

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální chemie



**STUDIUM 3D STRUKTURY RNA POSPIVIROIDU
METODAMI MOLEKULOVÉ DYNAMIKY**

Bakalářská práce

Vypracoval: Filip Samohýl

Obor: Chemie

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

Olomouc 2023

Převelice děkuji doc. RNDr. Petru Jurečkovi, Ph.D. za vřelou a nedocenitelnou pomoc společně s odbornými radami při vypracování mé bakalářské práce. Též velice děkuji Univerzitě Palackého v Olomouci za možnost studia. A dále Fakultě přírodovědecké, a především pak všem vyučujícím, jež se podíleli na mém studiu oboru Chemie.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci zpracoval samostatně v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb. a použil jen prameny uvedené v seznamu literatury. Pod vedením doc. RNDr. Petra Jurečky., Ph. D

Souhlasím s tím, aby má práce byla zpřístupněna v knihovně Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a v informačním systému Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne

Podpis

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

Jméno a příjmení autora: Filip Samohýl

Název práce: Studium 3D struktury RNA Pospiviroidu metodami molekulové dynamiky

Typ práce: bakalářská

Pracoviště: Katedra fyzikální chemie

Vedoucí práce: doc. RNDr. Petra Jurečka., Ph. D

Rok odevzdání práce: 2023

Anotace:

Cílem mé bakalářské práce bylo prozkoumat konformační chování RNA tetraloopu UUUC v roztoku pomocí molekulové dynamiky. Výsledky molekulově dynamických simulací budou porovnány s konformací mRNA v komplexu s histonovým proteinem získaném rentgenovou krystalografií a s dříve publikovanými NMR experimenty provedenými za různých podmínek v roztoku.

Klíčová slova: RNA, viroidy, molekulová dynamika, simulace, tetraloop UUUC, silové pole, vznik života

Počet stran: 75

Počet příloh: 3

Jazyk: čeština

BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION

Author's first name and Suriname: Filip Samohýl

Title: Study of the 3D structure of RNA Pospiviroid
by molecular dynamics methods

Type of thesis: bachelor's

Department: Department of Physical Chemistry

Supervisor: doc. RNDr. Petra Jurečka., Ph. D

The year of submission: 2023

Annotation:

The aim of my bachelor thesis was to investigate the conformational behavior of the RNA tetraloop UUUC in solution using molecular dynamics. The results of molecular dynamics simulations will be compared with the conformation of mRNA in complex with histone protein obtained by X-ray crystallography and with previously published NMR experiments performed under different conditions in solution.

Keywords: RNA, viroids, molecular dynamics, simulation,
tetraloop UUUC, force field, origin of life

Number of pages: 75

Number of appendices: 3

Language: czech

OBSAH

| | |
|--|-----------|
| BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE | 4 |
| BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION | 5 |
| OBSAH | 6 |
| POUŽITÉ ZKRATKY | 9 |
| ÚVOD | 10 |
| TEORETICKÁ ČÁST | 11 |
| 1. VZNIK ŽIVOTA..... | 11 |
| 1.1. Doklady o počátcích života..... | 11 |
| 1.2. Historie myšlenky vzniku života..... | 12 |
| 1.3. Soudobé zkoumání | 12 |
| 1.4. Metody přístupu k otázce OoL..... | 13 |
| 1.5. Výčet teorií a hypotéz | 14 |
| 1.5.1 Teorie hydrotermálních prúdů..... | 14 |
| 1.5.2 Teorie horkých pramenů..... | 15 |
| 1.5.3 Teorie panspermie..... | 15 |
| 1.5.4 Teorie RNA světa | 15 |
| 2. TEORIE RNA SVĚTA..... | 16 |
| 3. VIROIDY | 17 |
| 3.1. Popis..... | 17 |
| 3.2. Jak viroidy zapadají do teorie světa RNA..... | 19 |
| 4. RNA..... | 20 |
| 4.1. Komponenty RNA..... | 20 |
| 4.2. Typy a funkce RNA | 21 |
| 4.2.1 tRNA – transfer..... | 21 |
| 4.2.2 mRNA – messenger | 21 |

| | | |
|-----------------------------|---|-----------|
| 4.2.3 | rRNA – ribosomální..... | 21 |
| 4.3. | Struktura RNA..... | 22 |
| 4.3.1 | Torzní úhly..... | 24 |
| 4.3.2 | Úhel Chí (χ)..... | 24 |
| 5. | TETRALOOP UUUC..... | 25 |
| 6. | NMR..... | 27 |
| 7. | MOLEKULÁRNÍ DYNAMIKA..... | 29 |
| 7.1. | Historie..... | 29 |
| 7.2. | Popis..... | 29 |
| 7.3. | Silové pole AMBER..... | 30 |
| 7.3.1 | Model atomu..... | 30 |
| 7.3.2 | Vazebné interakce..... | 30 |
| 7.3.3 | Vazebné a dihedralní úhly..... | 31 |
| 7.3.4 | Elektrostatické interakce..... | 31 |
| 7.3.5 | Van der Waalsovy parametry..... | 32 |
| 7.3.6 | Explicitní rozpouštědlo..... | 33 |
| PRAKTICKÁ ČÁST | | 34 |
| 8. | CÍLE PRÁCE | 34 |
| 9. | METODY | 35 |
| 10. | VÝSLEDKY A DISKUZE | 36 |
| 10.1. | MD simulace měřené veličiny..... | 36 |
| 10.2. | Výchozí struktury | 39 |
| 10.2.1 | 4QOZ..... | 39 |
| 10.2.2 | 1JU7 | 40 |
| 10.2.3 | 1KKS..... | 40 |
| 10.3. | Konformační chování v MD simulacích | 42 |
| 10.3.1 | RMSD..... | 42 |

| | | |
|---------------------------------|---|-----------|
| 10.3.2 | Obecný popis chování UUUC v různých simulacích..... | 44 |
| 10.3.3 | 4QOZ..... | 44 |
| 10.3.4 | 1JU7 | 49 |
| 10.4. | Porovnání..... | 59 |
| 10.4.2 | 1JU7 | 59 |
| 10.4.3 | 1KKS..... | 59 |
| 10.4.4 | Rozdíly u reprezentativních struktur | 60 |
| ZÁVĚR | | 64 |
| SUMMARY | | 66 |
| POUŽITÁ LITERATURA | | 68 |
| PŘÍLOHY..... | | 75 |

POUŽITÉ ZKRATKY

| | |
|--------------|--|
| DNA | deoxyribonukleová kyselina |
| RNA | ribonukleová kyselina |
| LUCA | last universal common ancestor |
| OoL | origin of life |
| Å | angström |
| A | adenin |
| G | guanin |
| C | cytosin |
| T | tymin |
| U | uracil |
| H vzdálenost | vodíková vzdálenost |
| NMR | nukleární magnetická rezonance |
| NOE | nuclear overhauser effect |
| AMBER | assisted model building with energy refinement |
| VMD | visual molecular dynamics |
| MD | molekulová dynamika |
| RMSD | root mean square deviation |
| PDB | protein data bank |

ÚVOD

Vznik života a jeho původ na pradávné Zemi či někde v hlubokém vesmíru je stále zahalen rouškou tajemství o jehož rozklíčování se pokoušejí vědci z mnoha vědních oborů, a to již více jak jedno celé století a zatím se jim nepodařilo dosáhnout toho konečného grálu. I přesto nelze říci, že by se toto téma nikam neposunulo. Od dob probiotické teorie od Alexandra Oparina vzniklo bezpočet článků, studií i experimentů, které přinesly nemálo nových poznatků, hypotéz a teorií. Momentálně nejvíce zmiňovaná je pak teorie RNA světa. U ní je takový předpoklad, že život vznikl na základně prvních primitivních RNA (ribonukleová kyselina) řetězců, které byly schopny samoreplikace. A postupem času a evolučního vývoje dospěly k mnohem komplexnějším formám života. S touto tematikou se pojí i určitá skupina subvirálních agentů, a to viroidů. Viroidy jsou malé úseky RNA, jež parazitují na hostitelských buňkách. Jednou z hypotéz je, že viroidy mohou být relikty z dob dávno minulých, přičemž se jejich biologie neliší moc od jejich příbuzných před třemi a půl miliardami let.

Důvodem sepsání této práce pak byl zájem o toto téma a také fakt, že 3D struktura viroidů není ještě dobře popsána. Její popis by pak mohl pomoci s dalším pochopením prvotních molekul na rané Zemi.

Cílem práce poté bude prozkoumat konformační chování tetraloopu UUUC v roztoku pomocí molekulové dynamiky a porovnat ho s jeho konformací v protein-RNA komplexu a s dříve publikovanými NMR experimenty provedenými za různých podmínek v roztoku.

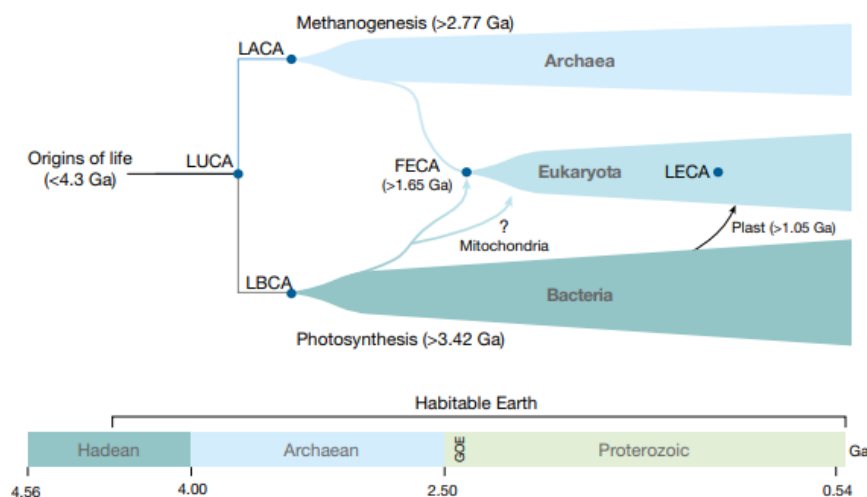
TEORETICKÁ ČÁST

1. VZNIK ŽIVOTA

1.1. Doklady o počátcích života

První náznaky biologických struktur byly objeveny v horninách datovaných do období před 3,4 miliardami let, přičemž se uvažuje o vhodných podmínkách pro život již před 4,3 miliardami let. Objevují se i snahy posunout vznik živých forem do vzdálenějšího období, než jsou 3,4 miliardy let, například díky biologickým hodinám či některým geologickým vzorkům. Problémem je, že důkazů pro takovát tvrzení není mnoho a určování, zdali se opravdu jedná o život, jsou nanejvýš sporná. A toto se týká i posledního univerzálního společného předka všech organismů (LUCA – last universal common ancestor) a jeho následná divergence do dvou hlavních větví (domén) fylogenetického stromu, a to *Bacteria* a *Archaea*, z níž se odštěpila *Eucarya* (viz. Obr. 1). I přes to, že vznik LUCA je datován do období před 3,8 miliardami let, je zřejmé, že není první vzniklou životní formou na Zemi z důvodu jeho složitosti, a především pak to vyplývá z předpokladu, že LUCA měl základ svého genetického kódu postavený na DNA (deoxyribonukleová kyselina), přičemž se předpokládá, že existovaly ještě mnohem primitivnější formy života na bázi RNA (ribonukleová kyselina). [1] [2] [3]

Obrázek 1. Diagram znázorňující vývoj života v čase (převzato z [1])



1.2. Historie myšlenky vzniku života

První myšlenky ohledně života a jeho vzniku se objevovaly už ve starověkém Řecku u Aristotela a Platona a neznámější v tomto ohledu je představa „samoplození“, která předpokládala vznik některých živočichů, jako například hmyzu ze špíny. Tyto ideje následně převzala i křesťanská evropská vzdělanost, zároveň se také zastávala teorie kreacionismu a tedy, že všechny živé formy mají počátek u Boha. [4]

Zmíněné teze počítaly s neměnnými organismy. Počátek úvah o tom, zdali by se organismy mohly vyvíjet se objevily až na začátku devatenáctého století, kdy se nimi zaobíral francouzský vědec Jean-Baptiste Pierre Antoine de Monet, chevalier de Lamarck, avšak nebyly moc dobře přijímány klérem ani vědeckou komunitou té doby. Polemiky o vzniku života a prvním společném předkovi se více rozbujely až s příchodem objevů Angličana Charlese Roberta Darwina v druhé polovině devatenáctého století. Avšak i přesto se pořádné pozornosti tomuto tématu dostalo až ve století dvacátém, kdy se jím zabývali Alexander Ivanovič Oparin a John Burdon Sanderson Haldane, kteří přednesli teorie o abiogenezi, tedy vzniku života z chemických sloučenin. Nejznámějším experimentálním pokusem na poli OoL (Origin of life) je pak Millerův–Ureyův experiment z roku 1953, který podpořil teorie o vzniku základních stavebních kamenů života chemickou cestou. [5]

1.3. Soudobé zkoumání

V dnešní době se studiem života zabývá mnoho vědních oborů a disciplín. Především pak biologie a vědy jí přidružené jako jsou fyziologie, biochemie, taxonomie, ekologie či botanika. V rámci historie života a jeho evoluce je pak možno zahrnout i obory typu paleontologie, paleozoologie či paleobotaniky. Toto je jen malý výčet odvětví vědy, které se zkoumáním života zabírají. Jenže tyto obory převážně zkoumají aktuální živou hmotu či život, který se na planetě Zemi vyskytoval před několika tisíci až miliony let. [6]

Pro tematiku OoL je nutno nahlédnout do oborů jako je chemie a astrobiologie. Avšak ani výše zmíněné nemohou být z řešení této problematiky vyloučeny, jelikož ono téma je možno pojmut z mnoha úhlů pohledu a každý obor má informace, které jsou pro řešení OoL nepostradatelné. Proto se někteří odborníci domnívají, že jedním z důležitých

úkonů by měla být mezioborová komunikace pro vzájemné sdílení poznatků, teorií a hypotéz. V rámci výzkumu vystává i nemálo problémů. Jedním z poměrně markantních, se kterými se musí potýkat vědní obory zaměřující se otázkou OoL, je samotná definice. To, čím vlastně život je, či co bychom za živé měli považovat. I přesto, že tato otázka je již několik desítek let diskutována, tak stále není zcela vyřešena, jelikož většina definic, které existují, mají nějaký epistemologický problém, kvůli kterému nejsou zcela korektní pro univerzální popis života či některé typy organismů zcela nesplňují danou definici. [7] [8] [9]

Jednou z nejčastěji používaných definic života je definice od agentury NASA:

"Život je soběstačný chemický systém schopný darwinovské evoluce." [10]

Dále se pro život předpokládají tyto atributy:

- Homeostáze
- Organizovanost
- Metabolismus
- Růst
- Adaptace
- Dráždivost
- Rozmnožování

[11]

1.4. Metody přístupu k otázce OoL

V rámci OoL je bezpočet teorií a hypotéz. A také existuje několik způsobů, jakými se tato problematika studuje. Obecně lze rozdělit tyto teze na dvě větve, a to dle postupu jakým se snaží dobrat konečných odpovědí na otázku OoL. První je postup „shora dolů“. V tomto odvětví se nejvíce projevuje biologie, především pak genetika a genomika, které se snaží o získávání a porovnávání sekvencí genomů organismů dnes žijících. V nich se pokouší nalézt spojitosti jednotlivých fylogenetických větví a na základě molekulárních hodin či konzervovaných genů zrekonstruovat možnou podobu genomu prvních

organismů na planetě Zemi. Tento úkol je značně složitý už jen proto, že některé typy organismů mají tendenci přenášet svůj genetický materiál do jiných. I přesto se vědcům v této oblasti podařilo určit potenciální genetickou výbavu prvních prokaryot. [8] [12]

Druhým způsobem je metoda „zdola nahoru“. Touto cestou se nejvíce ubírají obory chemie a astrobiologie. Které se snaží za pomoci poznatků z geologie a jiných nauk o Zemi v dávné minulosti odvodit podmínky panující v těchto raných obdobích a poté zkoumat a experimentálně prověřovat jednotlivé hypotézy o možném vzniku prvního života. Tento směr začal již na počátku devatenáctého století, kdy Friedrich Wöhler poprvé syntetizoval močovinu a tím otevřel cestu pro zrod organické chemie, která se pro účely testování vzniku biogenních molekul využívá nejvíce. I na tomto poli se zdařilo nemálo objevů jako příkladný Millerův–Ureyův experiment u jehož vzorků se podařilo pomocí moderních přístrojů objevit několik proteinogenních aminokyselin. Dále se úspěšně uskutečnila syntéza RNA pomocí ribozymů. Otázkou však je, jak moc tyto experimenty odpovídají skutečné události, která se odehrála před několika eony. [8] [13]

1.5. Výčet teorií a hypotéz

Nyní si představíme pár nejvíce zmiňovaných teorií ohledně OoL chemickou cestou „zdola nahoru“.

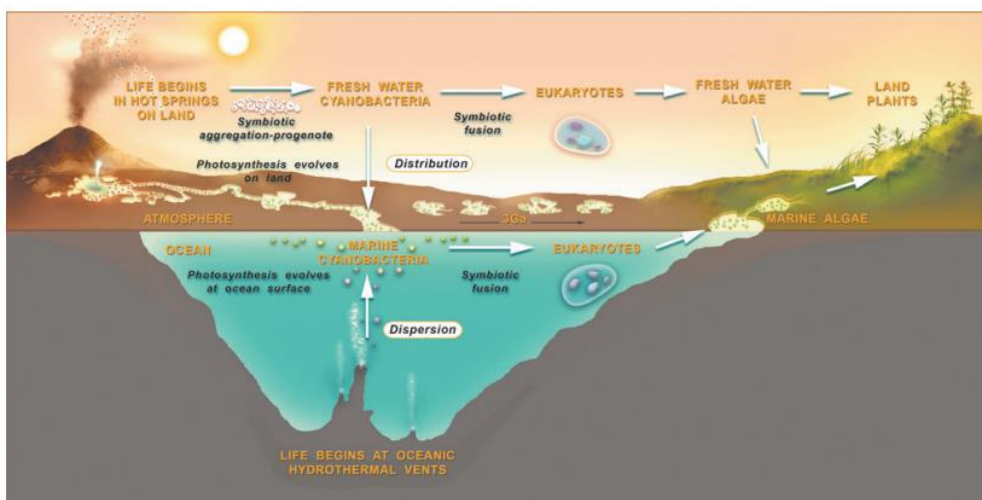
1.5.1 Teorie hydrotermálních průduchů

Popisuje myšlenku, kdy by počátky života mohly spadat do oblastí hydrotermálních průduchů, takzvaných „černých kuřáků“ či „bílých kuřáků“, což jsou kruhové komíny tvořené minerály, z nichž do okolního oceánu unikají přehřáté minerální látky a anorganické sloučeniny síry, železa, manganu a jiných prvků z nitra zemského pláště. Společně s vysokou teplotou přes 400 °C vytváří prostředí bohaté na nejrůznější organické i anorganické látky. Dle předpokladů by právě toto prostředí s vysokou mírou stavební hmoty a energie mohlo být dobrým základem pro vznik prvních organismů. [14] [15]

1.5.2 Teorie horkých pramenů

Tato teorie posouvá možné místo vzniku nikoliv do oblastí hluboko pod hladinu moře, ale naopak do termálních jezírek na povrchu. Dostupnost minerálů společně s teplotou je podobná jako u předcházející teorie. Což by podporovalo vznik prvních forem života společně s faktem lepší akumulace organických i anorganických komponentů na jednom místě. Dále předpokládá lepší přístup k dalšímu zdroji energie, a to slunečnímu záření, jak ukazuje Obr. 2, společně s kombinací teorie předešlé. [16]

Obrázek 2. Alternativní scénáře pro původ života a adaptivní cesty od sladkovodních hydrotermálních polních pramenů nebo slaných hydrotermálních průduchů k eukaryotům a suchozemským rostlinám. (převzato z [16])



1.5.3 Teorie panspermie

Předpokládá OoL mimo planetu Zemi, kdy se prvotní zárodky života za pomoci vesmírných těles asteroidů dostaly do praoceánů, jež následně osídlily. V této chvíli je tento postoj dosti problematický na ověření. Avšak představa, že by se mohly na Zemi dostat organické molekuly, které by mohly stát za vznikem života byla potvrzena. A výčet možných organických molekul nacházejících se mimo Zemi se rozšířil poté, co byly v roce 2023 analyzovány vzorky japonské sondy Hayabusa2. [17] [18]

1.5.4 Teorie RNA světa

Touto teorií se budeme zabývat v následující kapitole viz. 2 TEORIE RNA SVĚTA

2. TEORIE RNA SVĚTA

Teorie RNA světa předpokládá jako první zárodky života struktury na bázi RNA. Tuto myšlenku prvně přednesl americký biolog Alexandr Rich v roce 1962 a vzápětí ji rozvedli další vědci jako Angličan Francis Harry Compton Crick či Leslie Eleazer Orgel. Své jméno „RNA world“ si pak vysloužila o několik desítek let později v roce 1986 od amerického biochemika Waltera Gilberta. Z počátku si tato teorie nevedla moc konkurenceschopně oproti ostatním teoriím, avšak postupem času získávala další a další podporu v rámci vědecké komunity. Hlavní předpoklad, proč by život mohl být prvotně založen na RNA je hlavně ta skutečnost, že je jednodušší než dvoušroubovice DNA, a přitom má také schopnost nést genetickou informaci nezbytnou pro organismy. Dále může vytvářet ribozomy a má autokatalytickou schopnost vytvářet své vlastní kopie za pomoci jiných RNA, aniž by vyžadovala přítomnost proteinů, přičemž podléhá evolučním změnám. Také podporuje katalýzu řady jiných životně důležitých reakcí. Tato teorie je kompatibilní s ostatními výše zmíněnými teoriemi a vypadá to, že je to momentálně jedna z hlavních teorií a myšlenek o vzniku života, kdy více méně převzala otěže dřívějším teoriím a hypotézám jako například teorii o probiotické polévce. Avšak i přes to má i svá úskalí. Jedním z nejpodstatnějších je samotná syntéza jednotlivých součástí RNA. Myšleno čtyř základních bází (cytozin, adenin, guanin a uracil) společně s cukrovou páteří tvořenou ribózou. Podle některých experimentálních dat se zdá, že tvorba takovýchto stavebních kamenů by byla možná v určitých specifických podmínkách. Jednou z možností je například, že by molekuly potřebné pro prvotní vznik byly dopraveny na Zemi pomocí vesmírných těles. Či by prvotní RNA struktury nemusely obsahovat jen čtyři základní báze, ale mohly by být tvořeny různými jinými nukleovými bázemi a postupem času díky selekci by byly z RNA genofondu vytlačeny. Dalším obtížným problémem je způsob, jakým se ze světa RNA stal svět proteinů a DNA.

