důvodem je fakt, že tento stav byl přítomen i v systému A, kdy až na konci simulačního času došlo ke spojení obou lipidových shluků (Obrázek 27). Druhým důvodem je znalost tohoto procesu konečného splynutí v jeden celek z menších simulačních systémů o jednom druhu lipidu, kdy též docházelo k seskupení všech lipidů u terminálního páru bází.

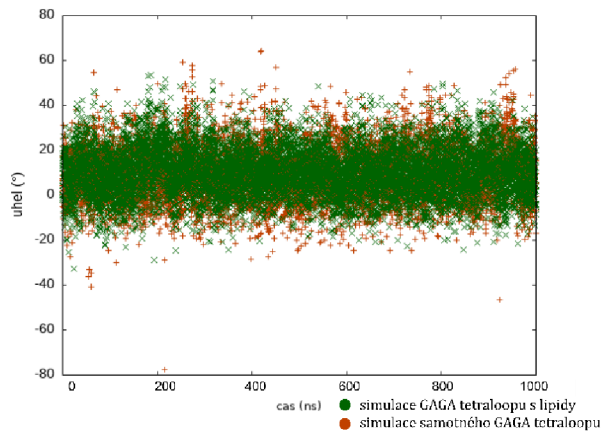
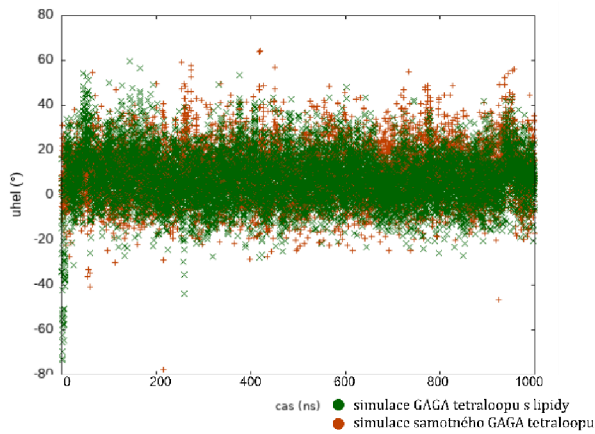
KONFORMACE 1



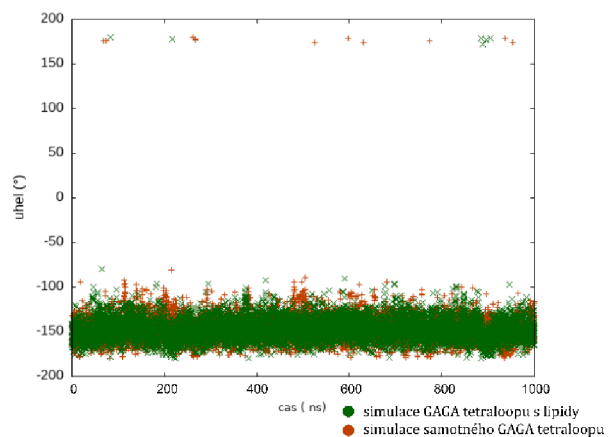
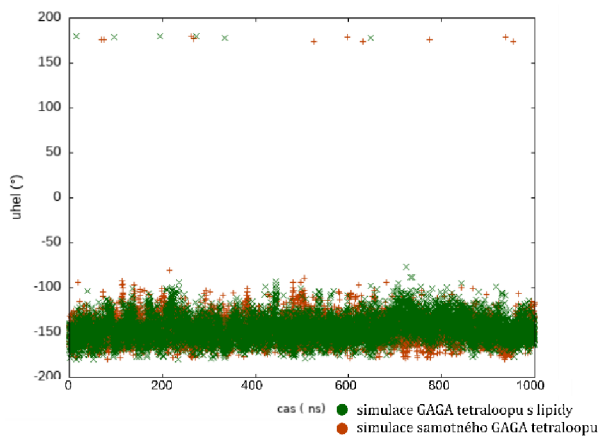
KONFORMACE 2



konformace cukru na 8. reziduu v průběhu simulace



helikální parametr popisující chování pohybu páru vůči sobě (inklinace)



torzní úhel epsilon 3. rezidua

Obrázek 33 Porovnání zástupců KONFORMACE 1 a 2. Byly vybrány zástupci grafů popisující změny torzních úhlů, konformací cukru a helikálních parametrů. Zelené hodnoty definují chování systému obsahující GAGA tetraloop i lipidy, oranžové hodnoty značí chování systému samotného GAGA tetraloopu.