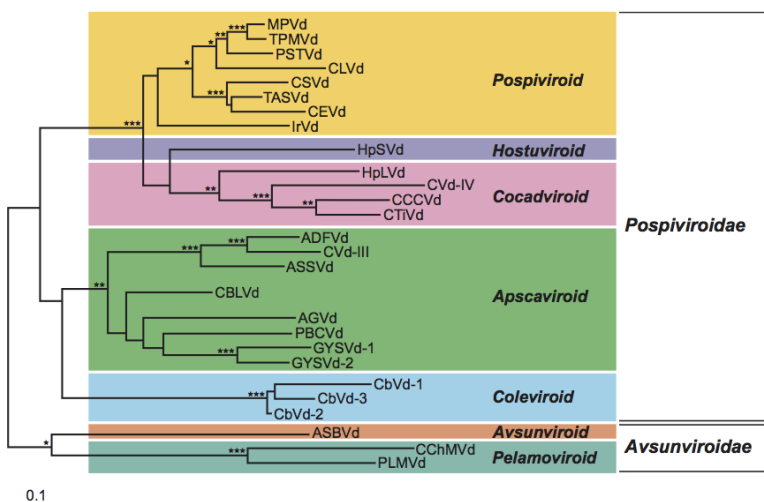
[19] [20] [21]

3. VIROIDY

3.1. Popis

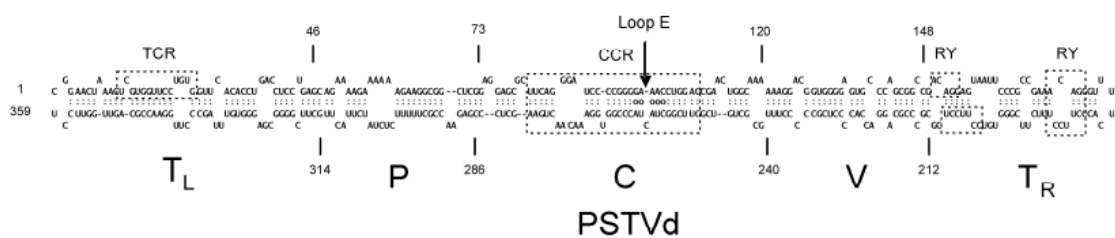
Viroidy jsou považovány za jedny z prvních komplexnějších molekul OoL. Jsou to krátké úseky RNA, většinou několik stovek nukleotidů dlouhé. Mají kruhovou jednovláknovou strukturu, přičemž nekódují žádný protein, avšak využívají vyšší organismy, především pak rostliny, ke své replikaci. Na rozdíl od virů neoplývají žádnou ochrannou proteinovou kapsidou. Oproti virům, které napadají translační mechanismus hostitele, se viroidy zaměřují na jeho transkripční dráhy, kdy se pravděpodobně snaží zaměnit své RNA vlákno za jaderné RNA polymerázy II nebo chloroplastické RNA polymerázy. K jejich přenosu do hostitelského organismu slouží již infikovaná semena, pyl nebo k němu dochází při vegetativním množení. Přímý pohyb mezi buňkami není zatím znám. Účinky jednotlivých druhů viroidů na hostitele se mohou poměrně lišit. Některé druhy nemají na napadenou rostlinu větší vliv, kromě určitých fyziologických změn jako je deformace a barevné změny listů. Jiné ji mohou zcela zdevastovat. Například viroid CCCVd způsobil odumření milionů kokosových palm na Filipínách. Viroidy se dělí do několika rodů podle toho, jak se replikují v hostitelské buňce, jaké mají konzervované části své genetické informace. Dále podle počtu napadených druhů organismů či symptomů jež vyvolávají. Všechny rody lze rozdělit do dvou samostatných čeledí, a to čeledi *Pospiviroidae* a *Avsunviroideae* (viz. Obr. 3), jež lze od sebe také na základě vizuální odlišnosti rozpoznat (viz Obr. 4 a 5). [22] [23] [24] [25]

Obrázek 3. Konsenzuální fylogenetický strom (na základě 1000 replikátů) získaný pro viroidy. Izoláty označené ***, ** a * tvoří monofyletické skupiny ve více než 95 %, 85 % a 75 % replikátů. (převzato z [22])

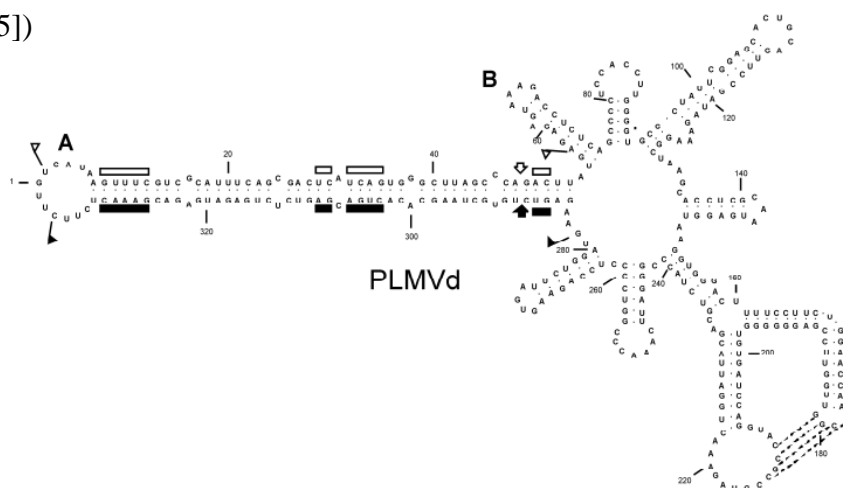


0.1

Obrázek 4. Sekundární struktura PSTVd (patřící do čeledi *Pospiviroidae*) s popisem pěti hlavních domén – terminální levá část (TL), patogenita (P), centrální (C), variabilní (V) a terminální pravá (TR). (převzato z [25])



Obrázek 5. Sekundární struktura PLMVd (patřící do čeledi *Avsunviroidae*). (převzato z [25])



3.2. Jak viroidy zapadají do teorie světa RNA

Předpoklad, že by viroidy mohly být relikty z dob světa RNA, je podložen několika argumenty.

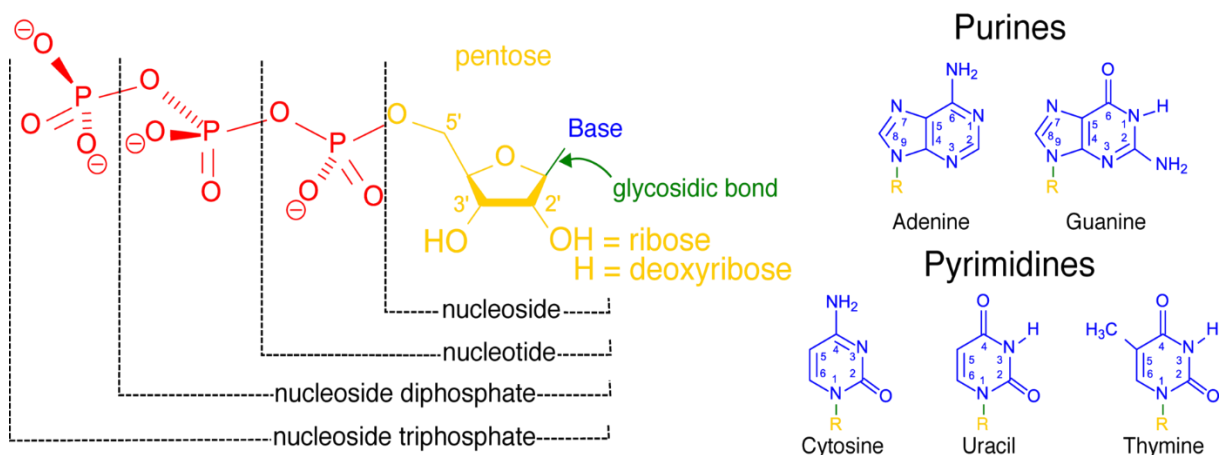
- Splňují strukturální kritéria pro předpokládané prvotní RNA struktury, a to malou velikost, bohatý obsah G a C bází, kompaktní skládání, kruhovitost.
- Nekódují proteiny, některé mohou kódovat ribozomy, a tedy mají katalytickou schopnost pro replikaci dalších RNA.
- Lze vyvodit scénář přechodu viroidů a jim podobných struktur z RNA světa do světa proteinů a DNA. [26]

4. RNA

4.1. Komponenty RNA

RNA znamená ribonukleová kyselina. Tedy je to molekula složená z cukru ribózy, která tvoří základní strukturní jednotku polymerního řetězce. Na ribózu jsou pak navázány pomocí esterové vazby zbytky kyseliny fosforečné a pomocí N-glykosidické vazby dusíkaté báze, a to pyrimidinové a purinové (organické heterocyklické molekuly, jež jako heteroatom obsahují dusík). U RNA se za kanonické dusíkaté báze považují adenin (A), guanin (G), cytosin (C) a uracil (U). Byly objeveny i tzv. nekanonické báze či modifikované báze, které se objevují u některých organismů. Mají jinou strukturu než čtyři výše zmíněné, avšak jsou mnohem vzácnější. Spojením dusíkaté báze a ribózy vzniká základní jednotka RNA zvaná nukleosid. V případě, kdy se naváže ještě zbytek od kyseliny fosforečné vzniká nukleotid (viz Obr. 6). Nukleotidy pak vytvářejí jeden polymerní řetězec oproti DNA, která obsahuje dva řetězce stabilizované pomocí vodíkových vazeb. Báze se mohou párovat za pomoci vodíkové vazby, a to buď kanonicky či nikoliv, dle Watson-Crickovi komplementarity, kdy se párují adenin s thyminem (u RNA uracilem) a cytosin s guaninem. U RNA také dochází ke stabilizaci v rámci jednoho řetězce. [27] [28] [29]

Obrázek 6. Znázornění nukleosidu a nukleotidu společně s dusíkatými bázemi (převzato z [30])



4.2. Typy a funkce RNA

V rámci biologických procesů se vyskytuje několik typů RNA, které se dělí dle své struktury a funkce.

4.2.1 tRNA – transfer

Molekula, která překládá mRNA do proteinu. Skládá se z řetězce o tvaru čtyřlístku s D ramenem, T ramenem a antikodonovým ramenem. Hlavní funkcí je přenášet aminokyseliny navázané na 3' akceptorovém místě do ribozomálního komplexu. Pakliže je na tRNA navázaná vhodná aminokyselina nazývá se aminoacyl-tRNA, a ta se poté účastní proteosyntézy. Kdy se za pomoci antikodonu komplementuje s kodonem tří dusíkatých bází na mRNA a tím určí polohu aminokyseliny v nově vznikajícím řetězci proteinu. [31]

4.2.2 mRNA – messenger

Lineární RNA, která je přepisem jaderné DNA pomocí procesu transkripce. Takto přepsaná RNA obsahuje genetickou informaci o proteinech, které se mají následně syntetizovat v ribozomech. U eukaryot se při přepisu prvotně vytváří tzv. pre-mRNA, která obsahuje oblasti kódu bez informace – *introny* a úseky kódující proteiny – *exony*. Ta je následně zbavena nepotřebných intronů a posléze putuje mimo jádro, kde je s pomocí ribozomů a tRNA překládána do aminokyselin. [32]

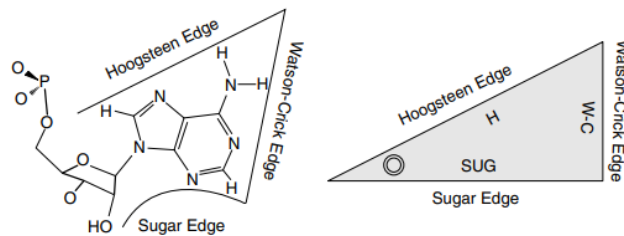
4.2.3 rRNA – ribosomální

Společně s proteiny tvoří část organely zvané ribozom, díky níž dochází k syntéze proteinů v buňce. Každý ribozom obsahuje alespoň jednu malou a jednu velkou rRNA, kdy se v jádru spojuje s ribozomálními proteiny za vzniku malé a velké ribozomové podjednotky. rRNA utváří rozsáhlé sekundární struktury a hraje aktivní roli při rozpoznávání konzervovaných částí mRNA a tRNA. [33]

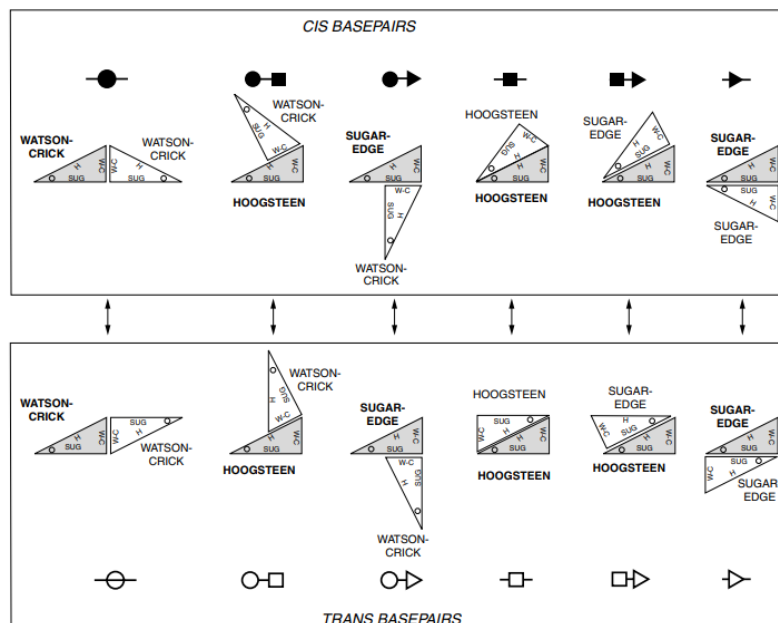
4.3. Struktura RNA

RNA má ve svém 3D rozložení primární i sekundární strukturu. Primární popisuje, jak jsou na nukleotidovém řetězci navázány jednotlivé dusíkaté báze a v jakém pořadí se nacházejí. Sekundární pak popisuje uspořádání molekuly v prostoru. V tomto ohledu je sekundární popis RNA mnohonásobně složitější než u DNA, jelikož ta vytváří pouze kanonické páry mezi bázemi dle pravidel párování. Zatímco RNA obsahuje ve své struktuře i páry nekanonické, čímž dochází k mnohem větší variabilitě v konečném trojrozměrném uspořádání molekuly. U bází může dojít k několika různým interakcím (viz Obr. 7 a 8). [29] [34]

Obrázek 7. Struktura purinového nukleotidu znázorňující tři hrany, které jsou k dispozici pro interakci báze s bází a jeho zjednodušené zobrazení jako trojúhelník (převzato z [34])



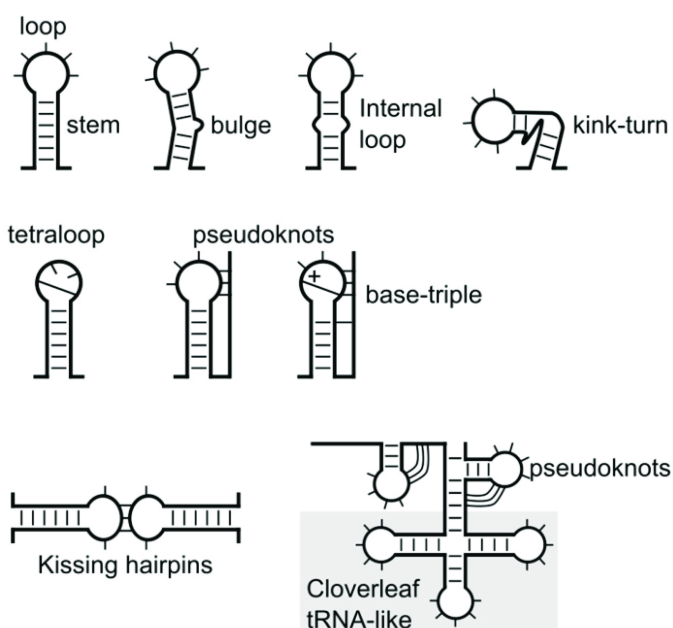
Obrázek 8. (Nahore) Šest možných geometrií cis-párování bází. (Dole) Šest možných geometrií trans párování bází. (převzato z [34])



Mezi nejvíce charakteristické motivy v rámci RNA patří tzv. loopy, stemy, pseudoknoty, Kinky-turny znázorněné v Obr. 9.

- Stem: vlásenková struktura, kdy jsou jednotlivé báze žebříčkovitě spojeny a vytváří tak velmi pevnou strukturu. Většinou jsou tyto báze vázány dle Watson-Crickových pravidel párování.
- Loop: vzniká povětšinou na konci vlásenek, jakožto koncový loop (smyčka) nebo je též možné jej nalézt uprostřed řetězce. Častokrát je to oblast, ve které dochází k významným interakcím s jinými látkami. Většinou je tvořen jednotkami až desítkami bází, u nichž se netvoří klasické párování. [35]
- Pseudoknot: sekundární struktura obsahující alespoň dvě struktury stem-loop, ve kterých je polovina jednoho vložena mezi polovinu druhého stemu. [36]
- Kink-turn: je motiv, který se objevuje v rámci stem vlásenkových řetězců, kdy je běžné párování narušeno několika bázemi, které nejsou spárovány a tvoří jednostrannou vychlípeninu z řetězce, která mění výrazně geometrii. [37]

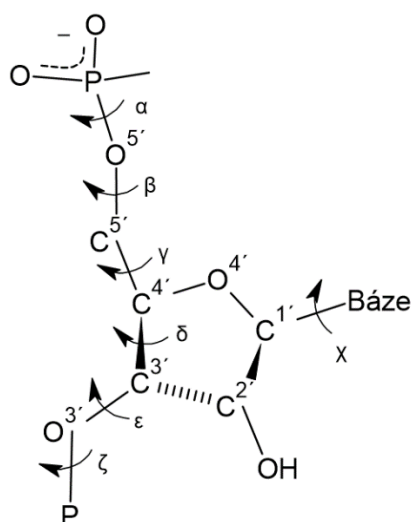
Obrázek 9. Zobrazení různých RNA motivů (převzato a upraveno z [36])



4.3.1 Torzní úhly

Atomy v rámci řetězců mají vůči sobě určitou geometrii. Torzní úhel pak hovoří o úhlu mezi čtyřmi spojenými atomy A-B-C-D, jež je svírán průměty vazeb A-B a C-D do roviny kolmé k vazbě B-C. Úhly, které popisují jsou α , β , γ , δ , ϵ , ζ a χ (viz Obr 10). [29] [38]

Obrázek 10. Torzní úhly páteře pro RNA

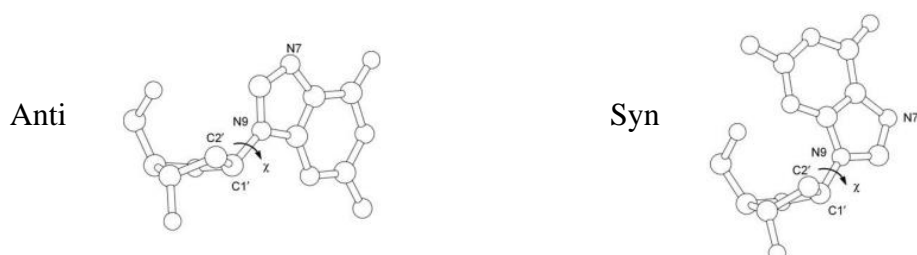


Jména atomů popisuje příloha 1-3

4.3.2 Úhel Chí (χ)

Tento úhel popisuje rotaci dusíkaté báze ku ribóze přes N-glykosidovou vazbu. Tento úhel nabývá stavů a to *anti* ($-120^\circ > \chi > -180^\circ$), nebo *syn* ($0 < \chi < 90^\circ$) (viz. Obr. 11). *Anti* konformace má většinou menší energii a je stabilnější. [29]

Obrázek 11. *Syn* a *anti* konformace (převzato a upraveno z [29])



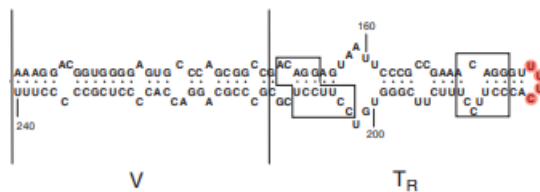
5. TETRALOOP UUUC

Loop (smyčka), jak už bylo zmíněno výše, patří k jedněm z možných struktur, které může RNA řetězec obsahovat. Většinou je toto uspořádání utvořeno na konci vlásenkového řetězce (stemu), který je propojený pomocí Watson – Crickova párování bází. Tím se tak vytváří vyšší stabilita celé struktury, přičemž na konci vzniká např. tetraloop, kdy jsou čtyři nukleotidy vychlípeny tak, že netvoří dvě dvojice dle klasického párování a nejsou tak stabilní jako zbytek molekuly. Oproti tomu se však často chovají jako interakční centra, kde dochází k interakci s proteiny a dalšími molekulami. Jedny z nejběžnějších tetraloopů jsou loopy UNCG a GNRA (U – uracil, A – adenin, G – guanin, C – cytosine, N – jakákoliv báze, R – purinová báze). Oproti ostatním tetraloopům mají vyšší tepelnou stabilitu. Častokrát dochází k tvorbě vodíkových vazeb mezi prvním a čtvrtým nukleotidem, čímž se v podstatě tetraloop zmenšuje na díloop.

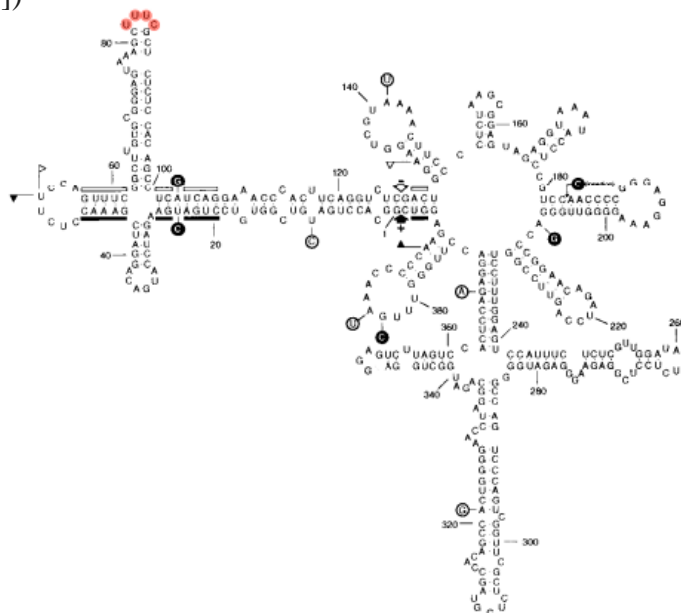
Tetraloop UUUC není příliš obvyklým či nějak zvlášť popisovaným tetraloopem. Skládá se ze čtyř bází, a to tří uracilů a jednoho cytosinu. Vyskytuje se například u druhu Pospiviroidu *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd), a to na pozici 177-180 dle konvenčního číslování, čímž spadá do oblasti TR – terminální levé (terminal left) (viz. Obr. 13). Dále se vyskytuje u druhu Avsunviroidae *Chrysanthemum chlorotic mottle viroid* (CChMVd) na pozici 82-85 (viz Obr. 14). Dle této studie [41] má tetraloop UUUC významnější biologické vlastnosti u druhu (CChMVd), u něhož, pokud je obsažen UUUC, má tento viroid symptomatické vlastnosti daného fenotypu, pokud však dojde k mutaci UUUC → GAAA, při níž dojde k záměně za tetraloop GAAA, pak viroid přechází na asymptomatický fenotyp, aniž by se změnila konečná úroveň akumulace viroidní RNA. [39] [40] [41]

Pro tuto práci byly vybrány tři struktury tetraloopu UUUC s PDB ID (Protein Data Bank Identifier) 4QOZ, 1KKS a 1JU7 podle těchto studií [40] [42] [43] [44], a to pro viroid PSTVd (viz. Obr. 15). Struktury byly upraveny a následně podrobeny simulací molekulovou dynamikou.

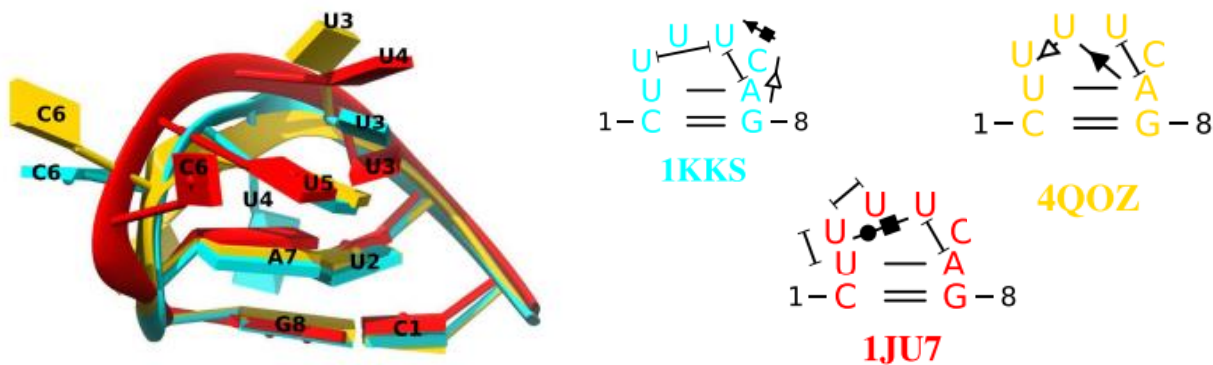
Obrázek 13. Tetraloop UUUC vyznačený červeně ve zkrácené struktuře PSTVd (převzato a upraveno z [24])



Obrázek 14. Tetraloop UUUC vyznačený červeně ve struktuře CChMVd (převzato a upraveno z [41])



Obrázek 15.: Srovnání vlásenkových smyček záznamů PDB 1JU7 (červená), 1KKS (azurová) a 4QOZ (zlatá). (převzato z [43])



6. NMR

NMR neboli nukleární magnetická rezonance či NMR spektroskopie je analytická metoda využívaná v mnoha oborech jako je fyzika, chemie či biologie. Využívá interakce měřených atomů s vnějším magnetickým polem. Tato metoda byla objevena ve čtyřicátých letech dvacátého století, i přesto si své místo vydobyla až v nedávné době, a to zejména pro měření molekul v biologii. Měření touto metodou je možné u atomů, které mají nenulový jaderný spin. Nejhojnějším je pak měření vodíku ${}^1\text{H}$. V přítomnosti magnetického pole se jaderné spiny orientují do určitého směru (vyrovnejí se s vnějším magnetickým polem), přičemž na ně lze následně působit pomocí elektromagnetického záření, kdy dojde k absorpci daného záření a změně orientace spinu jádra. Jádro může být orientováno do dvou směrů, které odpovídají určité energetické hladině. Buďto nejnižší, kdy je jádro paralelní s vnějším magnetickým polem či nejvyšší. V tom případě je antiparalelní s vnějším magnetickým polem. K magnetické rezonanci pak dochází vlivem záření působícího na jádro, které tak přejde do opačné energetické hladiny. Jaderné spiny však nejsou statické a pohybují se kolem své vlastní osy rovnoběžně se směrem pole. Tento pohyb se nazývá precesní, jež má určitou frekvenci – *Larmorovu* – s magnetickým vektorem μ . Ten se skládá ze složky rovnoběžné k magnetickému poli μ_z a složky kolmé μ_{xy} . Při měření se dodává energie pro generování nenulové složky μ_{xy} a posléze dochází k relaxaci do stavu, kdy má složka μ_{xy} nulovou hodnotu. Tímto je emitováno elektromagnetické záření, které je zachyceno jako volný indukční rozpad (FID), jenž je následně transformován na NMR spektrum. [45] [46] [47]

Pomocí NMR spektroskopie lze z dané látky, v tomto případě RNA, vyčíst velkou řadu informací a parametrů, kupříkladu:

- Základní párování bází, z nichž lze určit jak kanonické, tak i nekanonické párování.
- Umožňuje ověřit predikci prvků sekundární struktury a určit dynamiky párů bází. A také motivy sekundární struktury.

- Za pomoci NOE efektu (nuclear Overhauser effect), což je projev dipól-dipól interakce, lze měřit přenos energie mezi jadernými spiny (křížová relaxace), kdy dojde ke změně populací hladiny spinu, což způsobí změnu signálu. Tato interakce působí do vzdálenosti přibližně 5 Å a s její pomocí lze měřit H vzdálenosti. [46] [47]

7. MOLEKULÁRNÍ DYNAMIKA

7.1. Historie

Základy, na nichž molekulární dynamika (MD) staví, jsou známy již velmi dlouho. Operace s časovou evolucí systému N-těles a pokusy je počítat se datují až do dob Newtonových. Jedním z nejpoužívanějších integračních algoritmů je tzv. Verletův integrační algoritmus, který byl použit již v roce 1791 Francouzem Jeanem Baptistem Josephem, chevalier Delambre.

V rámci počítačového věku se MD objevuje jako jedna z prvních simulačních metod pro bezpočet možných aplikací v oborech chemie, fyziky a biologie. A to na konci 50. a přelomu 60. let 20. století, díky americkému fyzikovi Berni Julian Alderedovi a T.E. Wainwrightovi a posléze také Angličanovi Aneesur Rahmanovi. V následujících dekádách společně s vývojem počítačů se rozšířily možnosti MD a také i kvalita výpočtů a jejich množství. [48] [49]

7.2. Popis

MD je metoda pro počítačovou simulaci a analýzu pohybů atomů a molekul ve složitých modelových systémech. Poskytuje tak mnoho dat, jež jsou nepostradatelná pro vědeckou práci v oblastech chemie a biologie. Tuto metodu lze vnímat jako teoretickou, jelikož provádí simulace, umožňuje ale predikovat (např. Gibbsovu energii), které jsou jinak získávány z experimentu. Protože plný popis systému metodami kvantové chemie je příliš náročný, zavádíme pojem povrch potenciální energie, který umožňuje popsat dynamiku jader bez explicitního zohlednění elektronů. S využitím povrchu potenciální energie můžeme použít klasickou mechaniku ke sledování dynamiky jader. Poskytuje tak pohled na vývoj systému v čase, což umožňuje odvodit kinetické a termodynamické vlastnosti. Nejběžněji se trajektorie počítají pomocí Newtonových pohybových rovnic. Interakce mezi atomy jsou pak počítány pomocí meziatomových potenciálů neboli empirických silových polí. [49] [50] [51] [52]

7.3. Silové pole AMBER

AMBER neboli Assisted Molecular Building with Energy Refinement. Jedná se o model potenciální energie molekulárního systému, jež obsahuje bezpočet parametrů, ať už to jsou atomové typy, matematické vzorce pro dané konfigurace nebo celková potenciální energie. I přesto jak moc je toto pole používané zejména na biomolekuly, je známo, že obsahuje nepřesnosti, například přílišnou stabilizaci α -helixů, dále pak vzdálenosti fosfátů v cukrfosfátové páteři. Celková potenciální energie je součtem vazebních a nevazebních příspěvků $E_{total} = E_{bonded} + E_{non-bonded}$, přičemž pro lepší popis se používá složitější rovnice, jež uvažuje více proměnných – viz rovnice 1. [29] [52] [53]

Rovnice 1. Funkce vnitřních souřadnic pro silové pole AMBER (převzato z [54])

$$E_{total}(\mathbf{r}^N) = \sum_{bonds} \frac{k_r}{2} (r - r_0)^2 + \sum_{angles} \frac{k_2}{2} (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{dihedrals} \frac{v_n}{2} [1 + \cos(n\phi - \gamma)] + \sum_{i < j}^{atoms} \epsilon_{ij} \left[\left(\frac{R_{ij}}{r} \right)^{12} - 2 \left(\frac{R_{ij}}{r} \right)^6 \right] + \sum_{i < j}^{atoms} \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{q_i q_j}{r}$$

7.3.1 Model atomu

U simulací systémů s vícero atomy se používá zjednodušený model, jež popisuje atomy jakožto hmotné body s určitou hmotností odpovídající danému chemickému prvku. Tomuto bodu je přiřazen parciální náboj a příslušné Van der Waalsovy parametry, které aproximují nekovalentní interakce mezi atomy (viz níže). Při zvolení určitého silového pole má každý atom také svůj určitý atomový typ, který popisuje hybridizaci a další parametry. [54]

7.3.2 Vazebné interakce

Energie a kovalentní vazby a jejich chování je častokrát zjednodušeně popisováno tak, že vazba je pouhou pružinou s určitou tuhostí a rovnovážnou délkou $\frac{kr}{2} (r - r_0)^2$. Takový to model neumožňuje disociaci. Pro tuto možnost by musel být použit tzv. Morseho potenciál, avšak jeho řešení je pro většinu případů příliš zdlouhavé na výpočet. Uvažování o vazbě jako o pružině je dostatečné pro systémy, kdy předpokládáme relativní termodynamickou stabilitu. [54]

7.3.3 Vazebné a dihedralní úhly

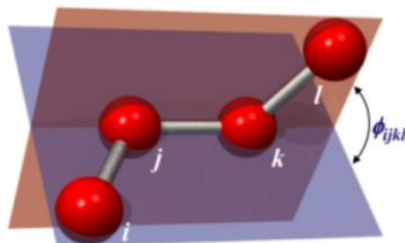
Vazebný úhel popisuje úhle mezi dvěma sousedními vazbami. Potenciál je pak popsán aproximací $\frac{k^2}{2} (\theta - \theta_0)^2$.

Dihedralní úhel je úhel, jež svírají dvě roviny dané dvěma trojicemi atomů (viz. Obr. 16). Je popsán rovnicí 2, kde parametr v_n popisuje tzv. dihedralní bariéru v ideálním případě tedy energetický rozdíl mezi nevhodnější a nejméně výhodnou konformací vzhledem k danému úhlu. ϕ udává dihedralní úhel, γ_i dihedralní fázi a n_i multiplicitu. [54]

Rovnice 2. Popis potenciální energie dihedralního úhlu (převzato z [54])

$$E(\phi) = \sum_i \frac{v_{n_i}}{2} [1 + \cos(n_i \phi - \gamma_i)]$$

Obrázek 16. Zobrazení dihedralního úhlu ϕ (převzato z [54])



7.3.4 Elektrostatické interakce

Jsou to interakce mezi bodovými náboji q_i a q_j v určité vzdálenosti r od sebe navzájem dle Coulombova vztahu $\frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{q_i q_j}{r}$, kdy ϵ_0 popisuje relativní permitivitu vakua, jejíž hodnota se pohybuje kolem jedné, avšak záleží na prostředí, v němž simulace probíhá. Pozice bodových nábojů jsou povětšinou totožné s pozicemi atomů, ale nemusí tomu tak být vždy. [54]

7.3.5 Van der Waalsovy parametry

Van der Waalsovy parametry popisují nevazebné interakce mezi atomy. A to především repulzi, jež je odpudivou složkou působící na velmi malé vzdálenosti zabraňuje přílišnému přiblížení částic, kdy energie stoupá do limitních hodnot. Je popsána jako Pauliho repulze. Druhou významnou interakcí je pak disperze, jež popisuje vzájemnou přitažlivost dvou částic, především pak v rámci dipól-dipól interakce, dle typu dipólů je lze dělit do několika kategorií, a to na Londonovy disperzní síly, Debyeovy a Keesomovy. Interakce mezi atomy v určité vzdálenosti je často aproximována dle Lennard-Jonesova potenciálu (viz. Obr 17.). Interakce lze popsat dle rovnice 3. v níž vystupují dva členy: repulzní člen (viz. Rovnice 4) a disperzní (viz. Rovnice 5). [29] [54]

Rovnice 3. Lennard-Jonesův potenciál (převzato z [54])

$$E(r) = \frac{A_{ij}}{r^{12}} - \frac{B_{ij}}{r^6} = 4\varepsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r} \right)^6 \right] = \varepsilon_{ij} \left[\left(\frac{R_{ij}}{r} \right)^{12} - 2 \left(\frac{R_{ij}}{r} \right)^6 \right]$$

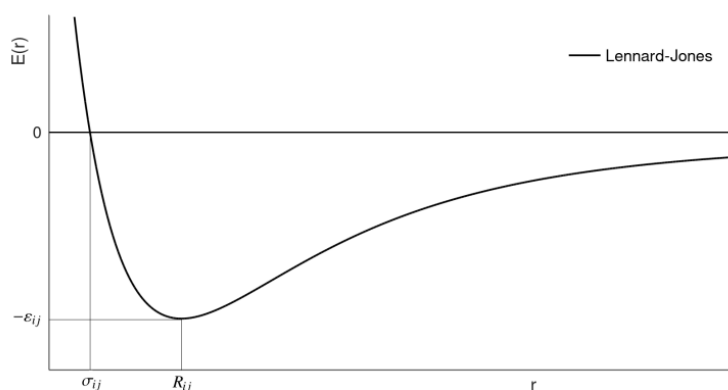
Rovnice 4. Repulzní členy Lennard-Jonesova potenciálu (převzato z [54])

$$\frac{A_{ij}}{r^{12}} = 4\varepsilon_{ij} \left(\frac{\sigma_{ij}}{r} \right)^{12} = \varepsilon_{ij} \left(\frac{R_{ij}}{r} \right)^{12}$$

Rovnice 5. Disperzní člen Lennard-Jonesova potenciálu (převzato [54])

$$-\frac{B_{ij}}{r^6} = -4\varepsilon_{ij} \left(\frac{\sigma_{ij}}{r} \right)^6 = -2\varepsilon_{ij} \left(\frac{R_{ij}}{r} \right)^6$$

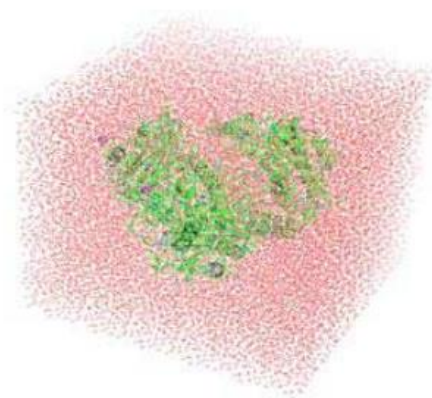
Obrázek 17. Grafické vyjádření Lennard-Jonesova potenciálu (převzato z [54])



7.3.6 Explicitní rozpouštědlo

Zkoumaný systém molekul se nachází v boxu, jenž je vyplněn molekulami vody. Často používanými modely jsou např. TIP3P [55] a SPC/E [56]. Do modelů je možno zahrnout i polarizaci v důsledku působení okolních nabitých či polárních částic. Elektrostatické pole pak indukuje dipólový moment, jež je úměrný intenzitě elektrického pole. Tím, že jsou částice v konečně omezeném prostoru (boxu) (viz. Obr. 18), dochází na okrajích k nižším počtům interakcí než uvnitř boxu. Toto je možné vyřešit pomocí tzv. periodických okrajových podmínek, kdy je simulovaný box jen jednou z buněk periodicky replikovaného systému. Výpočet interakcí jednotlivých částic je nutno nějakým způsobem omezit, jelikož je jich nekonečný počet. Explicitní interakce tak lze počítat buď jako krátkodosahové, kdy je příspěvek interakčního potenciálu zanedbáván za mezní vzdálenosti (cutoff) či dlouhodosahové u nichž klesá interakční potenciál s třetí a menší mocninou vzdálenosti. [29] [52]

Obrázek 18. Box vody (převzato z [29])



PRAKTICKÁ ČÁST

8. CÍLE PRÁCE

Cílem mé bakalářské práce bylo prozkoumat konformační chování RNA tetraloopu UUUC v roztoku pomocí molekulové dynamiky. Dále se budu snažit zjistit, jak dobře je toto chování popsáno silovým polem AMBER OL3. Výsledky molekulově dynamických simulací budou porovnány s konformací mRNA v komplexu s histonovým proteinem získaném rentgenovou krystalografií a s dříve publikovanými NMR experimenty provedenými za různých podmínek v roztoku.

9. METODY

Simulace byly realizovány v silovém poli OL3 [57] v explicitním rozpouštědle s modelem vody SPC/E [56] a periodickými okrajovými podmínkami s Ewaldovou sumací pro elektrostatické interakce. Byly dodány ionty K^+ a Cl^- [58] [59] k neutralizaci náboje páteře a k dosažení koncentrace KCl 0,15 M.

Cutoff pro nevazebné interakce pak byl 9 Å. Molekuly se upravovaly pomocí programu LEAP z programového balíčku AMBER 18 [60]. Simulace byly prováděny programem pmemd programového balíku AMBER 18 za izobaricko-izotermických podmínek (NPT). Teplota byla nastavena na 300 K (22 °C) a řízena Langevinovým termostatem a tlak na 1 Atm (101,325 kPa) s regulací Monte Carlo barostatem. Simulace byla prováděna s časovým krokem 4 fs technikou hydrogen mass repartitioning [61] [62] pro časový úsek 5 μ s a souřadnice se ukládaly po každých 10 ps.

Vstupní soubory použité v této práci byly převzaty z PDB databáze, kde má každá struktura své čtyřmístné kódové označení, díky kterému je možné ji nalézt na [63]. Pro simulaci byly vybrány struktury s kódem 4QOZ, 1KKS a 1JU7. 4QOZ byl původně měřen v krystalu zatím co 1KKS a 1JU7 v roztoku pomocí NMR. K simulovaným sktrukturám byl přidán určitý počet iontů, aby se zajistila neutralizace fosfátových skupin a dosažení fyziologické koncentrace iontů nebo experimentálních podmínek. Pro 4QOZ to bylo 20 K^+ a 7 Cl^- tak, aby výsledná koncentrace roztoku dosáhla 0,15 M KCl. Dále k 1KKS bylo přidáno 11 Na^+ (odpovídá experimentálním podmínkám) a u 1JU7 se přidalo 17 K^+ a 2 Cl^-

Simulace byly vyhodnoceny programem cpptraj programového balíku AMBER 18 [60]. Vizualizace byla prováděna pomocí programu VMD [64] a PYMOL [65]. Grafy byly vytvořeny programem gnuplot [66].

10. VÝSLEDKY A DISKUZE

10.1. MD simulace měřené veličiny

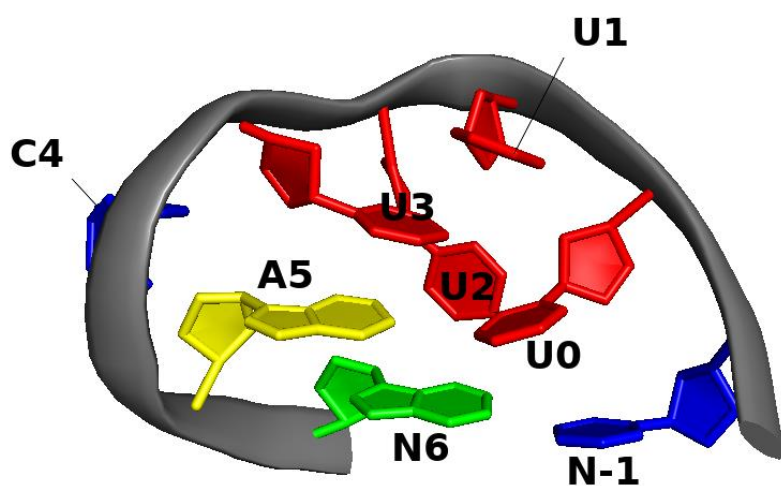
MD simulace byly prováděny s různě dlouhými řetězci, dle výchozích PDB struktur. Pro vyhodnocení a jednotlivá srovnání všech molekul bylo vybráno 8 reziduí z oblasti smyčky (viz. Obr. 19). Protože číslování reziduí se v jednotlivých strukturách lišilo, bylo pro potřeby této práce zavedeno jednotné číslování (viz. Obr. 19), které je v Tabulce 1 uvedeno v porovnání s původním číslováním jednotlivých struktur.

První měřenou veličinou byla střední kvadratická odchylka (RMSD – root mean square deviation) atomových poloh pro každý snímek, která se používá pro posouzení stability molekul v simulaci. Popisuje průměrnou atomovou vzdálenost k výchozí struktuře. V důsledku tepelného pohybu se na začátku simulace zvyšuje, avšak měla by se ustálit, a pokud tomu tak není, je simulace nestabilní. RMSD je možno využít při zjišťování konformačních změn v molekulách, má ale své omezení, a to zejména při určování jemnějších pohybů u konkrétních částí molekuly. Důvodem je překrytí takových signálů tepelným pohybem zbytku molekuly.

Dalšími měřenými veličinami byly vzdálenosti vodíkových atomů (H vzdálenosti), které vypovídají o interakcích jednotlivých reziduí ve smyčce. Vzdálenosti jsem měřil jednak mezi samotnými rezidui smyčky UUUC, ale také mezi rezidui smyčky a rezidui v rámci stemu.

Prvotní výčet H vzdáleností byl získán z 1JU7 NMR NOE restrainů. Ze 103 naměřených H vzdáleností se nakonec výběr zúžil jen na 12 charakteristických H vzdáleností. Pro každé reziduum ze smyčky UUUC byly zvoleny 3 samostatné vzdálenosti (viz. Obr. 20 a Tabulka 2). Dvě z nich vypovídají o určité geometrii samotné báze či cukrfofosfátové páteře vůči ostatním nukleotidům. Třetí z měřených vzdáleností pak hovoří o *syn/anti* konformaci glykosidické vazby báze na ribózu. Přehled vzdáleností z výchozích struktur i z MD simulací je uveden v Tabulce 2.

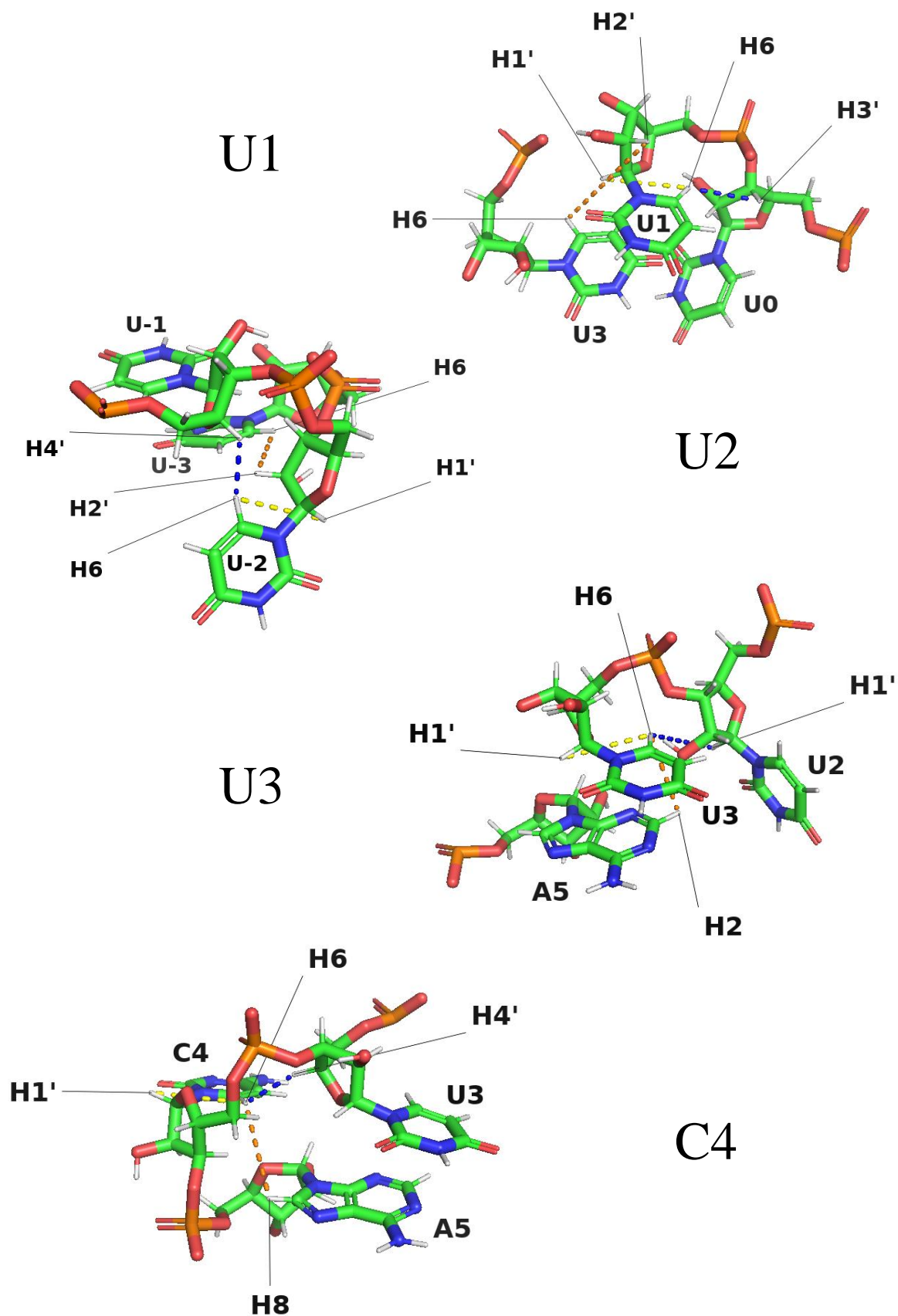
Obrázek 19. Zobrazení číslování tetraloopu UUUC společně s kanonickým párem U=A, a párem N-1 – N6 (v tomto případě C-1≡G6); geometrie 1KKS PDB.