4 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce se věnovala MD simulacím RNA smyčky s různými zástupci z řad lipidů. Jako zástupce RNA byla vybrána GNRA smyčka (GAGA tetraloop). Smyčka je i přes malý počet reziduí ve vlákně schopná vstupovat do interakcí, které se objevují u velkých RNA systémů, a zároveň její malá velikost umožňuje její výpočet. Z řad lipidů bylo vybráno pět zástupců, tedy dva zástupci ionizovatelných lipidů a stejně tak fosfolipidů a jednoho zástupce sterolů. U ionizovatelných lipidů se jednalo o zástupce ALC-0315 a SM-102, fosfolipidy byly zastoupeny molekulami DSPC a DSPE, a konečně zástupce sterolů, cholesterol. Systémy byly připravovány nejdříve v menších počtech po jednom druhu lipidů (5, 10 a 20 lipidů), v návaznosti byly dále vytvořeny systémy lipidů napodobující procentuální zastoupení v lipidových nanočásticích společnosti Pfizer. Tyto systémy byly připraveny v počtu 30 a 60 lipidů. Malé systémy obsahující jeden druh lipidu, vytvářely nejčastěji interakci s terminálními bázemi GAGA tetraloopu. Vliv interakce RNA s lipidy byl zkoumán pomocí analýz torzních úhlů, konformací cukrů pro všech osm reziduí a dále také pomocí helikálních parametrů. Ve všech případech lze říci, že lipidy zásadně neovlivňovaly svojí přítomností molekulu RNA a docházelo jen k minimálním změnám v místě interakcí lipidů s RNA. U větších systémů byla patrná snaha o vytvoření lipidové nanočástice, nicméně k obalení RNA lipidy bohužel nedošlo ani u systému obsahujícího 60 lipidů. Lipidy v těchto větších systémech každopádně vykazovaly viditelné tendence k systematickému uspořádávání, ionizovatelné lipidy na povrchu a cholesterol společně s DSPC uvnitř lipidového shluku. Tyto výsledky vedly k rozšíření systémů až na komplex obsahující 200 lipidů, jehož výpočetní náročnost jej již nedovolila zahrnout do této práce a bude součástí dalšího studia. U takového systému lze předpokládat obalení RNA a tím vytvoření malé lipidové nanočástice.

Závěrem lze konstatovat, že lipidy preferují uskupení u terminálního páru bází. Tento závěr se nám potvrdil takřka bez výjimek v případě malých systémů obsahující pouze jeden druh lipidu, a i v případě lipidové směsi s 30 lipidy. V případě složitějších systémů můžeme u 60 lipidových systémů předpokládat, že ačkoliv ne ve všech případech byly terminální báze výsledným místem interakcí lipidů s RNA, tento stav je preferovaný a ostatní pozorovaná uspořádání jsou pouze metastabilní uskupení, které by při prodloužení simulačního času dospěly do stejné konformace.

5 SUMMARY

This bachelor thesis was focused on the MD simulation of RNA tetraloop with different lipid representatives. As RNA molecule, only GNRA loop (more specifically GAGA tetraloop) was chosen. This small molecule is an ideal testing system due to its low computational complexity. We also used five representatives of lipids – two ionizable lipids (ALC-0315 and SM-102), two phospholipids (DSPC and DSPE) and cholesterol. The system was first prepared in smaller numbers of one lipid species (in numbers of 5, 10 and 20) and then prepared to mimic the percentage representation in LNPs. These systems were prepared in numbers of 30 and 60 lipids. Small systems containing one lipid species produced the most interactions with the terminal bases of the GAGA tetraloop. Whether the RNA structure was affected by these interactions was analysed using RNA torsion angle analyses, sugar conformations for all residues, and also base-pair helical parameters. In all cases, the presence of lipids did not significantly affect the RNA molecule. The larger systems, containing 60 lipids, didn't encapsulate the RNA molecule. These results led to future extension of the work to prepare systems containing 200 lipids.