Tabulka 1. Pojmenování reziduí v PDB souborech, MD simulacích a této práci

| Číslování v této práci | 4QOZ [PDB] | 4QOZ [simulace] | 1KKS [PDB] | 1KKS [simulace] | 1JU7 [PDB] | 1JU7 [simulace] | 1JU7 [NMR NOE] |
|------------------------|------------|-----------------|------------|-----------------|------------|-----------------|----------------|
| N-1 | C10 | C4 | C9 | C3 | C5 | C5 | C12 |
| U0 | U11 | U5 | U10 | U4 | U6 | U6 | U13 |
| U1 | U12 | U6 | U11 | U5 | U7 | U7 | U14 |
| U2 | U13 | U7 | U12 | U6 | U8 | U8 | U15 |
| U3 | U14 | U8 | U13 | U7 | U9 | U9 | U16 |
| C4 | C15 | C9 | C14 | C8 | C10 | C10 | C17 |
| A5 | A16 | A10 | A15 | A9 | A11 | A11 | A18 |
| N6 | G17 | G11 | G16 | G10 | G12 | G12 | G19 |

Obrázek 20. Zobrazení měřených H vzdáleností pro U1, U2, U3 a C4 (převzato z 1KKS PDB 1 snímek). Barvy – tmavě modrá, oranžová, žlutá jsou pro jednotlivé vzdálenosti popsány v Tabulce 2 druhém sloupci H vzdálenosti použité v BP.

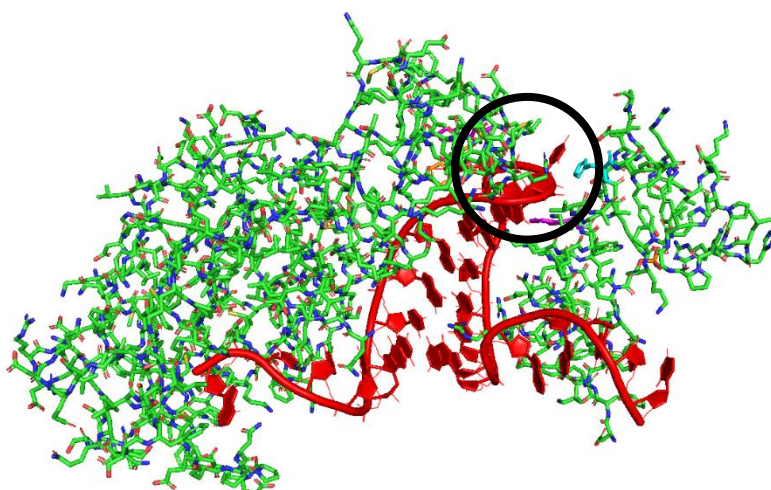


10.2. Výchozí struktury

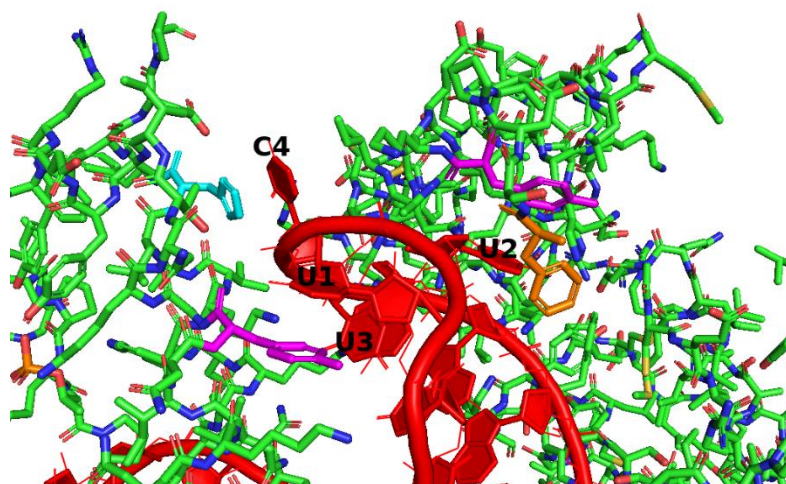
10.2.1 4QOZ

4QOZ je histonová mRNA z *Homo sapiens*, která interaguje s proteinem 3'-5' exoribonukleázou 1 (viz. Obr. 21). Jak lze vidět na Obr. 22 dochází zde k interakci mezi žlábkovým U2 a fenylalaninem společně s tyrosinem. Dále pak u C4 je možno vidět stack s histidinem a U1 a U3 elektrostaticky interagují s tyrosinem. Tato molekula byla měřena pomocí X-RAY difrakce s rozlišením 2,30 Å.

Obrázek 21. Zobrazuje postavení histonové mRNA 4QOZ (červená) vůči proteinu (zeleno-modrá) v krystalu. Černý kruh označuje umístění tetraloopu UUUC.



Obrázek 22. Bližší zobrazení UUUC z Obr. 21 a barevně vyznačené aminokyseliny interagující s rezidui (oranžová – fenylalanin, růžová – tyrosin, tyrkysová – histidin)



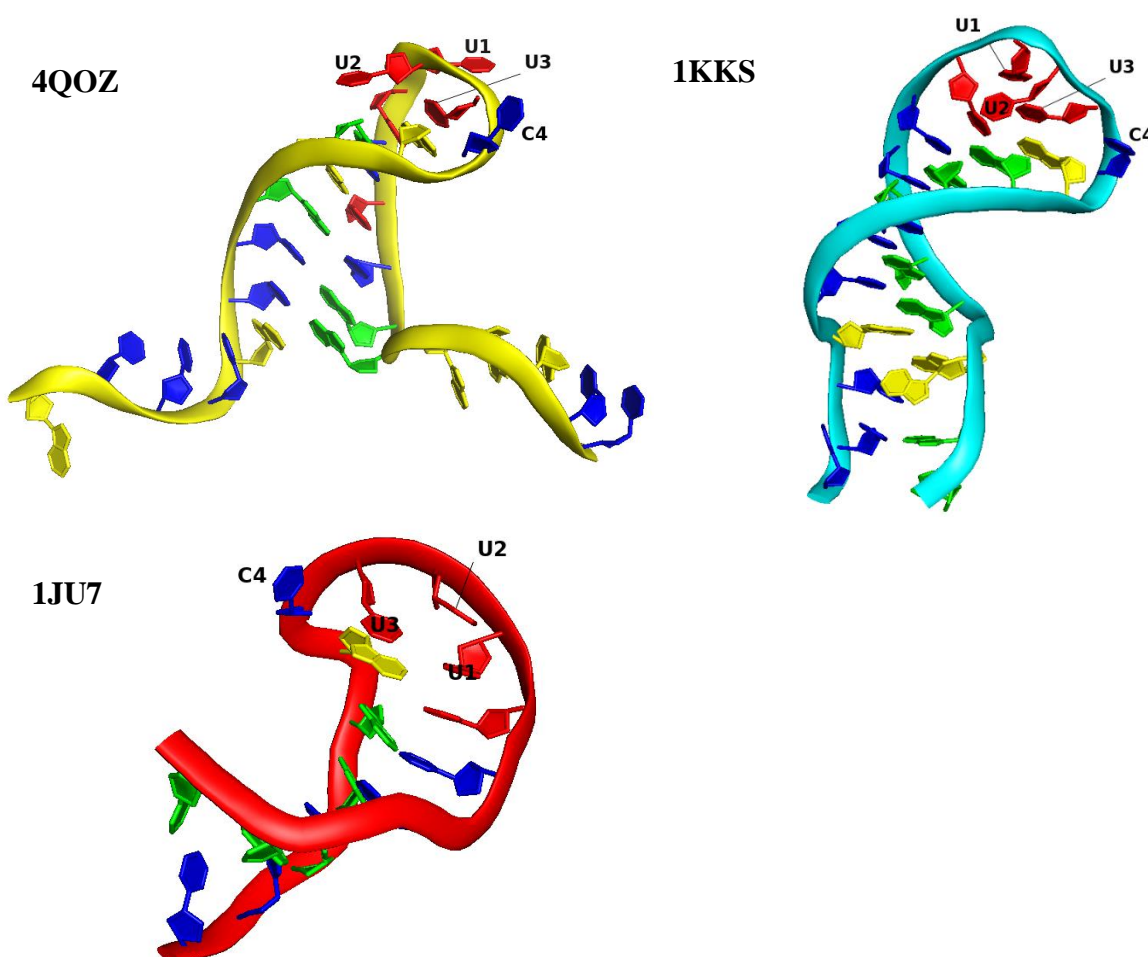
10.2.2 1JU7

Tato struktura byla měřena pomocí NMR v roztoku, a to pro viroid PSTVd. PDB soubor obsahoval 10 struktur, přičemž byla vybrána první z nich. Zde jsou stackové interakce mezi U1 a U0 dále stackové interakce mezi U1 a U2 a v neposlední řadě mezi U3 a A5. C4 je částečně volný v roztoku.

10.2.3 1KKS

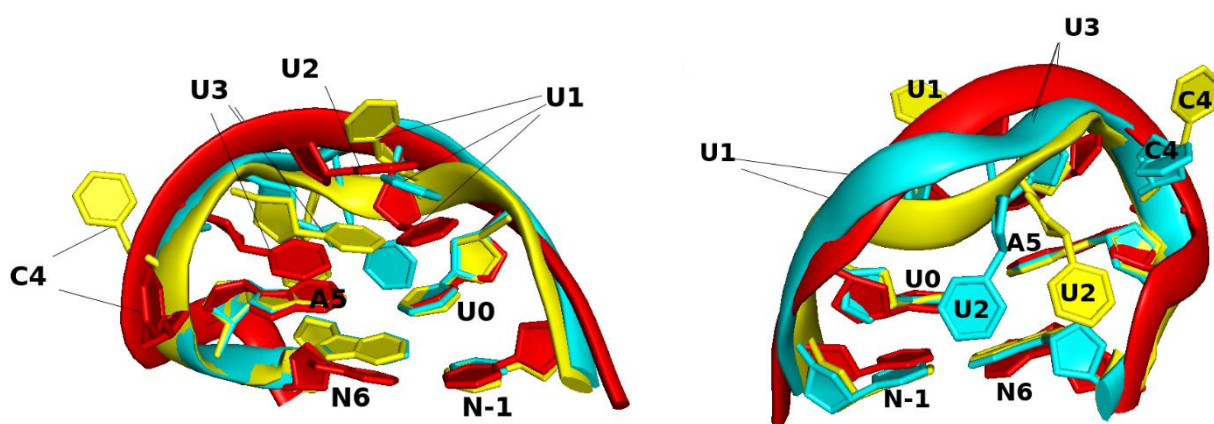
Struktura 1KKS byla měřena pomocí NMR v roztoku pro část sekvence viroidu PSTVd. Struktura této molekuly je zobrazena níže na Obr. 23. Je to první geometrie z 15, které PDB soubor obsahoval. Je možno pozorovat stack U3 na A5 a částečně U1 na U3. U2 je ve žlábkku. C4 je uvolněný do roztoku.

Obrázek 23. Zobrazení původních RNA řetězců z PDB: 4QOZ – žlutá stuha, 1KKS – tyrkysová stuha (použitá první geometrie), 1JU7 – červená stuha (použita první geometrie) se všemi rezidui A – žlutý, U – červený, G – zelený, C – modrý.



I přes menší odlišnosti se 4QOZ a 1KKS se sobě podobají, a to i přesto, že 1KKS byl měřen v roztoku zatím co 4QOZ v krystalu společně s proteinem. Největší rozdíl je mezi U2 a C4, kdy jsou U2 vůči sobě ve žlábků posunuté, přičemž v 1KKS více zapadá do žlábků a má více interakcí v ostatními rezidui. 1JU7 se pak od 4QOZ a 1KKS liší, a to vazně hlavně v postavení U2 a C4. U2 není ve žlábků, ale na opačné straně. C4 u 4QOZ je na pomezí mezi strukturou 1KKS a 1JU7 (viz. Obr. 24)

Obrázek 24. Překryv 8 reziduí (viz. Tabulka 1.) z PDB struktur uvedených v Obr. 23



10.3. Konformační chování v MD simulacích

Molekuly byly simulovány po dobu 5 μs a 1JU7 dodatečně ještě po dobu 10 μs . Trajektorie byla zobrazena po 10ps. Grafy 3-17 pak popisují buďto četnost dané H vzdálenosti nebo její vzdálenost na čase v Å. Tyto grafy zobrazují každý 500 snímek (1 ns) z porízených 500 000. U RMSD je zobrazen každý 500 snímek (1 ns). V tomto časovém úseku docházelo, ke změně polohy cukrfosfátové páteře a také ke změně polohy jednotlivých reziduí vůči sobě navzájem. Co se týče kanonických párů A=U a C≡G ty zůstali zachováni. Nejmarkantnější rozdíly, pak byly očekávatelně pozorovány v teraloopu UUUC.

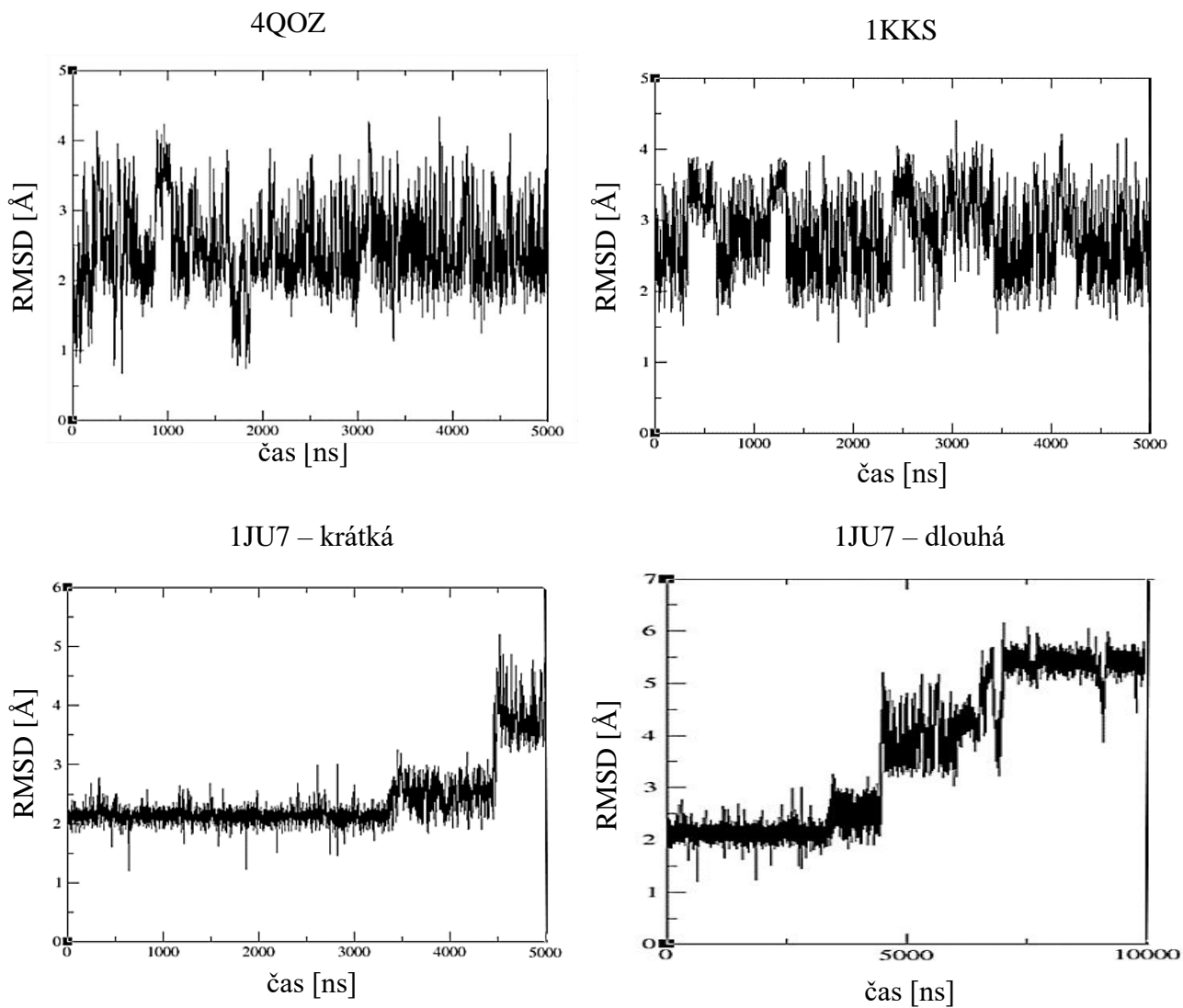
Pro vizualizační účely byly v práci vybrány tři geometrie RNA získané z MD (viz. Obr. 25, 26 a 27). Při jejich výběru se dbalo na hodnoty četností vzdáleností zobrazených v Grafech 3-17 a na základě těchto hodnot se pak vybrala vhodná reprezentativní struktura z celkové trajektorie a to 2346 ns pro 4QOZ, 2158 ns u 1KKS a 2011 ns pro 1JU7. I přesto, že simulace 1JU7 byla prodloužena na 10 μs , všechny hodnoty H vzdáleností byly vyhodnoceny pouze pro trajektorii o délce 5 μs . Z této krátké trajektorie byla vybrána i reprezentativní molekula z Obr. 26, a to především kvůli vysoké míře nestability dlouhé simulace 1JU7.

10.3.1 RMSD

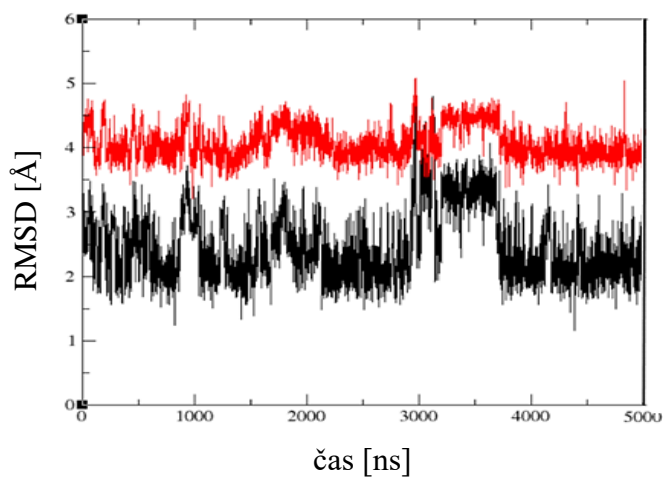
Z Grafů 1, je možné vypořadovat, že u všech molekul došlo k posunu oproti výchozím strukturám. Dále je možné zjistit, že u 4QOZ došlo k poměrně velké odchylce, avšak během simulace si udržovala stabilní geometrii. Oproti tomu 1KKS vykazuje větší míru nestability a hledání vhodné geometrie. RMSD 1JU7 – krátká popisuje stav, kdy si tato struktura našla velmi stabilní geometrii, a to poměrně podobou té výchozí, avšak v pozdějším čase se začala její geometrie výrazně měnit. Proto byla simulace prodloužena o dalších 5 μs , jelikož byla očekávána změna konformace na strukturu podobou 4QOZ a 1KKS. To se však ani během dlouhé simulace nepotvrdilo a struktura 1JU7 přecházela mezi několika stavy, které ovšem nebyly dostatečně stabilní.

Z Grafů 2 je možno odvodit, že 4QOZ v loopu UUUC je v rámci simulace bližší strukturu 1KKS než 1JU7.

Grafy 1. RMSD v zavilosti na čase [ns] pro všechny atomy pro srovnání 4QOZ, 1KKS a 1JU7 v PDB a MD.



Grafy 2. RMSD v zavilosti na čase [ns] pro rezidua UUUUCA v simulaci vycházející ze struktury 4QOZ měřeno vzhledem k 1KKS (černá) a 1JU7 (červená).



10.3.2 Obecný popis chování UUUC v různých simulacích

Z pozorovaných výsledků lze usuzovat, že interakce mezi U0 a U1 jsou poměrně stabilní a vytvářejí stack, kdy je U1 nad U0. Dále dochází k interakci U3 a A5, které jsou též stackovány nad sebou. Největší rozdíly mezi jednotlivými simulacemi jsou pozorovány u U2 a C4. U2 se pohybuje buďto ve žlábkku, který vytváří samotný řetězec, a především pak báze U1 a U3, či je na opačné straně stackováno s ostatními bázemi.

U C4 dochází k největšímu pohybu ve všech simulacích. Oproti ostatním reziduí, které převážně mají nějakou interakci s okolními rezidui, se C4 nachází mimo a volně se pohybuje v roztoku. Jediná interakce již je možno pozorovat je s fosfáty předešlého rezidua. I přesto, že má velké pole pohybu, je překvapivé, že si vybírá jen určité polohy. A to buď poblíž A5, kde se vměstává mezi A5 a U3 (pravděpodobně dochází k elektrostatickým interakcím), či je přímo proti A5 volná v roztoku.

10.3.3 4QOZ

Pro simulaci 4QOZ byl nejprve vybrán řetězec s 8 rezidui, avšak při simulaci došlo k přerušení vodíkových můstků mezi kanonickými páry C \equiv G a U=A, načež se celá struktura rozpadla a již se jí nepodařilo znovu stabilizovat do podobného stavu jako byl ten výchozí. Proto byl pro druhou simulaci zvolen řetězec o 14 reziduiích s 5 kanonickými páry. Ten již byl v simulaci stabilní, a tak bylo možné studovat změnu konformace smyčky v roztoku.

Z pozorování vyplynulo, že hned ze začátku simulace došlo ke změně konformace bází i cukrfosfátové páteře (viz. Grafy 3-6) a to především z toho důvodu, že původní struktura byla zdeformována interakcemi s aminokyselinami proteinu. Změna struktury je patrná i z Grafů 1, kde dojde k rychlému nárůstu RMSD v prvních několika ns simulace. Párování páteře 4QOZ v simulovaném roztoku zůstalo zachováno, docházelo však k značným pohybům celé struktury, jež by vysvětlovaly hodnoty RMSD v Obrázku 25.

Pakliže se zaměříme na tetraloop UUUC, je zde možno pozorovat několik různých interakcí mezi atomy vodíku, které byly naměřeny v NMR experimentu:

U1: Dle vzdálenosti U0(H3')...U1(H6) dochází vzhledem k výchozí struktuře ke zkrácení vzdálenosti mezi reziduem U1 a ribózou U0, i když je možno pozorovat výkyvy. Průměrně se hodnota ustálila na 4,5 Å (viz. Grafy 3). Vzdálenost U1(H2')...U3(H6), pak

popisuje stav vzdálenosti U1 ku U3 a jak lze vidět na grafickém zobrazení z Obr. 25 dochází zde k interakci mezi těmito rezidui. Kdy se U1 tzv. vrství (stackuje) na U3, čímž vytváří stabilnější strukturu. Následně lze vidět z Grafů 7, že se během simulace výrazně nemění vzdálenost vodíků vůči sobě, z čehož lze vyvodit, že U1 zůstává v poloze *anti*.

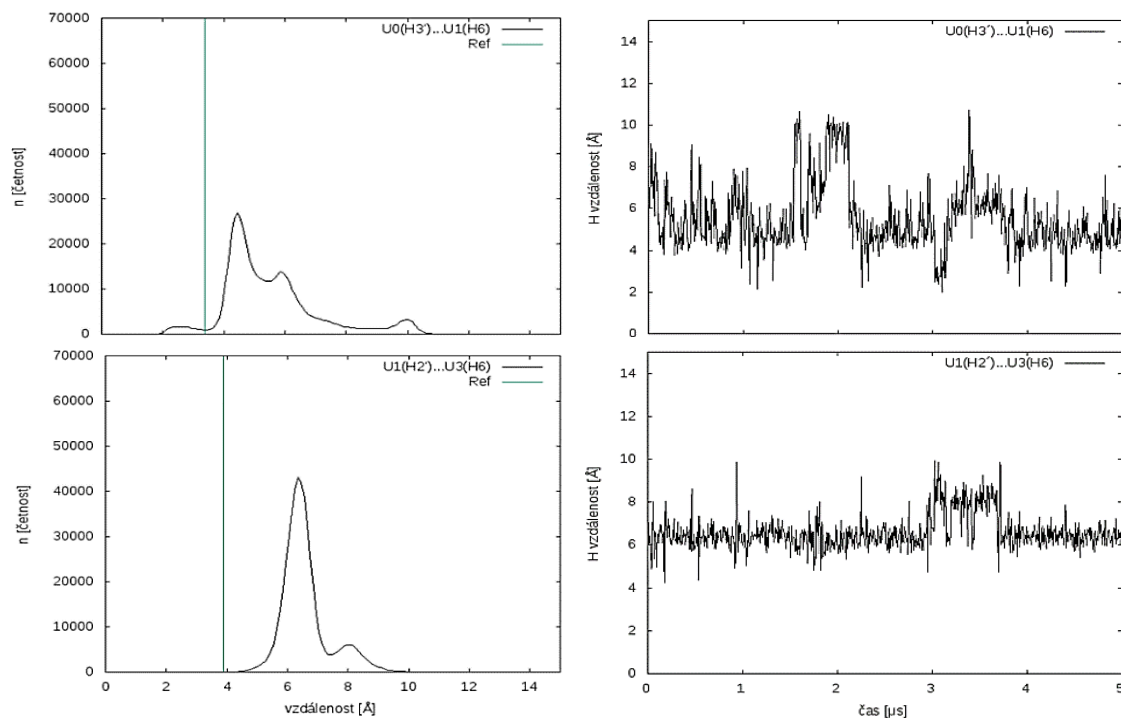
U2: Ze vzdálenosti U1(H4')...U2(H6), je možné zjistit jakým způsobem je uspořádán U2 v tetraloopu. Z Obr. 25, je vidět, že reziduum je ve žlábkku na protější straně než všechny ostatní rezidua. Během simulace dochází ke změně vzdáleností a posunu vůči U1, které je ve své poloze relativně stabilní, avšak stále se drží interakcemi s fosfáty U1 a U3 ve žlábkku. Toto potvrzuje i vzdálenost U2(H2')...U3(H6), kde se poloha U2 prakticky nemění (viz. Grafy 4). Struktura 4QOZ i její MD simulace je tedy pro reziduum U2 ve shodě s NMR experimentem 1JU7. Z Grafů 7 je vidět, že se během simulace výrazně nemění vzdálenost vodíků vůči sobě z čehož, lze vyvodit, že U2 zůstává v poloze *anti*.

U3: Interakce U3 s U2 a A5 (viz. Grafy 5) vypovídají o tom, že se U3 drží v energeticky výhodné poloze, kdy se stabilizuje mocí stackové interakce na A5. Toto uspořádání, lze označit za neměnné. V průběhu simulace se také několikrát realizuje interakce mezi U3 a U1, která stabilizuje motiv podobný NMR struktuře 1JU7. Tato interakce není přítomna v krystalu 4QOZ, protože je v něm mezi rezidua U1 a U3 interkalován tyrosin. *Anti* poloha zůstává zachována viz. Grafy 7.

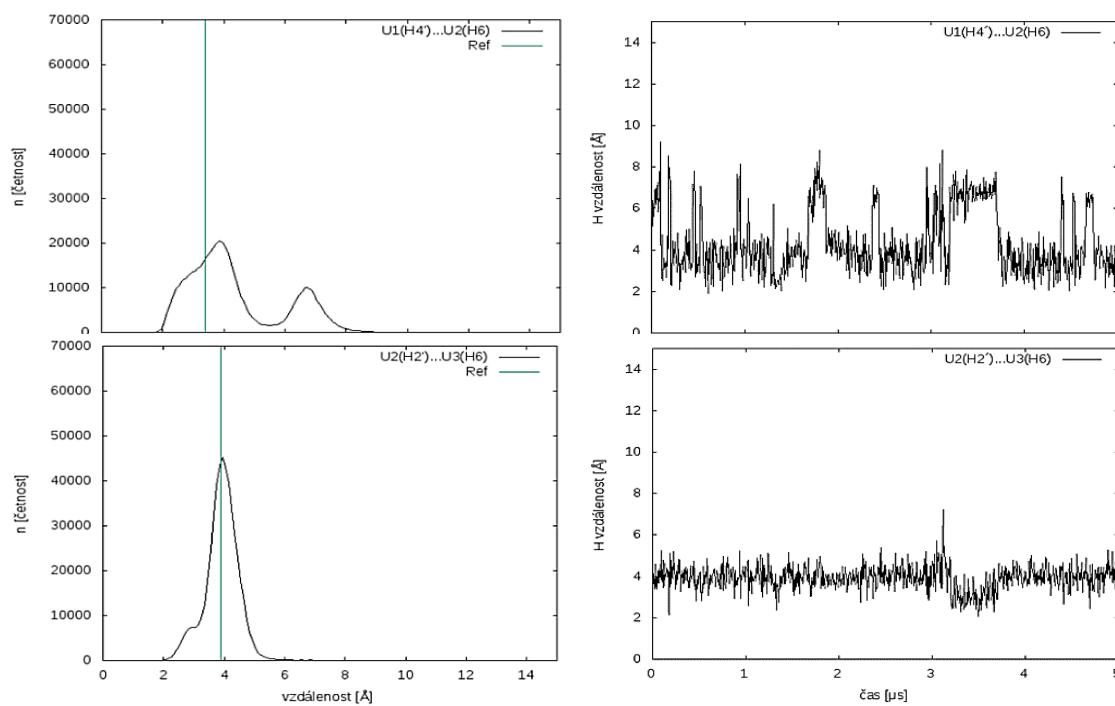
C4: Z Obr. 25, lze pozorovat, že C4 je odvázan od reziduí U3 a A5 a přibližně koparalelní s nimi. Toto postavení je ale silně variabilní, jak je možno vidět z Grafů 6. Po celou dobu simulace zůstává C4 exponován do roztoku. Drží se v *anti* poloze viz. Grafy 7.

Celkově se dá říci, že MD simulace vycházející ze struktury 4QOZ je blíže NMR struktuře 1KKS, hlavně umístěním uracilu U2 ve žlábkku.

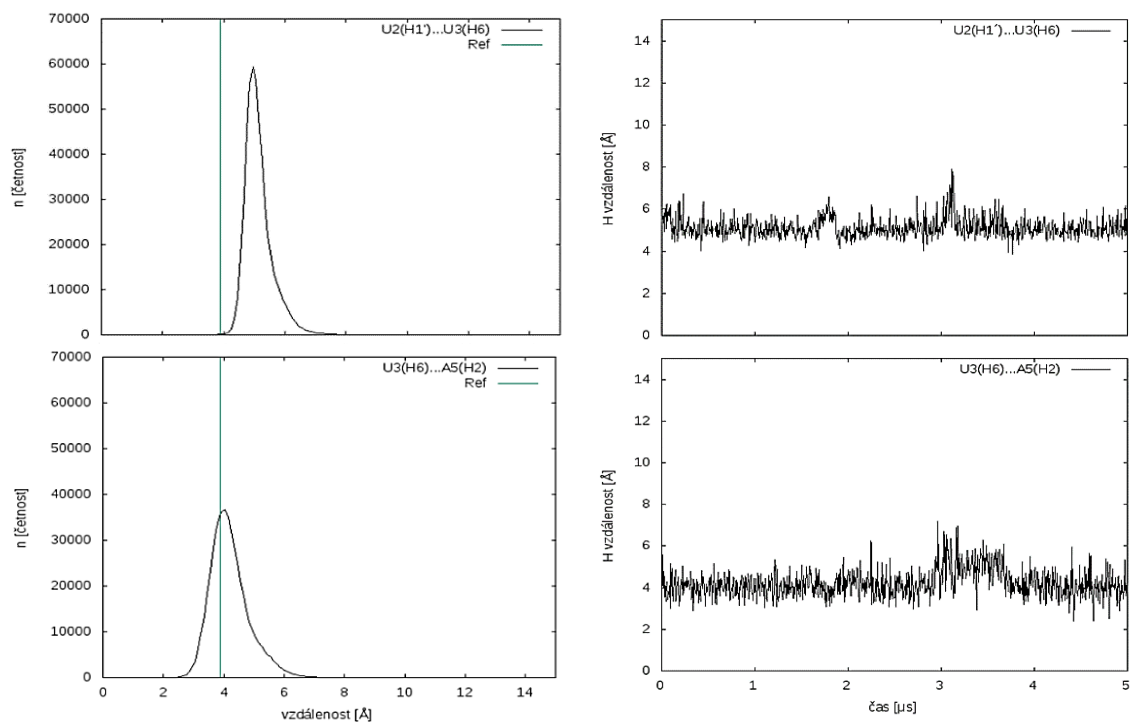
Grafy 3. Pro U1, histogram H vzdáleností se zobrazenou referenční hodnotou z 1JU7 MNR NOE (vlevo) a délka H vazby v průběhu simulace (vpravo).



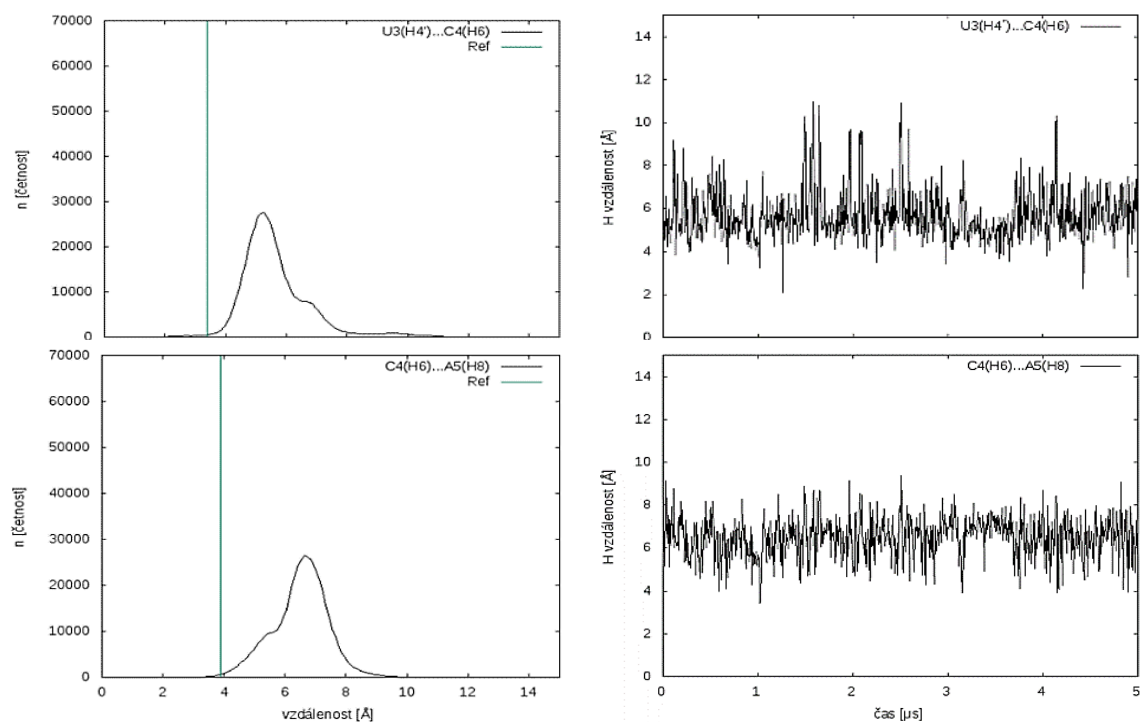
Grafy 4. Pro U2, histogram H vzdáleností se zobrazenou referenční hodnotou z 1JU7 MNR NOE (vlevo) a délka H vazby v průběhu simulace (vpravo).



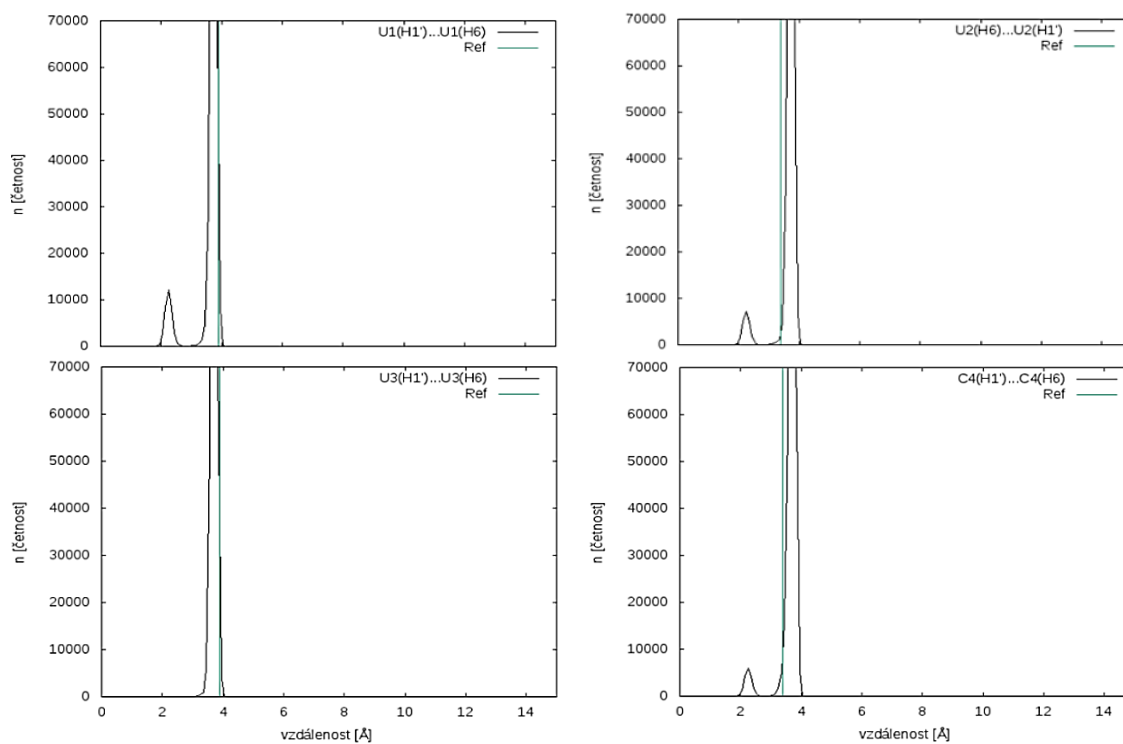
Grafy 5. Pro U3, histogram H vzdáleností se zobrazenou referenční hodnotou z 1JU7 MNR NOE (vlevo) a délka H vazby v průběhu simulace (vpravo).



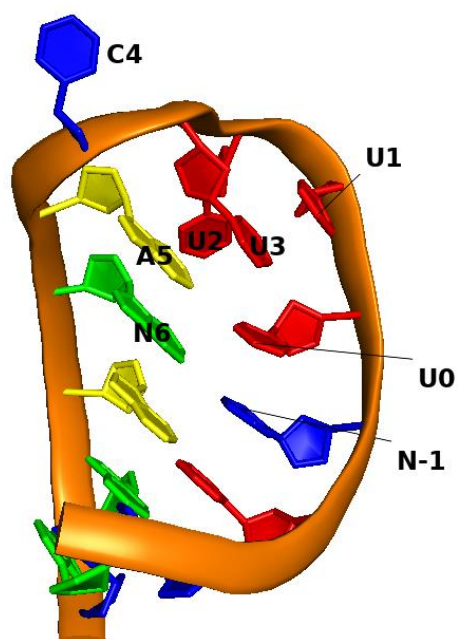
Grafy 6. Pro C4, histogram H vzdáleností se zobrazenou referenční hodnotou z 1JU7 MNR NOE (vlevo) a délka H vazby v průběhu simulace (vpravo).



Grafy 7. Zobrazení *syn/anti* H vzdáleností a četnosti těchto vzdáleností pro rezidua UUUC (viz. Tabulka 1) a zobrazená referenční hodnota z 1JU7 MNR NOE.



Obrázek 25. Zobrazení struktury 4QOZ z MD ze 2346 ns, jakožto reprezentativní konformace.



10.3.4 1JU7

U simulace řetězce 1JU7 byl použit řetězec o délce 16 reziduí, tedy celý původní řetězec z PDB. 12 z těchto 16 reziduí tvořilo 6 kanonických párů.

V této MD simulaci také došlo ke změně konformace oproti výchozí geometrii, avšak posun nebyl tak markantní jako u ostatních simulovaných struktur. V rámci RMSD (viz. Grafy 1), lze vidět, že ke konci simulace dochází k výraznějšímu odchýlení se od prvotní konstituce. V simulaci bylo pozorováno vychlípení U1 do roztoku a snaha U2 se přiblížit žlábkové konformaci jako mají 4QOZ a 1KKS i přes tuto snahu se U2 nepodařilo dosáhnout žlábkového uspořádání. Simulaci byla proto prodloužena na 10 μ s, ale ani poté nebylo dosaženo žlábkového uspořádání báze U2.

U1: V počáteční části simulace (viz. níže) se u tohoto rezidua zachovává stacková interakce s U0, přičemž měřené vzdálenosti se o něco prodloužily, jak je vidět z Grafů 8. Zachovává se i stacková interakce s reziduem U2. Mění se ale orientace rezidua U1 k reziduu U3, a to z počáteční koplanární do kolmé. Dochází zde i k tomu, že U1 se pohybuje více do roztoku, avšak po chvíli se zase vrací a sbaluje se tak, že vytváří interakce mezi U0 a pravděpodobně i s A5. Podle Grafů 12 zůstává U1 v *anti* poloze. Celkově si reziduum U2 svoji geometrii vzhledem ke stemu v simulaci struktury 1JU7 spíše zachovává a změny vzdáleností v Grafech 11 je výsledkem změny polohy některých okolních reziduí.

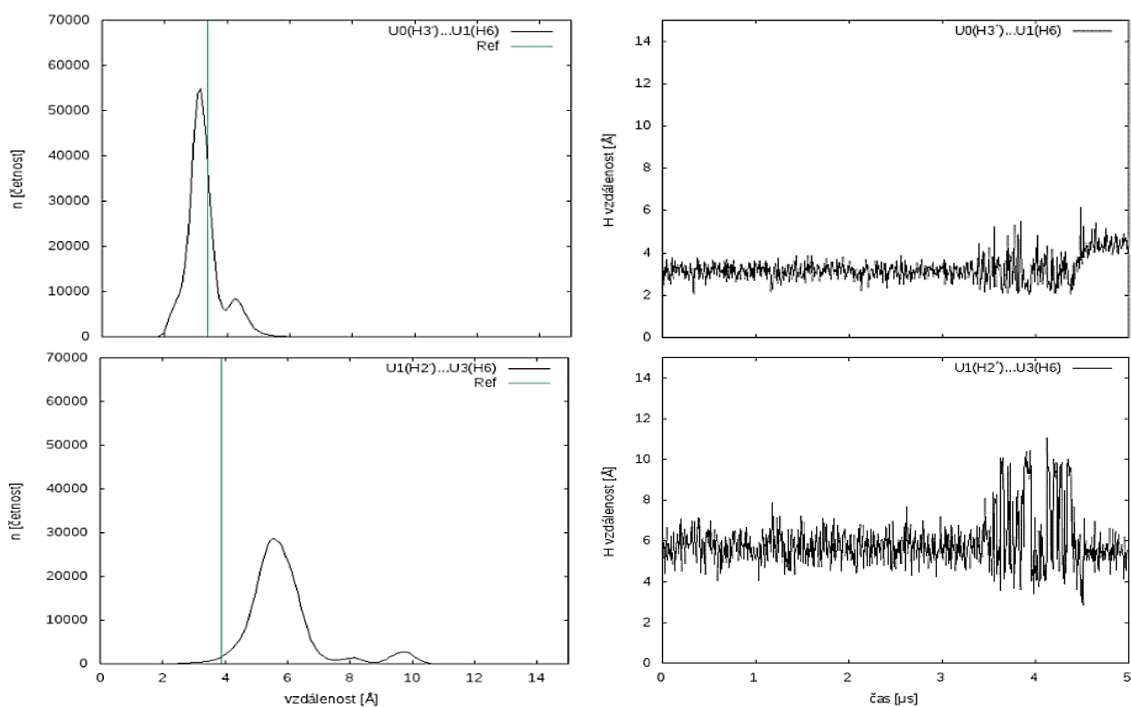
U2: Dle Obr. 26. se U2 stackuje na U1 a vytváří tak zcela odlišnou konformaci oproti strukturám 1KKS a 4QOZ. V tomto případě vytváří poměrně stabilní stackovou interakci, i když H vzdálenosti v Grafech 9 se zřetelně prodlužují. I toto reziduum zůstává v poloze *anti*, viz. Grafy 12.

U3: Hned na začátku simulace dochází k porušení stackové interakce U3 s A5 a náhradě této interakce stackovou interakcí s reziduem U2. To je značný rozdíl oproti výchozí struktuře. Tomu odpovídají i změny vzdáleností v Grafech 10. *Anti* poloha zůstává zachována, viz. Grafy 12.