The conclusion is that the lipids cluster preferentially around the terminal base pair. This conclusion was observed for small systems containing only one type of lipid. In the case of more complex systems, we can see that for 60 lipid systems, although not in all cases the lipids cluster near the terminal bases was the final state of lipid-RNA complex, this state can be considered as final state, and the others are only metastable clusters that would reach the same conformation if the simulation time were extended.

POUŽITÉ ZDROJE

- [1] J. Viger-Gravel, A. Schantz, A. C. Pinon, A. J. Rossini, S. Schantz, a L. Emsley, „Structure of Lipid Nanoparticles Containing siRNA or mRNA by Dynamic Nuclear Polarization-Enhanced NMR Spectroscopy”, *J. Phys. Chem. B*, roč. 122, č. 7, s. 2073–2081, úno. 2018, doi: 10.1021/acs.jpcc.7b10795.
- [2] P. Phyto, X. Zhao, A. C. Templeton, W. Xu, J. K. Cheung, a Y. Su, „Understanding molecular mechanisms of biologics drug delivery and stability from NMR spectroscopy”, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, roč. 174, s. 1–29, čvc. 2021, doi: 10.1016/j.addr.2021.02.007.
- [3] S. Mao *et al.*, „A highly efficient needle-free-injection delivery system for mRNA-LNP vaccination against SARS-CoV-2”, *Nano Today*, roč. 48, s. 101730, úno. 2023, doi: 10.1016/j.nantod.2022.101730.
- [4] A. K. K. Leung *et al.*, „Lipid Nanoparticles Containing siRNA Synthesized by Microfluidic Mixing Exhibit an Electron-Dense Nanostructured Core”, *J. Phys. Chem. C*, roč. 116, č. 34, s. 18440–18450, srp. 2012, doi: 10.1021/jp303267y.
- [5] M. F. W. Trollmann a R. A. Böckmann, „mRNA lipid nanoparticle phase transition”, *Biophys. J.*, roč. 121, č. 20, s. 3927–3939, říj. 2022, doi: 10.1016/j.bpj.2022.08.037.
- [6] X. F. Fernandez-Luengo, J. Camacho, a J. Faraudo, „Computer Simulations of Lipid Nanoparticles”, *Nanomaterials*, roč. 7, č. 12, Art. č. 12, pro. 2017, doi: 10.3390/nano7120461.
- [7] S. Park, Y. K. Choi, S. Kim, J. Lee, a W. Im, „CHARMM-GUI Membrane Builder for Lipid Nanoparticles with Ionizable Cationic Lipids and PEGylated Lipids”, *J. Chem. Inf. Model.*, roč. 61, č. 10, s. 5192–5202, říj. 2021, doi: 10.1021/acs.jcim.1c00770.
- [8] M. Cornebise *et al.*, „Discovery of a Novel Amino Lipid That Improves Lipid Nanoparticle Performance through Specific Interactions with mRNA”, *Adv. Funct. Mater.*, roč. 32, č. 8, s. 2106727, 2022, doi: 10.1002/adfm.202106727.
- [9] M. Paloncýová, M. Šrejber, P. Čechová, P. Kührová, F. Zaoral, a M. Otyepka, „Atomistic Insights into Organization of RNA-Loaded Lipid Nanoparticles”, *J. Phys. Chem. B*, roč. 127, č. 5, s. 1158–1166, úno. 2023, doi: 10.1021/acs.jpcc.2c07671.
- [10] N. B. Leontis, J. Stombaugh, a E. Westhof, „The non-Watson–Crick base pairs and their associated isostericity matrices”, *Nucleic Acids Res.*, roč. 30, č. 16, s. 3497–3531, srp. 2002, doi: 10.1093/nar/gkf481.
- [11] „Polynucleotide Conformations 2”.
<https://iupac.qmul.ac.uk/misc/noGreek/pnuc2.html> (viděno 23. duben 2023).
- [12] J. E. Sokoloski, S. A. Godfrey, S. E. Dombrowski, a P. C. Bevilacqua, „Prevalence of syn nucleobases in the active sites of functional RNAs”, *RNA*, roč. 17, č. 10, s. 1775–1787, led. 2011, doi: 10.1261/rna.2759911.
- [13] M. Evich, A. M. Spring-Connell, a M. W. Germann, „Impact of modified ribose sugars on nucleic acid conformation and function”, *Heterocycl. Commun.*, roč. 23, č. 3, s. 155–165, čer. 2017, doi: 10.1515/hc-2017-0056.
- [14] W. K. Olson *et al.*, „A standard reference frame for the description of nucleic acid base-pair geometry”, *J. Mol. Biol.*, roč. 313, č. 1, s. 229–237, říj. 2001, doi: 10.1006/jmbi.2001.4987.

- [15] X.-J. Lu a W. K. Olson, „3DNA: a software package for the analysis, rebuilding and visualization of three-dimensional nucleic acid structures", *Nucleic Acids Res.*, roč. 31, č. 17, s. 5108–5121, zář. 2003, doi: 10.1093/nar/gkg680.
- [16] J. Singh, J. Hanson, K. Paliwal, a Y. Zhou, „RNA secondary structure prediction using an ensemble of two-dimensional deep neural networks and transfer learning", *Nat. Commun.*, roč. 10, č. 1, Art. č. 1, lis. 2019, doi: 10.1038/s41467-019-13395-9.
- [17] M. Zuker a D. Sankoff, „RNA secondary structures and their prediction", *Bull. Math. Biol.*, roč. 46, č. 4, s. 591–621, čvc. 1984, doi: 10.1007/BF02459506.
- [18] J. Spirollari, J. Wang, K. Zhang, V. Bellofatto, Y. Park, a B. Shapiro, „Predicting Consensus Structures for RNA Alignments Via Pseudo-Energy Minimization", *Bioinforma. Biol. Insights*, roč. 3, s. 51–69, čer. 2009, doi: 10.4137/BBI.S2578.
- [19] S. Bottaro a K. Lindorff-Larsen, „Mapping the Universe of RNA Tetraloop Folds", *Biophys. J.*, roč. 113, č. 2, s. 257–267, čvc. 2017, doi: 10.1016/j.bpj.2017.06.011.
- [20] S. E. Butcher a A. M. Pyle, „The Molecular Interactions That Stabilize RNA Tertiary Structure: RNA Motifs, Patterns, and Networks", *Acc. Chem. Res.*, roč. 44, č. 12, s. 1302–1311, pro. 2011, doi: 10.1021/ar200098t.
- [21] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, a P. Walter, „The Lipid Bilayer", *Mol. Biol. Cell 4th Ed.*, 2002, Viděno: 13. únor 2023. [Online]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26871/>
- [22] A. Benedetto a E. G. Kelley, „Absorption of the [bmim][Cl] Ionic Liquid in DMPC Lipid Bilayers across Their Gel, Ripple, and Fluid Phases", *J. Phys. Chem. B*, roč. 126, č. 17, s. 3309–3318, kvě. 2022, doi: 10.1021/acs.jpcc.2c00710.
- [23] O. G. Mouritsen, „Lipids, curvature, and nano-medicine", *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, roč. 113, č. 10, s. 1174–1187, 2011, doi: 10.1002/ejlt.201100050.
- [24] J. Jouhet, „Importance of the hexagonal lipid phase in biological membrane organization", *Front. Plant Sci.*, roč. 4, 2013, Viděno: 21. duben 2023. [Online]. Dostupné z: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2013.00494>
- [25] G. van Meer, D. R. Voelker, a G. W. Feigenson, „Membrane lipids: where they are and how they behave", *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, roč. 9, č. 2, Art. č. 2, úno. 2008, doi: 10.1038/nrm2330.
- [26] O. Lenz a F. Schmid, „Structure of Symmetric and Asymmetric “Ripple” Phases in Lipid Bilayers", *Phys. Rev. Lett.*, roč. 98, č. 5, s. 058104, led. 2007, doi: 10.1103/PhysRevLett.98.058104.
- [27] P. L. Yeagle, „Chapter 2 - The Lipids of Biological Membranes", in *The Membranes of Cells (Third Edition)*, P. L. Yeagle, Ed., Boston: Academic Press, 2016, s. 27–56. doi: 10.1016/B978-0-12-800047-2.00002-4.
- [28] S.-S. Qin, Z.-W. Yu, a Y.-X. Yu, „Structural Characterization on the Gel to Liquid-Crystal Phase Transition of Fully Hydrated DSPC and DSPE Bilayers", *J. Phys. Chem. B*, roč. 113, č. 23, s. 8114–8123, čer. 2009, doi: 10.1021/jp808779r.
- [29] A. M. Jörgensen, R. Wibel, a A. Bernkop-Schnürch, „Biodegradable Cationic and Ionizable Cationic Lipids: A Roadmap for Safer Pharmaceutical Excipients", *Small*, roč. n/a, č. n/a, s. 2206968, doi: 10.1002/smll.202206968.
- [30] Y. Zou *et al.*, „Structure–activity relationships of pH-responsive and ionizable lipids for gene delivery", *Int. J. Pharm.*, roč. 617, s. 121596, dub. 2022, doi: 10.1016/j.ijpharm.2022.121596.
- [31] M. Paloncýová, P. Čechová, M. Šrejber, P. Kührová, a M. Otyepka, „Role of Ionizable Lipids in SARS-CoV-2 Vaccines As Revealed by Molecular Dynamics Simulations: From Membrane Structure to Interaction with mRNA Fragments",