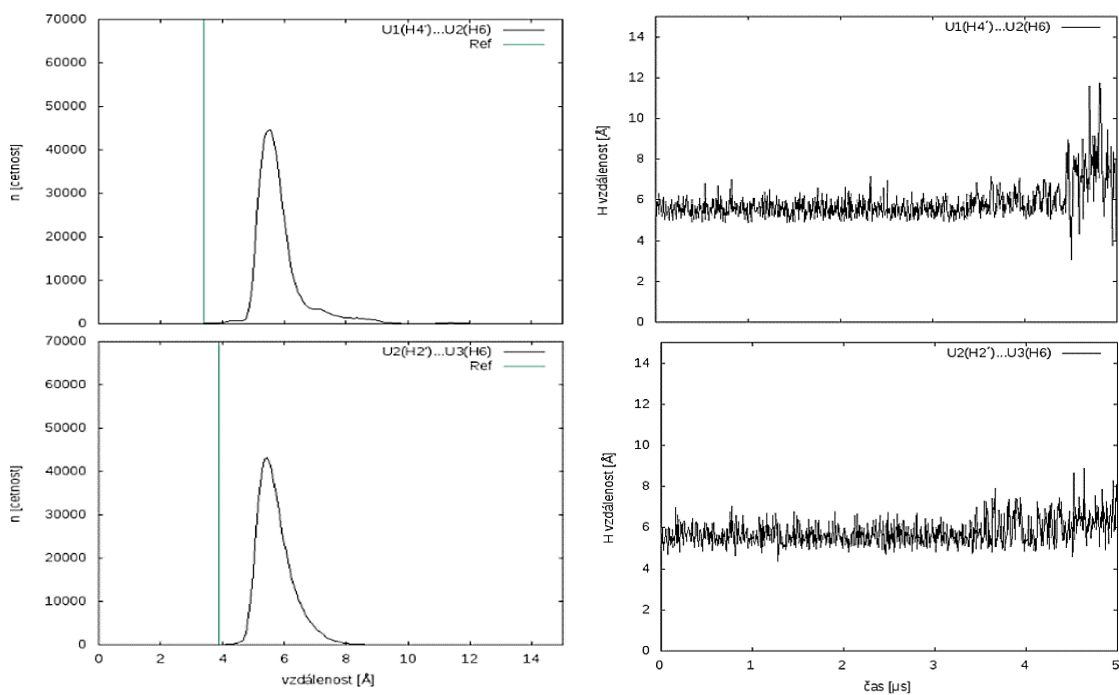
C4: Ve výchozí struktuře je C4 exponovaná do roztoku a nemá žádný kontakt s ostatními rezidui. Hned na začátku simulace ale dojde ke vzniku stackové interakce s U3, což se projevuje i na změně H vzdáleností (viz. Grafy 11). To je opět významný posun od výchozí geometrie. Zůstává v *anti* poloze viz. Grafy 12.

Celkově lze tedy říci, že zatím co rezidua U1 a U2 mění v MD simulaci svoji geometrii jen málo, u zbylých dvou reziduí se jejich uspořádání změní výrazně, a to hned v první nanosekundě simulace. To může znamenat, že struktura 1JU7 vykazuje výrazné pnutí. To může být buď důsledkem nesprávně popsanych simulačních podmínek (od struktury 1KKS se liší hlavně koncentrací a typem kationtů a pH, avšak tyto odlišnosti jsou velmi malé), nebo tím, že byla NMR data nesprávně strukturně interpretována. Mé simulace ale nemohou tuto otázku jednoznačně odpovědět.

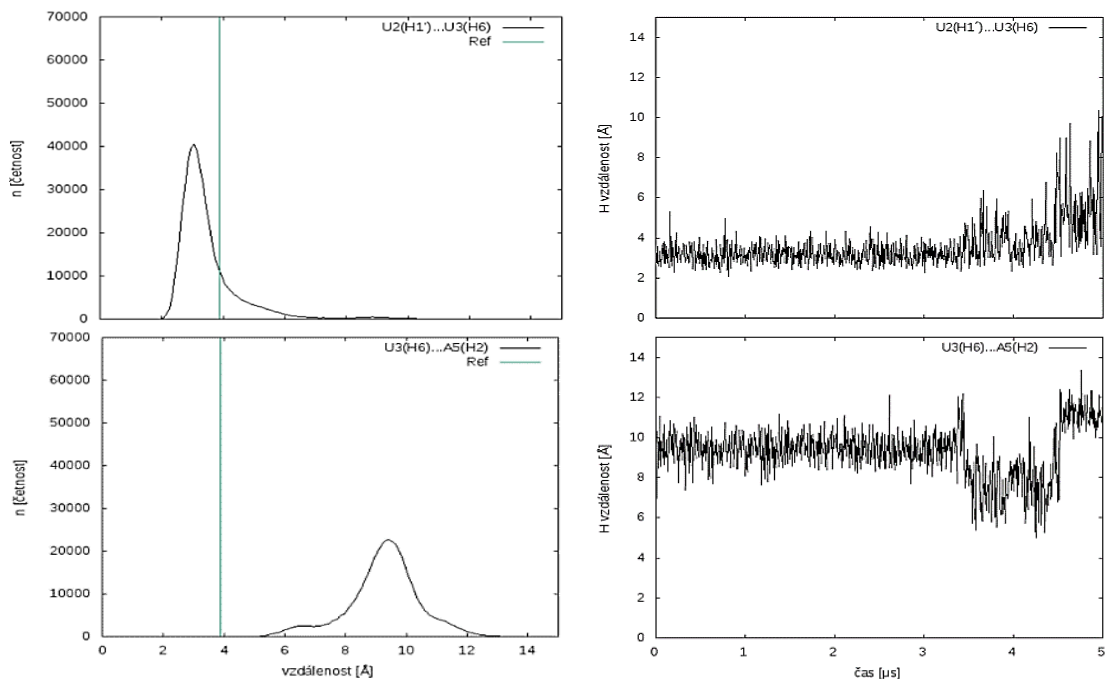
Grafy 8. Pro U1, histogram H vzdáleností se zobrazenou referenční hodnotou z 1JU7 MNR NOE (vlevo) a délka H vazby v průběhu simulace (vpravo).



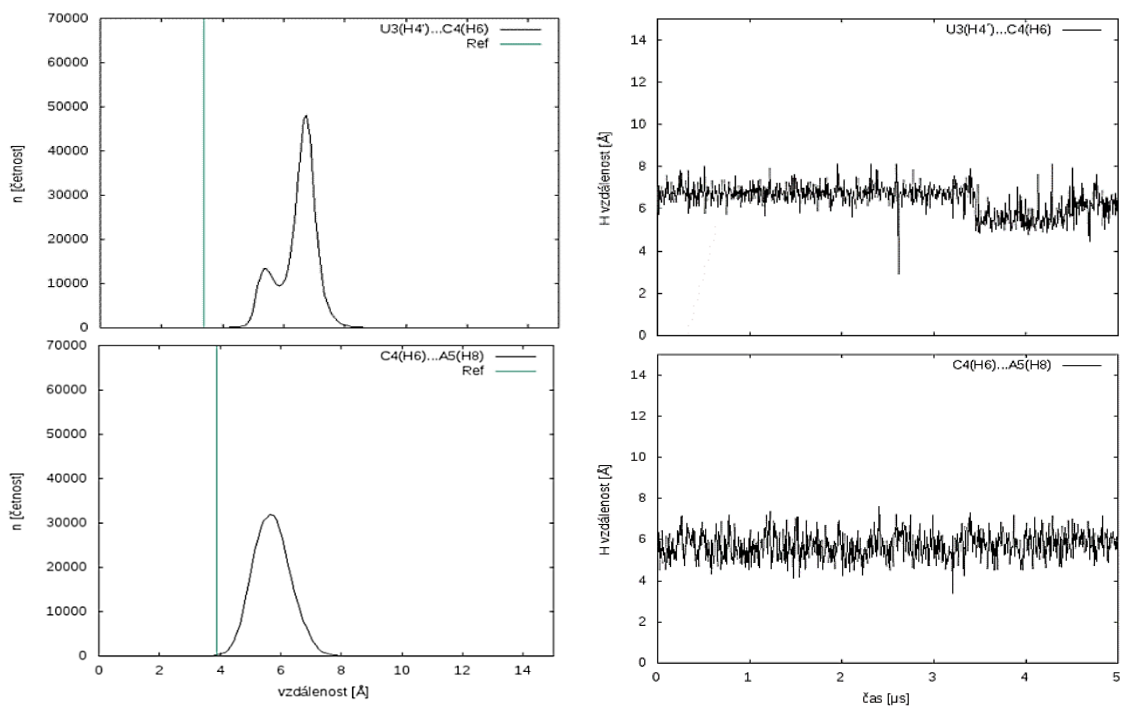
Grafy 9. Pro U2, histogram H vzdáleností se zobrazenou referenční hodnotou z 1JU7 MNR NOE (vlevo) a délka H vazby v průběhu simulace (vpravo).



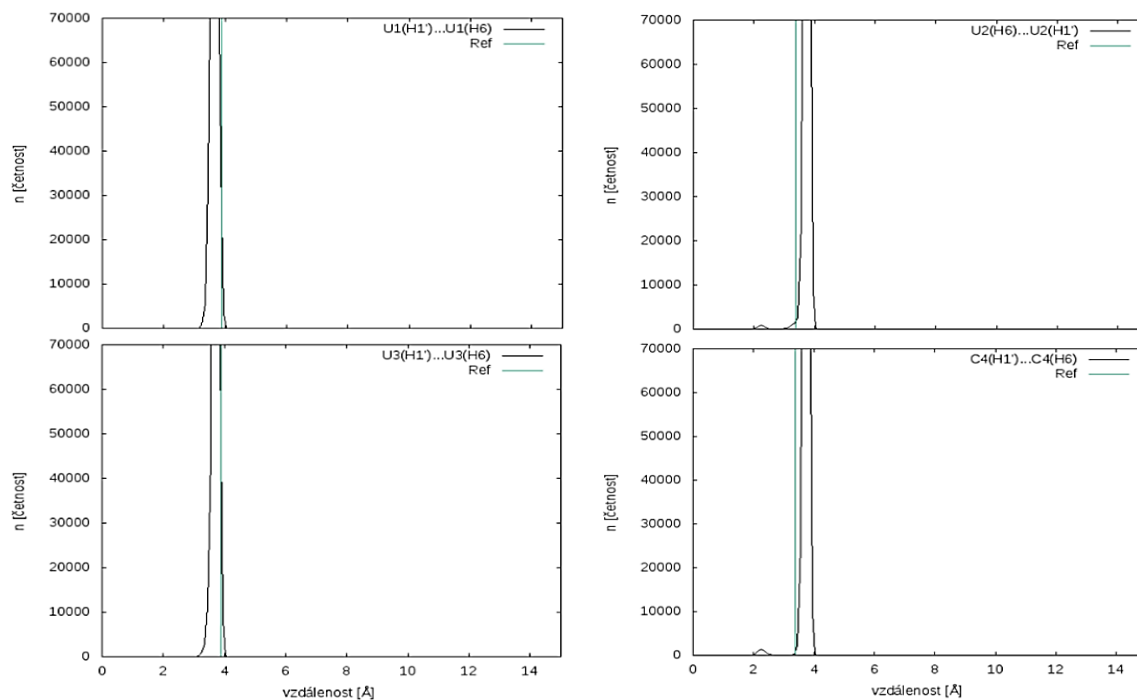
Grafy 10. Pro U3, histogram H vzdáleností se zobrazenou referenční hodnotou z 1JU7 MNR NOE (vlevo) a délka H vazby v průběhu simulace (vpravo).



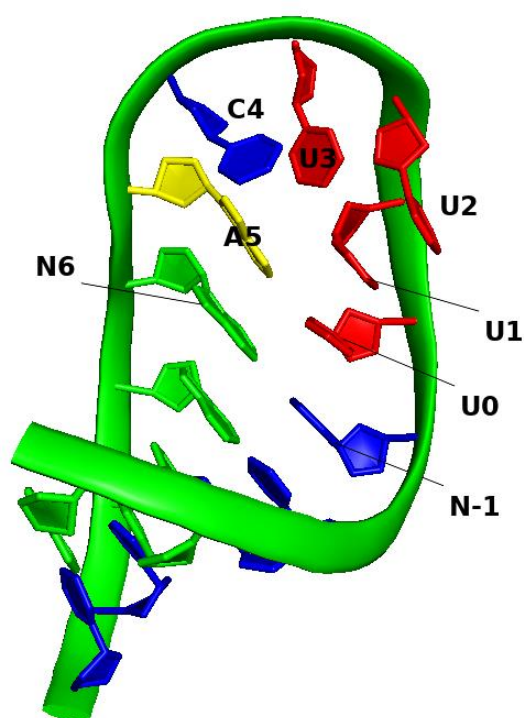
Grafy 11. Pro C4, histogram H vzdáleností se zobrazenou referenční hodnotou z 1JU7 MNR NOE (vlevo) a délka H vazby v průběhu simulace (vpravo).



Grafy 12. Zobrazení *syn/anti* H vzdáleností a četnosti těchto vzdáleností pro rezidua UUUC (viz. Tabulka 1) a zobrazená referenční hodnota z 1JU7 MNR NOE.



Obrázek 26. Zobrazení struktury 1JU7 z MD ze 2011 ns, jakožto reprezentativní konformace.



10.3.5 1KKS

Simulace 1KKS byla prováděna s řetězem o počtu 12 reziduí, kde tvořilo 8 bází 4 kanonické páry, které v simulaci stabilizovaly celou molekulu.

I zde prakticky okamžitě po začátku simulace došlo ke změně konformace, i když poměrně nepatrné, avšak během simulace docházelo na čas i k větším posunům, jak prezentuje RMSD viz. Grafy 1.

U1: U tohoto rezidua zůstávají obě naměřené H vzdálenosti delší, než ve struktuře 1JU7. Avšak i přesto se jeho poloha vůči U3 výrazně nemění a stále dochází ke stackové interakci (viz. Grafy 13). Tato interakce udržuje U1 na svém místě. Během simulace docházelo i k uvolnění rezidua do roztoku, avšak po většinu času zůstalo nystackované a tím vytvářelo větší stabilitu dané konformace. *Anti* poloha zůstává zachována i když u tohoto rezidua dochází k největším změnám co se týče *syn/anti* polohy jak vidno z Grafy 17.

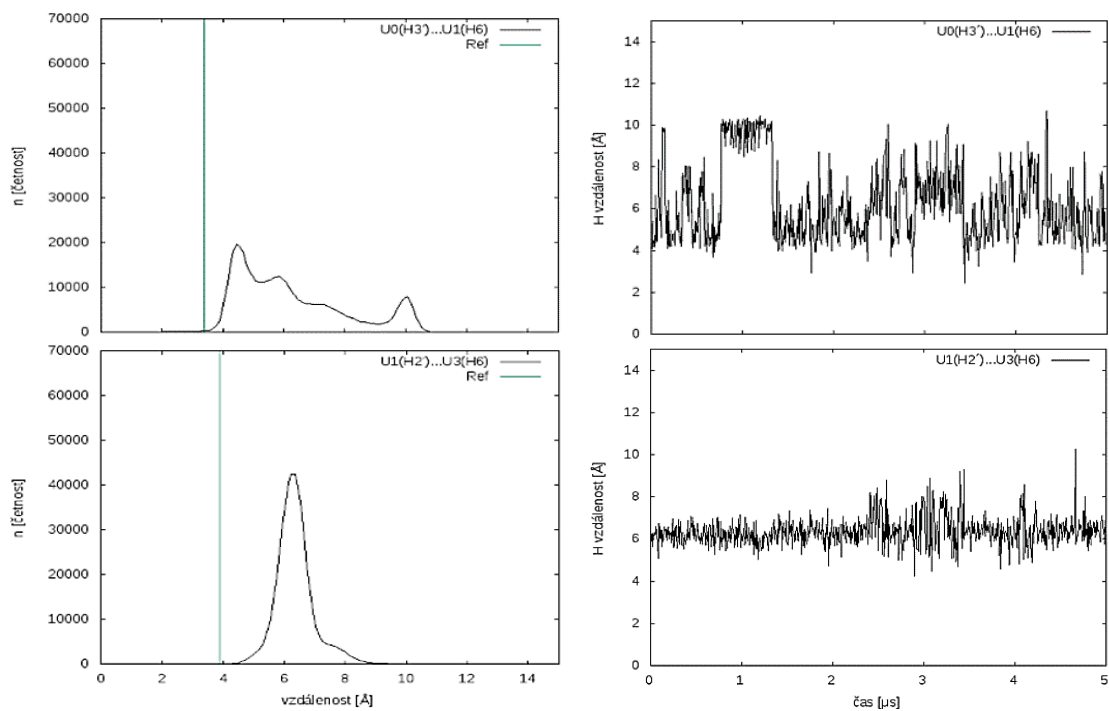
U2: Ze vzdálenosti U1(H4')...U2(H6) je vidno, že dochází ke značným posunům rezidua U2 ve žlábkku (viz. Grafy 14). I přes tyto výrazné posuny, kdy lze usuzovat, že se U2 snaží najít co nejvhodnější polohu, zůstává zaklíněno ve žlábkku, v němž se stabilizuje pomocí interakcí s U0 a A5. Zajímavé je, že vzdálenost U2(H2')...U3(H6) je v lepší shodě s 1JU7 experimentem, než simulace 1JU7 struktury. Struktura 1KKS tedy zde může být lepší interpretací experimentu, než struktura 1JU7. Dle Grafů 17, lze vidět, že i toto reziduum zůstává v poloze *anti*.

U3: Podobně jako 4QOZ i zde se U3 stackuje s A5 a U2 (viz. Obr. 26). Jeho poloha zůstává prakticky celou simulace nezměněna (viz. Grafy 15). Proto, lze usuzovat to uspořádání za velmi stabilní. Stejně jako u U2, i zde jsou naměřené vzdálenosti v lepší shodě s 1JU7 experimentem, než u simulace 1JU7 a mohou tedy být lepší interpretací 1JU7 experimentálních dat. *Anti* poloha zůstává zachována viz. Grafy 17.

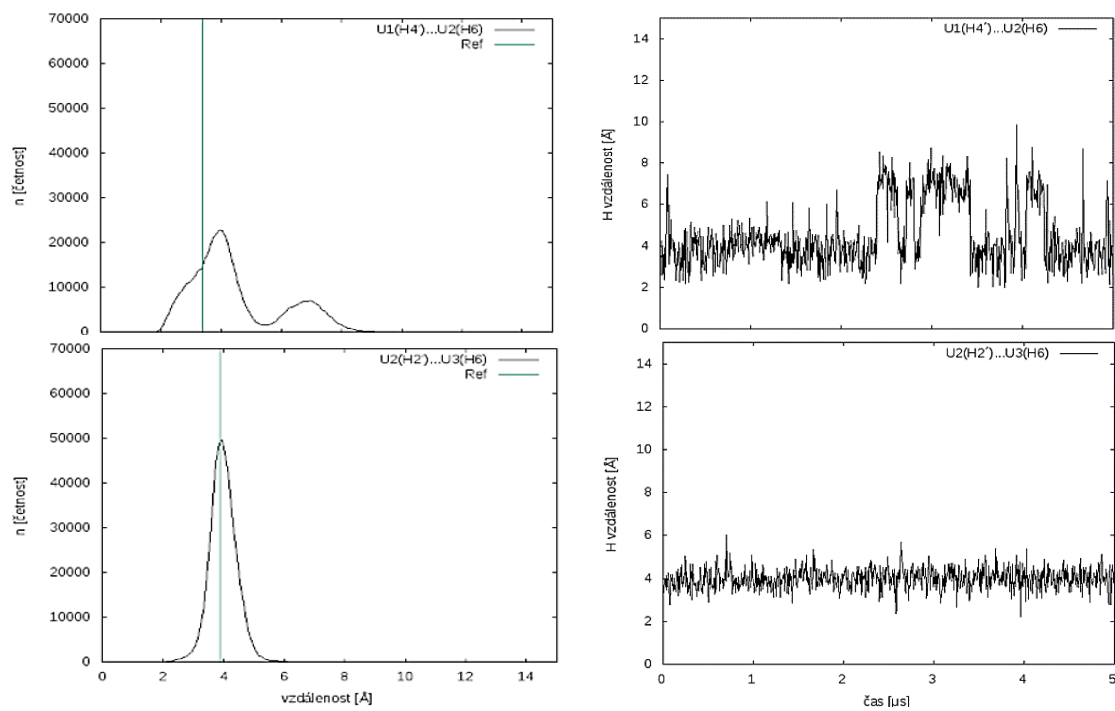
C4: Ze vzdáleností U3(H4')...C4(H6) a C4(H6)...A5(H8) (viz. Grafy 16) je možno vyčíst, že C4, není stabilní ve své výchozí konformaci a neustále se pohybuje vůči všem ostatním reziduí. Avšak i přes tento pohyb si vybírá jako nejstabilnější polohu exponovanou do roztoku. I v tomto případě zůstává v poloze *anti* viz. Grafy 17.

Celkově se dá říci, že MD simulace vycházející se struktury 1KKS splňuje restry naměřené pro rezidua U2 a U3 ve struktuře 1JU7 lépe, než struktura 1JU7. Pro ostatní rezidua jsou rozdíly srovnatelné.

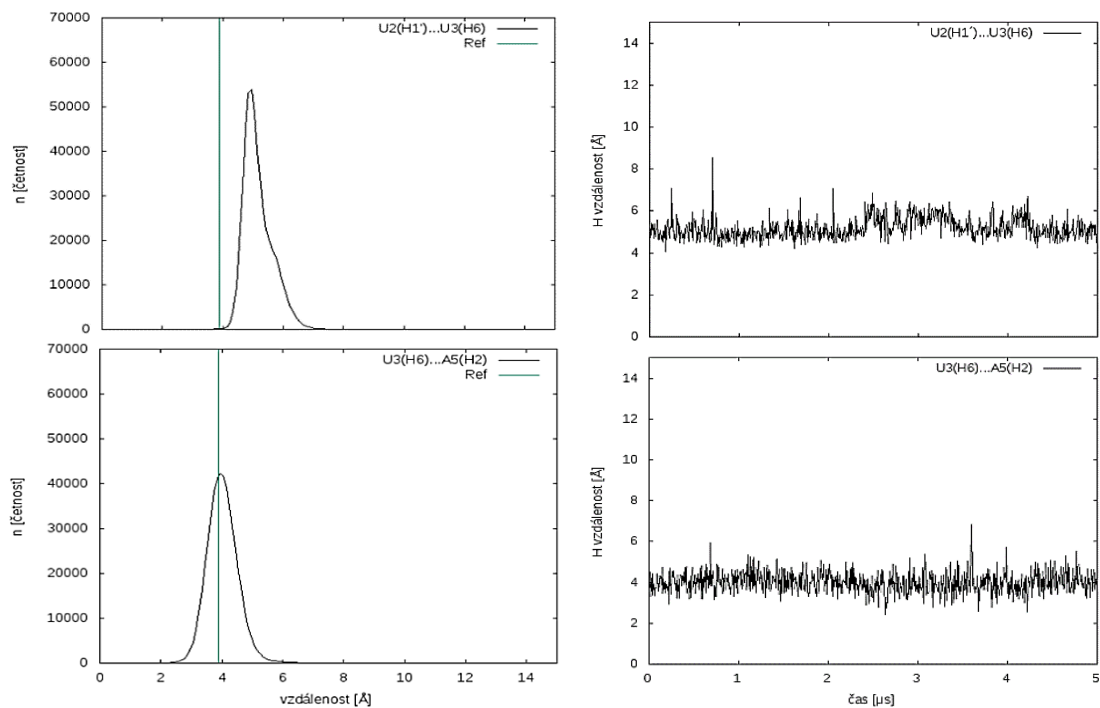
Grafy 13. Pro U1, histogram H vzdáleností se zobrazenou referenční hodnotou z 1JU7 MNR NOE (vlevo) a délka H vazby v průběhu simulace (vpravo).