- J. Phys. Chem. Lett.*, roč. 12, č. 45, s. 11199–11205, lis. 2021, doi: 10.1021/acs.jpcllett.1c03109.
- [32] X. Hou, T. Zaks, R. Langer, a Y. Dong, „Lipid nanoparticles for mRNA delivery", *Nat. Rev. Mater.*, roč. 6, č. 12, Art. č. 12, pro. 2021, doi: 10.1038/s41578-021-00358-0.
- [33] L. Taina-González a M. de la Fuente, „The Potential of Nanomedicine to Unlock the Limitless Applications of mRNA", *Pharmaceutics*, roč. 14, č. 2, Art. č. 2, úno. 2022, doi: 10.3390/pharmaceutics14020460.
- [34] A. Kessel, N. Ben-Tal, a S. May, „Interactions of Cholesterol with Lipid Bilayers: The Preferred Configuration and Fluctuations", *Biophys. J.*, roč. 81, č. 2, s. 643–658, srp. 2001, doi: 10.1016/S0006-3495(01)75729-3.
- [35] Z. Li *et al.*, „Enzyme-Catalyzed One-Step Synthesis of Ionizable Cationic Lipids for Lipid Nanoparticle-Based mRNA COVID-19 Vaccines", *ACS Nano*, roč. 16, č. 11, s. 18936–18950, lis. 2022, doi: 10.1021/acsnano.2c07822.
- [36] S. A. Hollingsworth a R. O. Dror, „Molecular Dynamics Simulation for All", *Neuron*, roč. 99, č. 6, s. 1129–1143, zář. 2018, doi: 10.1016/j.neuron.2018.08.011.
- [37] M. A. González, „Force fields and molecular dynamics simulations", *Éc. Thématique Société Fr. Neutron.*, roč. 12, s. 169–200, 2011, doi: 10.1051/sfn/201112009.
- [38] Case, D. A. B., R. M.; Cerutti, D. S.; Cheatham, T. E.; Darden, T. A.; Duke, R. E.; Giese, T. J.; Gohlke, H.; Goetz, A. W.; Homeyer, N., et al., „Amber 2016".
- [39] „D.A. Case, H.M. Aktulga, K. Belfon, I.Y. Ben-Shalom, S.R. Brozell, D.S. Cerutti, T.E. Cheatham, III, G.A. Cisneros, V.W.D. Cruzeiro, T.A. Darden, R.E. Duke, G. Giambasu, M.K. Gilson, H. Gohlke, A.W. Goetz, R. Harris, S. Izadi, S.A. Izmailov, C. Jin, K. Kasavajhala, M.C. Kaymak, E. King, A. Kovalenko, T. Kurtzman, T.S. Lee, S. LeGrand, P. Li, C. Lin, J. Liu, T. Luchko, R. Luo, M. Machado, V. Man, M. Manathunga, K.M. Merz, Y. Miao, O. Mikhailovskii, G. Monard, H. Nguyen, K.A. O’Hearn, A. Onufriev, F. Pan, S. Pantano, R. Qi, A. Rahnamoun, D.R. Roe, A. Roitberg, C. Sagui, S. Schott-Verdugo, J. Shen, C.L. Simmerling, N.R. Skrynnikov, J. Smith, J. Swails, R.C. Walker, J. Wang, H. Wei, R.M. Wolf, X. Wu, Y. Xue, D.M. York, S. Zhao, and P.A. Kollman (2021), Amber 2021, University of California, San Francisco."
- [40] „Refinement of the Cornell et al. Nucleic Acids Force Field Based on Reference Quantum Chemical Calculations of Glycosidic Torsion Profiles | Journal of Chemical Theory and Computation". <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ct200162x> (viděno 3. duben 2023).
- [41] J. Wang, P. Cieplak, a P. A. Kollman, „How Well Does a Restrained Electrostatic Potential (RESP) Model Perform in Calculating Conformational Energies of Organic and Biological Molecules?", *J. Comput. Chem.*, roč. 21, č. 12, s. 1049–1074, zář. 2000, doi: 10.1002/1096-987X(200009)21:12<1049::AID-JCC3>3.0.CO;2-F.
- [42] A. Pérez *et al.*, „Refinement of the AMBER force field for nucleic acids: improving the description of alpha/gamma conformers", *Biophys. J.*, roč. 92, č. 11, s. 3817–3829, čer. 2007, doi: 10.1529/biophysj.106.097782.
- [43] „Revised AMBER Parameters for Bioorganic Phosphates | Journal of Chemical Theory and Computation". <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ct300613v> (viděno 4. duben 2023).
- [44] „Case, D. A.; Cerutti, D. S.; T.E. Cheatham, I.; Darden, T. A.; Duke, R. E.; Giese, T. J.; Gohlke, H.; Goetz, A. W.; Greene, D.; Homeyer, N.; et al. AMBER 2017. University of California: San Francisco 2017."