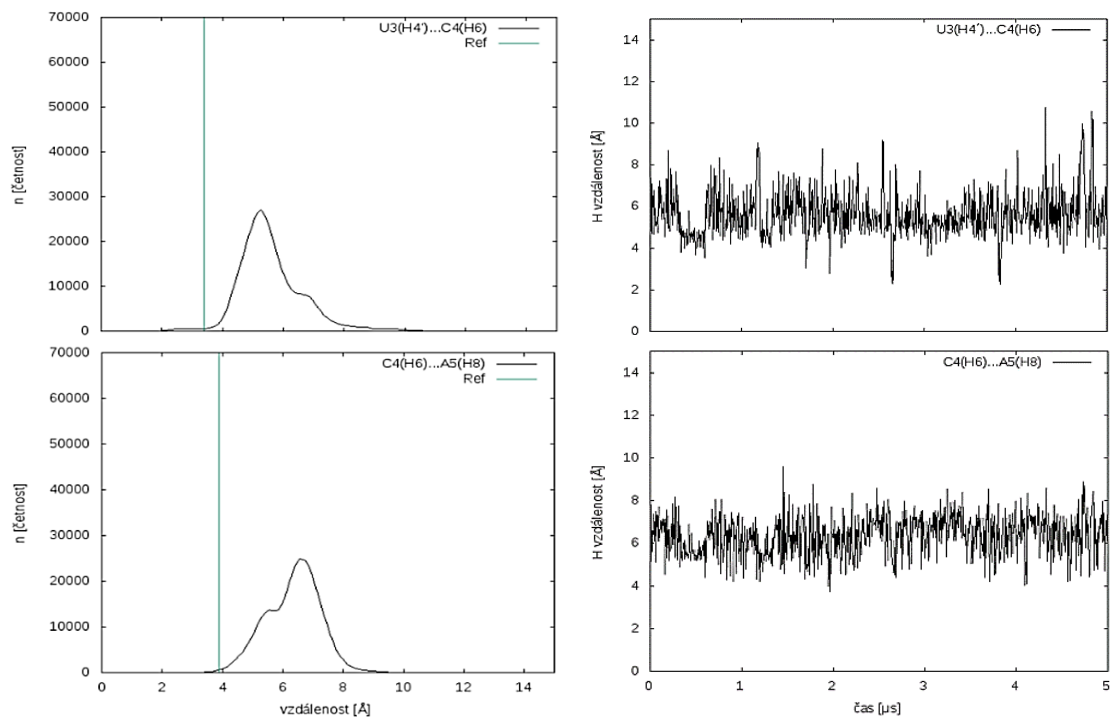
Grafy 14. Pro U2, histogram H vzdáleností se zobrazenou referenční hodnotou z 1JU7 MNR NOE (vlevo) a délka H vazby v průběhu simulace (vpravo).



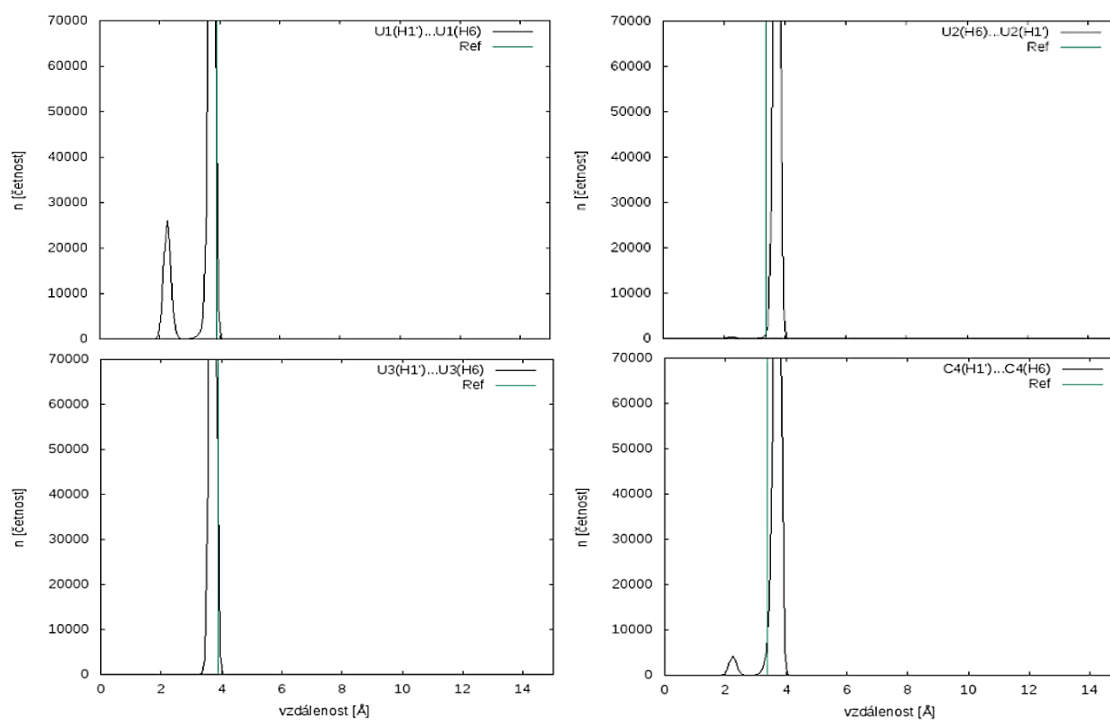
Grafy 15. Pro U3, histogram H vzdáleností se zobrazenou referenční hodnotou z 1JU7 MNR NOE (vlevo) a délka H vazby v průběhu simulace (vpravo).



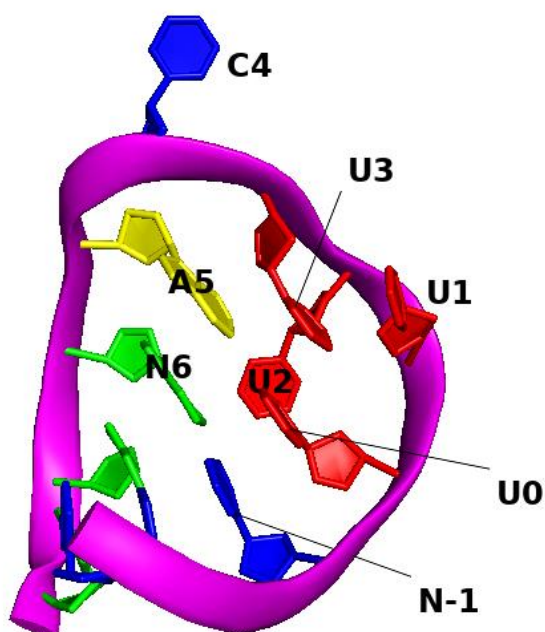
Grafy 16. Pro C4, histogram H vzdáleností se zobrazenou referenční hodnotou z 1JU7 MNR NOE (vlevo) a délka H vazby v průběhu simulace (vpravo).



Grafy 17. Zobrazení *syn/anti* H vzdáleností a četnosti těchto vzdáleností pro rezidua UUUC (viz. Tabulka 1) a zobrazená referenční hodnota z 1JU7 MNR NOE.



Obrázek 27. Zobrazení struktury 1KKS z MD ze 2158 ns, jakožto reprezentativní konformace.



10.4. Porovnání

10.4.1 4QOZ

U této molekuly nedošlo, dle Obr. 28 a Tabulky 3 k výraznějším změnám v poloze daných reziduí. I přesto lze nějaké nalézt. Největší změnou je postavení U2, který se v průměrném (oranžovém) zobrazení posunul více do žlábků, ve kterém se více uchytil pomocí interakcí s U0 zatím co od A5 se vzdálil. Dále je možné si všimnout posunu C4 oproti původnímu stavu, a to polohy, kde je ještě ve větším tupém úhlu oproti postavení A5. Také je pozorovatelný silnější stack mezi U1 a U3, kdy se U1 více zapojilo, co mezibazických interakcí, zatímco v původní struktuře byl U1 mnohem víc vychlípený do prostoru. V neposlední řadě se posunula cukrfosfátová páteř mezi U0 a U3, což lze vysvětlit tak, že páteř zaujala výhodnější postavení tak, aby se U1 a U2 mohly lépe zapojit do vzájemných interakcí s U0 a U3. Všechny tyto změny lze vysvětlit tím, že ve struktuře 4QOZ byla zmiňovaná rezidua v kontaktu s blízkými aminokyselinami, kdežto po jejich odstranění musela v MD simulaci hledat nová, energeticky výhodnější, umístění.

10.4.2 1JU7

Ze začátku MD simulace nejsou rozdíly od výchozí struktury 1JU7 příliš velké, kromě vzdálenosti U3(H6)...A5(H2). Tento markantní posun z 5 na 9,4 Å je možné vysvětlit tak, že U3 zaujal jinou polohu vůči A5. V původní struktuře se U3 stackoval na A5 zatím co v simulaci se pootočil kolem své vlastní osy tak, že začal více interagovat s nově přístupným C4. Z tohoto důvodu se H6 ocitl směrem vně smyčky, a tudíž skoro zdvojnásobil svou interakční vzdálenost s H2 rezidua A5. C4 se posunul tak, že začal interagovat s U3 a A5, čímž stabilizoval svou pozici, a to až do té doby, než se simulace začala přibližovat struktuře 1KKS. Došlo i k mírnému posunu U1 a U2, ale zdá se, že to nijak zvlášť neovlivnilo postavení dalších bází, kromě změny postavení cukrfosfátové páteře, která se tímto exponuje více do roztoku.

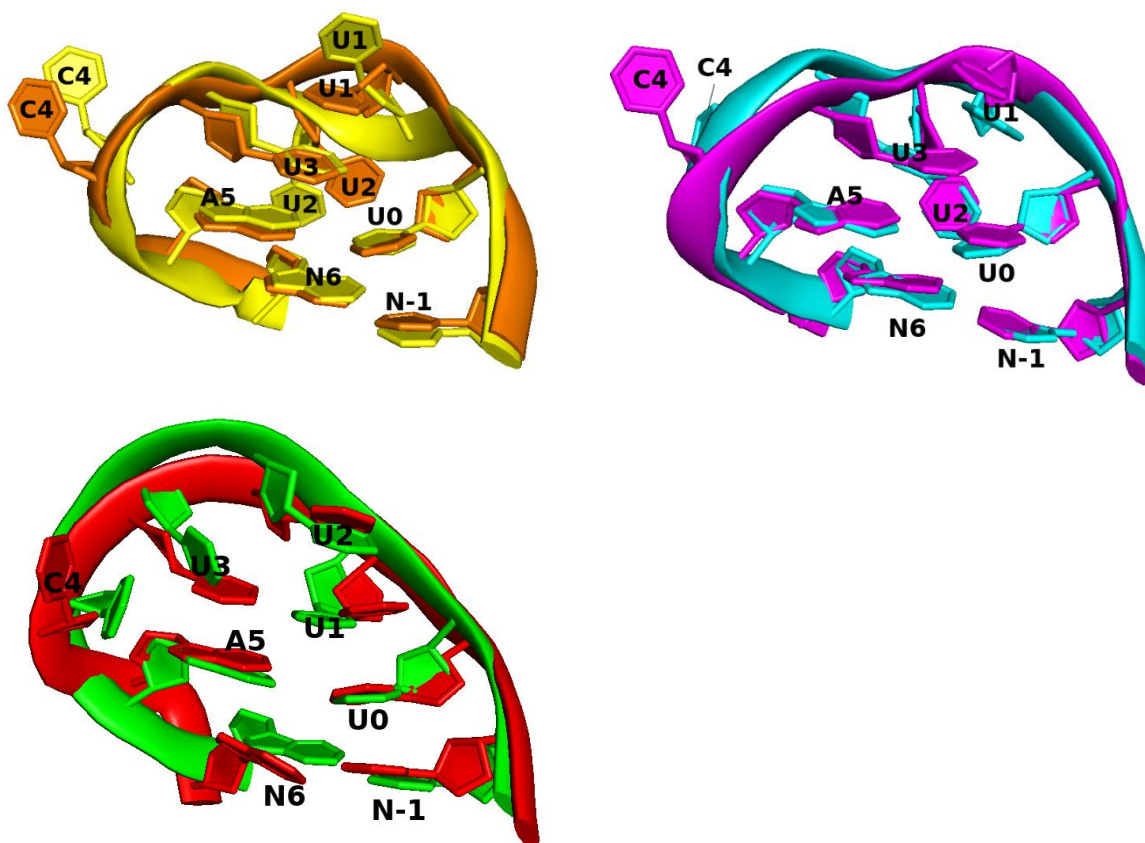
10.4.3 1KKS

Zde došlo k mírnému posunu U1 a U3, a to v takovém směru, že ve struktuře z MD tato dvojice posunula více mimo centrum ostatních bází, především pak U1. Je možné odhadovat, že U3 se dostal do takové pozice aby, mohl interagovat i s U0 pro větší stabilizaci. Následující změnou je též poloha C4. Tento uračil změnil svou polohu téměř o 90°. Mohlo by také docházet k interakci s fosfátovými zbytky z předešlého rezidua.

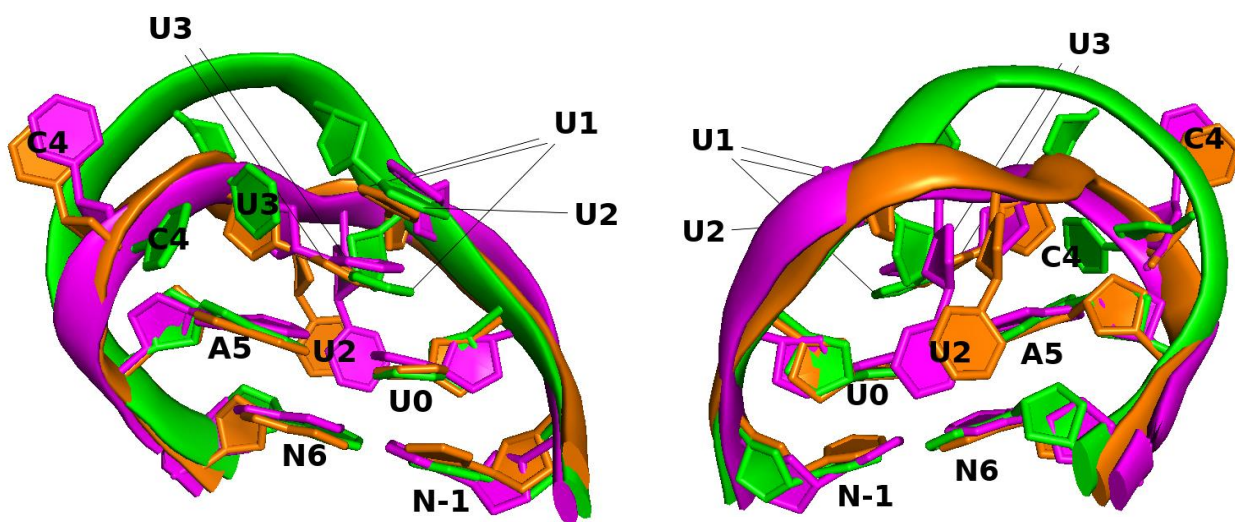
10.4.4 Rozdíly u reprezentativních struktur

Obr. 29 a Tabulka 2, 3 ukazují rozdíly mezi simulovanými molekulami 4QOZ, 1KKS a 1JU7 (srovnání reprezentativních struktur, viz výše). Je možné pozorovat mírné rozdíly mezi 4QOZ a 1KKS, především pak u posunu U2 a C4. Toto lze vysvětlit pomocí změny geometrie cukrfošátové páteře, která se mírně pootočila. Oproti tomu 1JU7 zaujímá zcela jiné uspořádání v prostoru, kdy se cukrfošátová páteř tolik nedeformuje a vytváří méně deformovanou smyčku. To se podepisuje i na postavení bází. Tedy že U2 nezaujímá polohu ve žlábkku, ale naopak je přesně na druhé straně a interaguje s pomocí stacku s U1. U 4QOZ a 1KKS stejné místo jako U1 v 1JU7 zaujímá U2. Také U3 a C4 jsou výrazně posunuty, a to směrem dovnitř smyčky.

Obrázek 28. Srovnání 8 reziduí ve sktrukturách 4QOZ PDB – žlutá s 4QOZ MD – oranžová, dále 1KKS PDB – tyrkysová s 1KKS MD – fialová a 1JU7 PDB – červená s 1JU7 MD – zelená



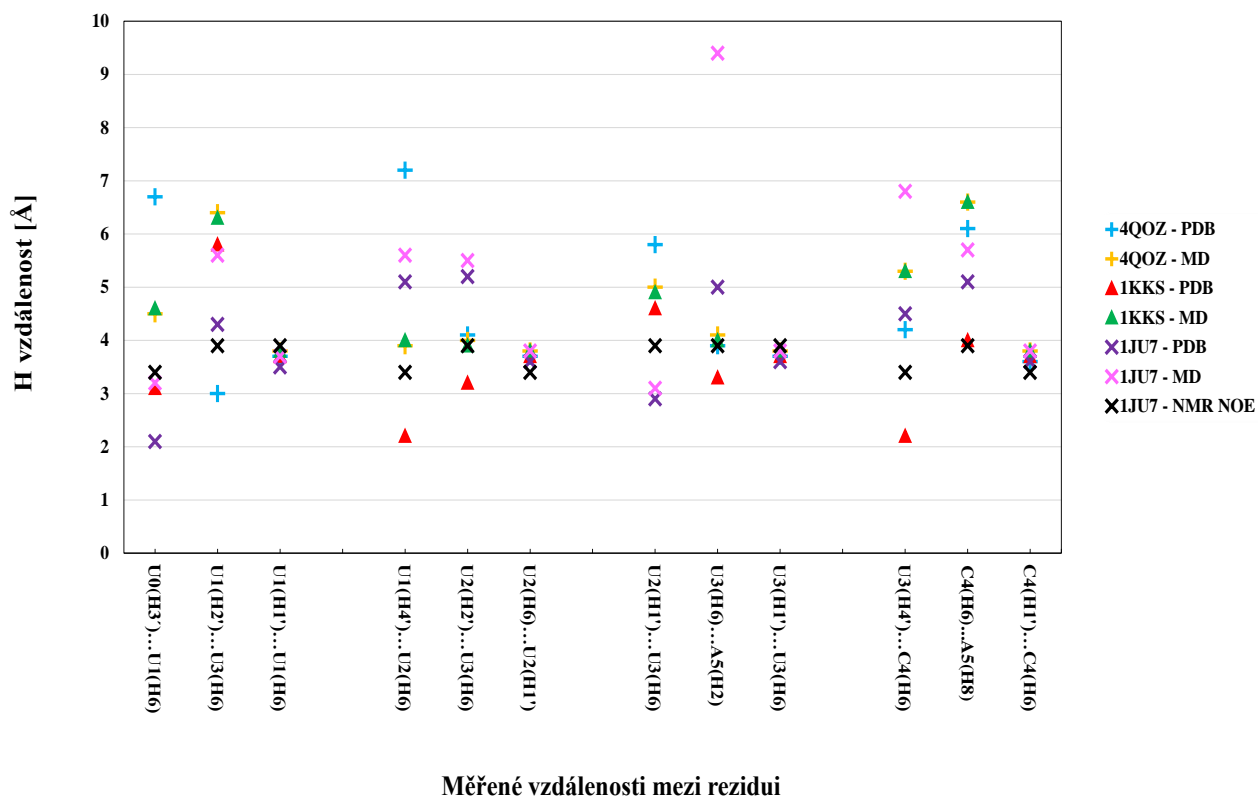
Obrázek 29. Překryv 8 reziduí (viz. Tabulka 1.) z MD a to 4QOZ – oranžová, 1KKS – fialová, 1JU7 – zelená



Tabulka 2. Popis H vzdálenosti a jejich naměřené hodnoty pro struktury 4QOZ, IKKS a 1JU7 (U PDB jsou zobrazeny vzdálenosti z prvního snímku u MD jsou zobrazeny vzdálenosti s nejvyšší četností). Barva řádků odpovídá barvě H vzdáleností značených v Obr. 20

| Reziduum | H vzdálenosti použité v BP | H vzdálenosti [Å] | | | | | | | |
|-------------|----------------------------|-------------------|-----------|------------|-----------|------------|-----------|----------------|--|
| | | 4QOZ - PDB | 4QOZ - MD | IKKS - PDB | IKKS - MD | 1JU7 - PDB | 1JU7 - MD | 1JU7 - NMR NOE | |
| U1 | U0(H3')...U1(H6) | 6,7 | 4,5 | 3,1 | 4,6 | 2,1 | 3,2 | 3,4 | |
| U1 | U1(H2')...U3(H6) | 3 | 6,4 | 5,8 | 6,3 | 4,3 | 5,6 | 3,9 | |
| syn/anti U1 | U1(H1')...U1(H6) | 3,7 | 3,8 | 3,7 | 3,8 | 3,5 | 3,7 | 3,9 | |
| U2 | U1(H4')...U2(H6) | 7,2 | 3,9 | 2,2 | 4 | 5,1 | 5,6 | 3,4 | |
| U2 | U2(H2')...U3(H6) | 4,1 | 4 | 3,2 | 3,9 | 5,2 | 5,5 | 3,9 | |
| syn/anti U2 | U2(H6)...U2(H1') | 3,7 | 3,8 | 3,7 | 3,8 | 3,6 | 3,8 | 3,4 | |
| U3 | U2(H1')...U3(H6) | 5,8 | 5 | 4,6 | 4,9 | 2,9 | 3,1 | 3,9 | |
| U3 | U3(H6)...A5(H2) | 3,9 | 4,1 | 3,3 | 4 | 5 | 9,4 | 3,9 | |
| syn/anti U3 | U3(H1')...U3(H6) | 3,7 | 3,8 | 3,7 | 3,8 | 3,6 | 3,8 | 3,9 | |
| C4 | U3(H4')...C4(H6) | 4,2 | 5,3 | 2,2 | 5,3 | 4,5 | 6,8 | 3,4 | |
| C4 | C4(H6)...A5(H8) | 6,1 | 6,6 | 4 | 6,6 | 5,1 | 5,7 | 3,9 | |
| syn/anti C4 | C4(H1')...C4(H6) | 3,6 | 3,8 | 3,7 | 3,8 | 3,6 | 3,8 | 3,4 | |

Tabulka 3. Zobrazení hodnot H vzdáleností pro všech 12 zvolených vzdáleností. Pro PDB soubory byly měřeny vzdálenosti v první deponované struktuře, u MD ve struktuře s nejvyšší četností vzdáleností z grafů 3-17



ZÁVĚR

Ribonukleová kyselina je jednou ze základních biochemických molekul, ze které jsou složeni i subvirální agenti – Viroidy. Viroidy by mohly být jedny z prvních „živých“ molekul na Zemi a předchůdci komplexnějšího života. Jednou z možností studia struktury RNA je molekulová dynamika. Tato výpočetní technika může popsat mnoho nejrůznějších parametrů zkoumaného systému. Podle použitého silového pole se jednotlivé výsledky mohou lišit. V této práci bylo pro studium části struktury viroidů využito silové pole OL3 s explicitním rozpouštědlem a modelem vody SPC/E.

V této práci byly pomocí dynamických simulací zkoumány tři molekuly RNA. Všechny byly simulovány po dobu 5 μ s a bylo u nich zkoumáno chování v roztoku a změna konformace. Především se tato práce zaměřila na změnu polohy jednotlivých reziduí v tetraloopu UUUC, a to za pomoci H vzdáleností mezi vodíky jednotlivých bází a jejich ribóz a také vizuálním porovnáním simulovaných struktur s těmi, z nichž MD simulace vycházely.

Vstupní struktura 4QOZ ve výchozím komplexu interagovala s proteinem. Proto byl vysloven předpoklad, že při odstranění tohoto proteinu a následné simulaci v roztoku 0,15 M KCl dojde k výrazné změně konformace. Tento předpoklad se však nesplnil a smyčka UUUC zůstala velmi podobná výchozímu stavu. Dále byla simulována struktura 1KKS v roztoku Na⁺ iontů. I v tomto případě zůstaly jednotlivé báze smyčky v podobných polohách jako ve výchozí struktuře. Obě molekuly RNA, 4QOZ i 1KKS, v simulovaném roztoku zaujaly velmi podobné konformace, kdy se U1 a U3 stackují na předešlá a následující rezidua U0 a A5, zatímco U2 nachází stabilní pozici ve žlábků a C4 se volně pohybuje v roztoku mimo smyčku.

Třetí simulovaná struktura 1JU7 byla jediná, pro kterou byla dostupná NMR data (restrains), avšak tyto hodnoty se značně lišily od hodnot vzdáleností v PDB souboru struktury 1JU7, a také od výsledků simulace. 1JU7 byla simulována v roztoku 0,15 M KCl. Na začátku simulace se dle RMSD konformace 1JU7 jen málo vzdálila od výchozího stavu. Rezidua UUUC v této molekule vytváří interakce mezi sebou a to tak, že U1 je nastackovaný na U0 a dále se na U1 stackuje na U2. Báze U3 a C4 vykazují interakce mezi sebou, navzájem a také interakci s A5, což je pravděpodobně důvod, proč

tvoří tuto stabilní konformaci. I přesto, že po většinu času simulace se 1JU7 drželo svého výchozího stavu, došlo mezi 4 a 5 μ s k tomu, že se U2 začal uvolňovat z interakcí s ostatními bázemi a pravděpodobně se pokoušel najít si novou stabilní pozici, ve které by se přiblížil strukturám 1KKS a 4QOZ. K tomu však nedošlo ani po prodloužení doby simulace na dvojnásobek. I když by se konformace sktruktury 1JU7 mohla s delším časem simulace více přiblížit strukturám 4QOZ a 1KKS, nelze to konstatovat s jistotou.

Výsledkem této práce je zjištění, že smyčka UUUC v roztoku nabývá dvou hlavních možných konformací, přičemž je pravděpodobné, že uspořádání ve strukturách 4QOZ a 1KKS je výhodnější, minimálně pak pro protein 3'hExo, který byl v původní krystalové struktuře 4QOZ, a to i přesto, že RMSD 1JU7 vykazuje po 2/3 simulace hodnoty okolo 2 Å, zatímco 4QOZ a 1KKS nabývají hodnot podstatně vyšších (3-4 Å), a především pak 1KKS vykazuje poměrně silnou kolísavost. Dále je zajímavé, že výsledky MD simulace 1KKS mají větší shodu se vzdálenostmi naměřenými pro NMR strukturu 1JU7 než samotná simulace 1JU7. To by mohlo, společně s výše popsanou tendencí struktury 1JU7 měnit konformaci směrem ke struktuře 1KKS, naznačovat, že NMR struktura 1JU7 nebyla autory správně strukturně interpretována a struktura 1KKS je lepším modelem pro tetraloop UUUC v roztoku.

Protein 3'hExo tedy interaguje s danou smyčkou UUUC v jen málo změněné geometrii a specifita interakce je proto určena hlavně konformací smyčky UUUC v její rovnovážné geometrii. Na hlubší prozkoumání tohoto fenoménu z hlediska termodynamiky interakce však prozatím nemáme dostatek dat, a proto by byl potřeba další výzkum. Tato práce by mohla poskytnout větší vhled do chování UUUC tetraloopu v roztoku, což by mohlo být prospěšné ve zkoumání viroidní RNA a jiných RNA řetězců obsahujících tento charakteristický strukturní motiv.

SUMMARY

Ribonucleic acid is one of the basic biochemical molecules of which subviral agents - Viroids - are composed. Viroids could be some of the first "living" molecules on Earth and the precursors to more complex life. One way to study the structure of RNA is through molecular dynamics. This computational technique can describe many different parameters of the system under study. Depending on the force field used, individual results may vary. In this work, the OL3 force field with explicit solvent and the SPC/E water model was used to study part of the viroid structure.

In this work, three RNA molecules were investigated using dynamic simulations. All of them were simulated for 5 μ s and their behavior in solution and conformation change were investigated. In particular, this work focused on the change in position of each residue in the UUUC tetraloop, using the H distances between the hydrogens of each base and their ribose, as well as by visually comparing the simulated structures with those underlying the MD simulations.

The initial structure of 4QOZ in the starting complex interacted with the protein. Therefore, it was hypothesized that when this protein was removed and then simulated in 0.15 M KCl solution, a significant conformational change would occur. However, this assumption was not met and the UUUC loop remained very similar to the initial state. Next, the structure of 1KKS was simulated in Na⁺ ion solution. Again, the individual bases of the loop remained in similar positions as in the initial structure. Both RNA molecules, 4QOZ and 1KKS, adopted very similar conformations in the simulated solution, with U1 and U3 stacking on the upstream and downstream residues U0 and A5, while U2 found a stable position in the groove and C4 moved freely in solution outside the loop.

The third simulated structure, 1JU7, was the only one for which NMR data (restraints) were available, but these values differed significantly from the distance values in the PDB file of structure 1JU7, and also from the simulation results. 1JU7 was simulated in a 0.15 M KCl solution. At the beginning of the simulation, according to RMSD, the conformation of 1JU7 was only slightly away from the initial state. The UUUC residues in this molecule interact with each other in such a way that U1 is stacked

on top of U0 and further stacks on top of U1 to form U2. Bases U3 and C4 show interactions with each other, each other and also interact with A5, which is probably why they form this stable conformation. Even though 1JU7 held on to its initial state for most of the simulation time, between 4 and 5 μ s, U2 started to relax from interactions with the other bases and probably tried to find a new stable position in which it would approach the 1KKS and 4QOZ structures. However, this did not happen even after extending the simulation time to twice as long. Although the conformation of the 1JU7 structure could become more similar to the 4QOZ and 1KKS structures with longer simulation time, this cannot be stated with certainty.

As a result of this work, it is found that the UUUC loop takes on two main possible conformations in solution, with the 4QOZ and 1KKS structures likely to be the preferred arrangement, at least for the 3'hExo protein, which was in the original 4QOZ crystal structure, even though the RMSD of 1JU7 shows values around 2 Å after 2/3 of the simulation, while 4QOZ and 1KKS take values much higher (3-4 Å), and especially 1KKS shows a rather strong fluctuation. Furthermore, it is interesting to note that the MD results of the 1KKS simulation are in better agreement with the distances measured for the NMR structure of 1JU7 than the 1JU7 simulation itself. This, together with the above described tendency of the 1JU7 structure to change conformation towards the 1KKS structure, could suggest that the NMR structure of 1JU7 was not correctly structurally interpreted by the authors and the 1KKS structure is a better model for the tetraloop UUUC in solution.

Thus, the 3'hExo protein interacts with a given UUUC loop in only a slightly altered geometry, and the specificity of the interaction is therefore mainly determined by the conformation of the UUUC loop in its equilibrium geometry. However, we do not yet have enough data to investigate this phenomenon more deeply in terms of the thermodynamics of the interaction, and therefore further research would be needed. This work could provide greater insight into the behavior of the UUUC tetraloop in solution, which could be beneficial in the study of viroid RNA and other RNA chains containing this characteristic structural motif.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] JAVAUX Emmanuelle J. Challenges in evidencing the earliest traces of life. *Nature*. 2019, **572**(7770).
- [2] PACE Norman R. The universal nature of biochemistry. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001, **98**(3), 805-808.
- [3] BETTS Holly C., PUTTICK Mark N., CLARK James W., WILLIAMS Tom A., DONOGHUE Philip C. J. a PISANI Davide. Integrated genomic and fossil evidence illuminates life's early evolution and eukaryote origin. *Nature Ecology & Evolution*. 2018, **2**(10), 1556-1562.
- [4] SHELDON Robert B., HOOVER Richard B., LEVIN Gilbert V., ROZANOV Alexei Y. a GLADSTONE G. Randall. Historical development of the distinction between bio – and abiogenesis. *Proceedings of SPIE – The International Society for Optical Engineering*. 2005, **5906**, 444–456.
- [5] BAILEY, J. Origin Of Life. *Encyclopedia of Geology*. Elsevier, 2005, 123-130.
- [6] Life. *Encyclopedia Britannica* [online]. 2023 [cit. 2023-04-28]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/life>
- [7] TSOKOLOV, Serhiy A. Why Is the Definition of Life So Elusive? Epistemological Considerations. *Astrobiology*. 2009, **9**(4), 401-412.
- [8] PREINER Martina, ASCHE Silke, BECKER Sidney, et al. The Future of Origin of Life Research: Bridging Decades-Old Divisions. *Life*. 2020, **10**(3), 1-23.
- [9] BENNER Steven A. Defining Life. *Astrobiology*. 2010, **10**(10), 1021-1030.
- [10] About Life Detection. *Astrobiology at NASA: LIFE IN THE UNIVERSE* [online]. Washington, D.C.: NASA Official [cit. 2023-04-28]. Dostupné z: <https://astrobiology.nasa.gov/research/life-detection/about/>
- [11] Definice života: Biologické definice. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit.

2023-04-28]. Dostupné z:

https://cs.wikipedia.org/wiki/Definice_%C5%BEivota#cite_note-MSN-20120111-21

- [12] KOONIN Eugene V. Comparative genomics, minimal gene-sets and the last universal common ancestor. *Nature Reviews Microbiology*. 2003, **1**(2), 127-136.
- [13] JOHNSON Adam P., H. CLEAVES James, DWORKIN Jason P., GLAVIN Daniel P., LAZCANO Antonio a BADA Jeffrey L. The Miller Volcanic Spark Discharge Experiment. *Science*. 2008, **322**(5900), 404-404.
- [14] COLÍN-GARCÍA María, HEREDIA Alejandro a CORDERO Guadalupe. Hydrothermal vents and prebiotic chemistry: a review. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana*. 2016, **68**(3), 599-620.
- [15] MARTIN William, BAROSS John, KELLEY Deborah a RUSSELL Michael J. Hydrothermal vents and the origin of life. *Nature Reviews Microbiology*. 2008, **6**(11), 805-814.
- [16] DAMER Bruce a DEAMER David. The Hot Spring Hypothesis for an Origin of Life. *Astrobiology*. 2020, **20**(4), 429-452.
- [17] OBA Yasuhiro, KOGA Toshiki, TAKANO Yoshinori, et al. Uracil in the carbonaceous asteroid (162173) Ryugu. *Nature Communications*. 2023, **14**(1), 1-9.
- [18] *Comets and the Origin of Life* [online]. 5 Toh Tuck Link, Singapore 596224: World Scientific Publishing Co. Pte., 2009 [cit. 2023-04-28]. ISBN 978-981-256-635-5. Dostupné z:
http://alpha.sinp.msu.ru/~panov/LibBooks/LIFE/10972_legalreads.com.pdf
- [19] NEVEU Marc, KIM Hyo-Joong a BENNER Steven A. The “Strong” RNA World Hypothesis: Fifty Years Old. *Astrobiology*. 2013, **13**(4), 391-403.
- [20] ROBERTSON M. P. a JOYCE G. F. The Origins of the RNA World. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2012, **4**(5), 1-24.
- [21] BECKER Sidney, SCHNEIDER Christina, CRISP Antony a CARELL Thomas. Non-canonical nucleosides and chemistry of the emergence of life. *Nature Communications*. 2018, **9**(1), 1-4.

- [22] Viroids: Chapter Version: ICTV Ninth Report; 2009 Taxonomy Release. *International Committee on Taxonomy of Viruses: ICTV* [online]. Owens, c2023 [cit. 2023-04-28]. Dostupné z: https://ictv.global/report_9th/subviral/Viroids
- [23] VERHOEVEN Jacobus Th.J. *Identification and epidemiology of pospiviroids* [online]. Wageningen, 2010 [cit. 2023-04-28]. Dostupné z: <https://edepot.wur.nl/137571>. Diplomová práce. Wageningen University.
- [24] FLORES Ricardo, OWENS R.A. a TATUSOVA. T. Viroids. In: *Encyclopedia of Virology*. Elsevier. 2008, s. 332-342.
- [25] OWENS Robert a HAMMOND Rosemarie. Viroid Pathogenicity: One Process, Many Faces. *Viruses*. 2009, **1**(2), 298-316.
- [26] FLORES Ricardo, GAGO-ZACHERT Selma, SERRA Pedro, SANJUÁN Rafael a ELENA Santiago F. Viroids: Survivors from the RNA World? *Annual Review of Microbiology*. 2014, **68**(1), 395-414.
- [27] *RNA: life's indispensable molecule* [online]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2011 [cit. 2023-04-28]. ISBN 978-1-936113-19-4. Dostupné z: <https://archive.org/details/rnalifesindispen0000darn/page/n11/mode/2up>
- [28] MCCOWN Phillip J., RUSZKOWSKA Agnieszka, KUNKLER Charlotte N., BREGER Kurtis, HULEWICZ Jacob P., WANG Matthew C., SPRINGER Noah A. a BROWN Jessica A. Naturally occurring modified ribonucleosides. *WIREs RNA*. 2020, **11**(5), 1-71.
- [29] VELIKOVSKÁ Ivana. *Analýza chování silových polí při simulacích DNA a RNA* [online]. Olomouc, 2010 [cit. 2023-4-28]. Dostupné z: <https://theses.cz/id/6tenav/74040-111222688.pdf>. Diplomová práce. Univerzita Palackého Přírodovědecká fakulta.
- [30] Struktura nukleotidu. In: *WikiSkripta* [online]. Praha: 1. lékařské fakulty a Univerzity Karlovy, 2022 [cit. 2023-04-28]. Dostupné z: <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/b/b9/Nucleotides.png/1920px-Nucleotides.png>

- [31] RAIN, Medha a IBBA Michael. TRNAs as regulators of biological processes. *Frontiers in Genetics*. 2014, **5**, 1-14.
- [32] VAN LINT Sandra, HEIRMAN Carlo, THIELEMANS Kris a BRECKPOT Karine. MRNA. mRNA. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 2014, **9**(2), 265-274.
- [33] BRIMACOMBE R. a STIEGE W. Structure and function of ribosomal RNA. *Biochemical Journal*. 1985, **229**(1), 1-17.
- [34] LEONTIS Neocles B. a WESTHOF Eric. The Annotation of RNA Motifs. *Comparative and Functional Genomics*. 2002, **3**(6), 518-524.
- [35] SVOBODA P. a CARA A. Di. Hairpin RNA: a secondary structure of primary importance. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2006, **63**(7-8), 901-908.
- [36] LIM Chun Shen a BROWN Chris M. Know Your Enemy: Successful Bioinformatic Approaches to Predict Functional RNA Structures in Viral RNAs. *Frontiers in Microbiology*. 2018, **8**(2582), 1-19.
- [37] HUANG Lin a LILLEY David M.J. The Kink Turn, a Key Architectural Element in RNA Structure. *Journal of Molecular Biology*. 2016, **428**(5), 790-801.
- [38] DOSTÁL, Jakub. *Molekulárně-dynamické simulace analog nukleových kyselin* [online]. 2006 [cit. 2023-04-28]. Dostupné z: https://dspace.cuni.cz/bitstream/handle/20.500.11956/6426/BPTX_2005_1_11320_NSZZ027_219992_0_43258.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Bakalářská práce. Univerzita Karlova v Praze Matematicko-fyzikální fakulta.
- [39] CHEONG Chaejoon a CHEONG Hae-Kap. RNA Structure: Tetraloops. *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. Chichester: John Wiley, 2010, 1-8.
- [40] THAPAR Roopa, DENMON Andria P. a NIKONOWICZ Edward P. Recognition modes of RNA tetraloops and tetraloop-like motifs by RNA-binding proteins. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*. 2014, **5**(1), 49-67.
- [41] DE LA PEÑA Marcos, NAVARRO Beatriz a FLORES Ricardo. Mapping the molecular determinant of pathogenicity in a hammerhead viroid: A tetraloop

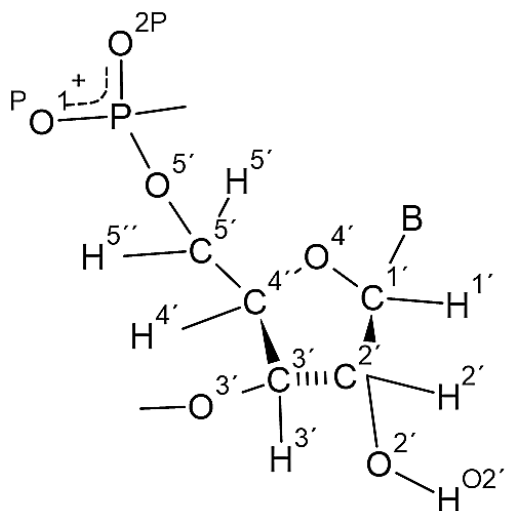
- within the in vivo branched RNA conformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999, **96**(17), 9960-9965.
- [42] DEJONG Eric S., MARZLUFF William F. a NIKONOWICZ Edward P. NMR structure and dynamics of the RNA-binding site for the histone mRNA stem-loop binding protein. *RNA*. 2002, **8**(1), 83-96.
- [43] STEGER Gerhard. Modelling the three-dimensional structure of the right-terminal domain of pospiviroids. *Scientific Reports*. 2017, **7**(1), 1-12.
- [44] ZANIER Katia, LUYTEN Ingrid, CROMBIE Catriona, MÜLLER Berndt, SCHÜMPERLI Daniel, LINGE Jens P., NILGES Michael a SATTLER Michael. Structure of the histone mRNA hairpin required for cell cycle regulation of histone gene expression. *RNA*. 2002, **8**(1).
- [45] NMR Spectroscopy Principles, Interpreting an NMR Spectrum and Common Problems. *Technology Networks* [online]. 2023 [cit. 2023-04-28]. Dostupné z: <https://www.technologynetworks.com/analysis/articles/the-pulse-psychedelic-news-from-technology-networks-issue-3-372830>
- [46] CANET Daniel. *Nuclear magnetic resonance: Concepts and Methods* [online]. Chichester; New York: John Wiley, 1996 [cit. 2023-05-02]. Dostupné z: <https://archive.org/details/nuclearmagneticr0000cane/mode/2up>
- [47] FÜRTIG Boris, RICHTER Christian, WÖHNERT Jens a SCHWALBE Harald. NMR Spectroscopy of RNA. *ChemBioChem*. 2003, **4**(10), 936-962.
- [48] HOLLINGSWORTH Scott A. a DROR Ron O. Molecular Dynamics Simulation for All. *Neuron*. 2018, **99**(6), 1129-1143.
- [49] MELLER Jarosaw. Molecular Dynamics. *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. 2001, 1-8.
- [50] GELPI Joseph, HOSPITAL Adam, GOÑI Ramón a OROZCO Modesto. Molecular dynamics simulations: advances and applications. *Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry*. 2015, 37-47.
- [51] CORNELL Wendy D., CIEPLAK Piotr, BAYLY Christopher I., et al. A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules. *Journal of the American Chemical Society*. 1995, **117**(19), 5179-5197.

- [52] HORNAK Viktor, ABEL Robert, OKUR Asim, STROCKBINE Bentley, ROITBERG Adrian a SIMMERLING Carlos. Comparison of multiple Amber force fields and development of improved protein backbone parameters. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 2006, **65**(3), 712-725.
- [53] WANG Junmei, WOLF Romain M., CALDWELL James W., KOLLMAN Peter A. a CASE David A. Development and testing of a general amber force field. *Journal of Computational Chemistry*. 2004, **25**(9), 1157-1174.
- [54] MALÝ Marek. *Molekulární modelování I* [online]. [cit. 2023-04-28]. Dostupné z: http://physics.ujep.cz/~mmaly/vyuka/NANO_DESIGN/opora/MolekularniModelovani_I.pdf
- [55] JORGENSEN William L., CHANDRASEKHAR Jayaraman, MADURA Jeffry D., IMPEY Roger W. a KLEIN Michael L. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *The Journal of Chemical Physics*. 1983, **79**(2), 926-935.
- [56] BERENDSEN H. J. C., GRIGERA J. R. a STRAATSMA T. P. The missing term in effective pair potentials. *The Journal of Physical Chemistry*. 1987, **91**(24), 6269-6271.
- [57] ZGARBOVÁ Marie, OTYEPKA Michal, ŠPONER Jiří, MLÁDEK Arnošt, BANÁŠ Pavel, CHEATHAM Thomas E. a JUREČKA Petr. 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*. 2011, **7**(9), 2886-2902.
- [58] JOUNG In Suk a CHEATHAM Thomas E. Determination of Alkali and Halide Monovalent Ion Parameters for Use in Explicitly Solvated Biomolecular Simulations. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2008, **112**(30), 9020-9041.
- [59] JOUNG In Suk a CHEATHAM Thomas E. Molecular Dynamics Simulations of the Dynamic and Energetic Properties of Alkali and Halide Ions Using Water-Model-Specific Ion Parameters. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2009, **113**(40), 13279-13290.
- [60] The Amber Force Fields. *The Amber Project* [online]. 2023 [cit. 2023-04-28]. Dostupné z: <https://ambermd.org/AmberModels.php>

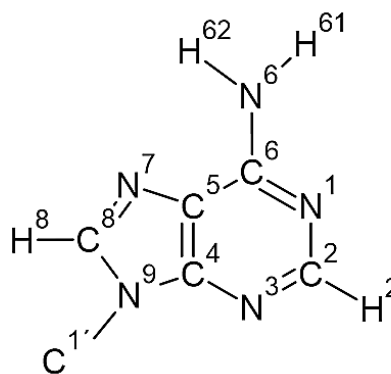
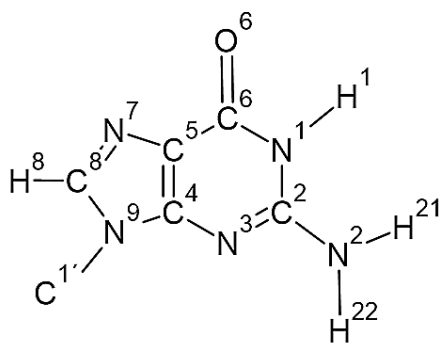
- [61] FEENSTRA K. Anton, HESS Berk a BERENDSEN Herman J. C. Improving efficiency of large time-scale molecular dynamics simulations of hydrogen-rich systems. *Journal of Computational Chemistry*. 1999, **20**(8), 786-798.
- [62] HOPKINS Chad W., LE GRAND Scott, WALKER Ross C. a ROITBERG Adrian E. Long-Time-Step Molecular Dynamics through Hydrogen Mass Repartitioning. *Journal of Chemical Theory and Computation*. 2015, **11**(4), 1864-1874.
- [63] *RCSB Protein Data Bank* [online]. [cit. 2023-04-28]. Dostupné z: <https://www.rcsb.org/>
- [64] VMD: Visual molecular dynamics. *Theoretical and Computational Biophysics Group* [online]. [cit. 2023-04-28]. Dostupné z: <https://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>
- [65] *PyMOL by Schrödinger* [online]. c2023 [cit. 2023-04-28]. Dostupné z: <https://pymol.org/2/>
- [66] *Gnuplot homepage* [online]. 2023 [cit. 2023-04-28]. Dostupné z: <http://www.gnuplot.info/>

PŘÍLOHY

Příloha 1.: Forforibóza s atomovými jmény



Příloha 2.: Guanin (vlevo) a Adenin (vpravo) s atomovými jmény



Příloha 3.: Cytosin (vlevo) a Uracil (vpravo) s atomovými jmény