- [45] W. Humphrey, A. Dalke, a K. Schulten, „VMD: visual molecular dynamics", *J. Mol. Graph.*, roč. 14, č. 1, s. 33–38, 27–28, úno. 1996, doi: 10.1016/0263-7855(96)00018-5.
- [46] „PyMOL | pymol.org". <https://pymol.org/2/> (viděno 4. duben 2023).
- [47] S. Izadi, R. Anandakrishnan, a A. V. Onufriev, „Building Water Models: A Different Approach", *J. Phys. Chem. Lett.*, roč. 5, č. 21, s. 3863–3871, lis. 2014, doi: 10.1021/jz501780a.
- [48] D. A. Case *et al.*, „The Amber biomolecular simulation programs", *J. Comput. Chem.*, roč. 26, č. 16, s. 1668–1688, 2005, doi: 10.1002/jcc.20290.
- [49] R. Skånberg *et al.*, *VIA-MD: Visual Interactive Analysis of Molecular Dynamics*. The Eurographics Association, 2018. doi: 10.2312/molva.20181102.
- [50] R. Skånberg, M. Falk, M. Linares, A. Ynnerman, a I. Hotz, „Tracking Internal Frames of Reference for Consistent Molecular Distribution Functions", *IEEE Trans. Vis. Comput. Graph.*, roč. 28, č. 9, s. 3126–3137, zář. 2022, doi: 10.1109/TVCG.2021.3051632.