

Strukturní bioinformatika – nukleové kyseliny II

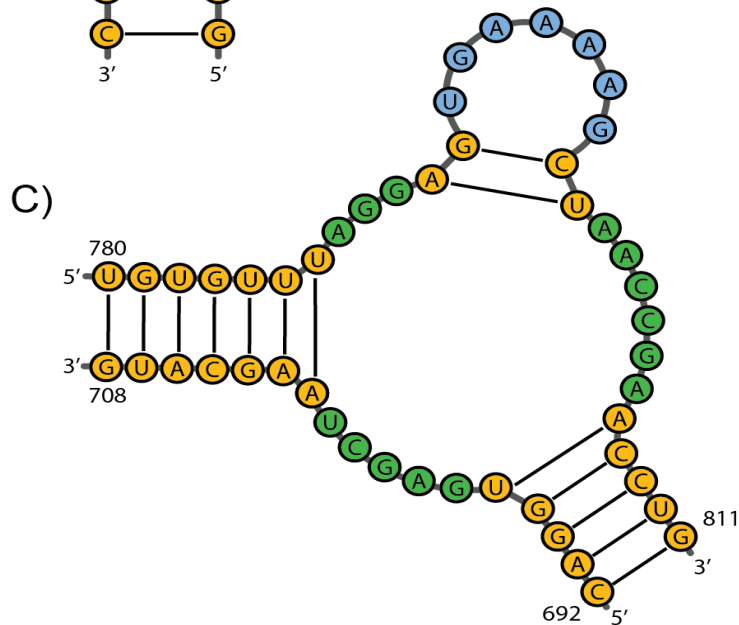
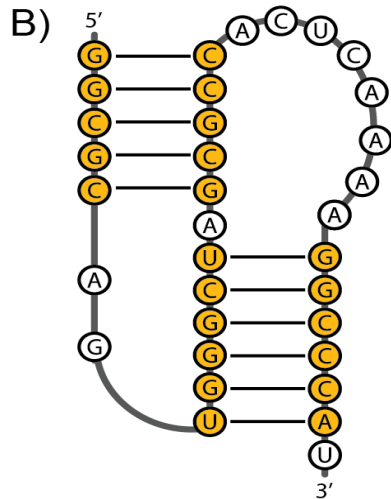
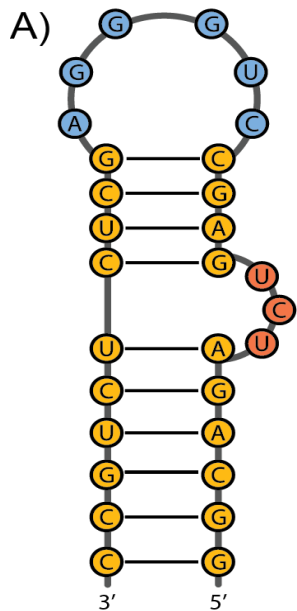
Olomouc, 22.11.2023

RNDr. Miroslav Krepl, Ph.D.

RNA struktury

- RNA strukturně rozmanitá stejně jako proteiny
 - 2-OH' hydroxylová skupina (H akceptor i donor) -> nekanonické interakce
- Často uváděna jako „jednovláknová“ ale tvoří struktury -> folduje se sama na sebe
- A-forma helixu, největší podíl kanonické A/U, G/C páry + G/U wobble pár – 3. kanonický pár u RNA
- Kanonické úseky A-RNA přerušovány úseky nekanonických interakcí (až 1/3) – loopy, bulge

RNA struktury



- Nekanonické úseky v diagramech často formálně nespárované
- Většinou přesně definovaná struktura
- A) Vlásoková smyčka (hairpin loop) + interní smyčka (bulge),
- B) pseudoknot
- C) three-way junction

Rekurentní RNA motivy

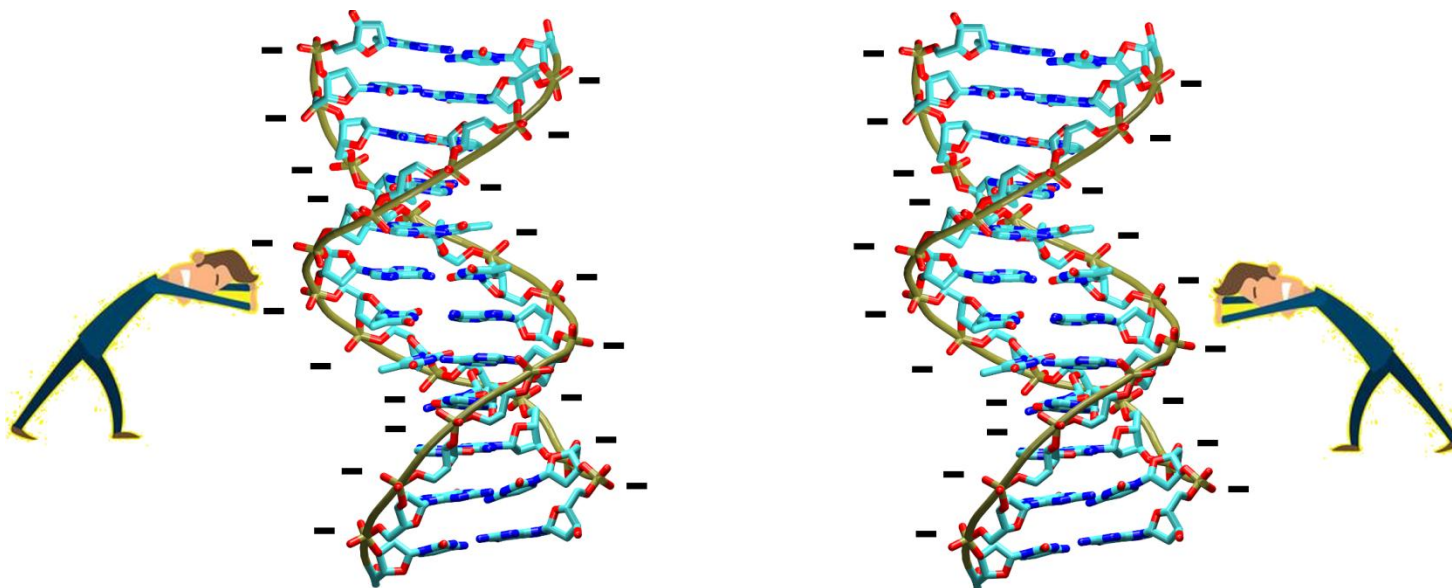
- Nekanonické RNA motivy se často opakují, mají konzervovanou strukturu – **rekurentní motivy**
 - GNRA, UNCG tetraloops
 - Kink-turn, sarcin-ricin loop, kissing-loop
- Zajišťují změnu směru RNA řetězce, folding, a další fyzikálně-chemické vlastnosti

3D strukturní porovnání

- Stejná sekvence RNA může tvořit naprosto odlišné struktury – absence jednoznačné sekundární struktury jako u proteinů
- Nutno uvažovat v kontextu 3D a nejenom o sekvencích (s výjimkou kovariance)
- **FR3D web server** (geometric; symbolic search)
 - Uses Leontis geometrical definitions
 - Allows search of both known and unknown structures (or even hypothetical structures)

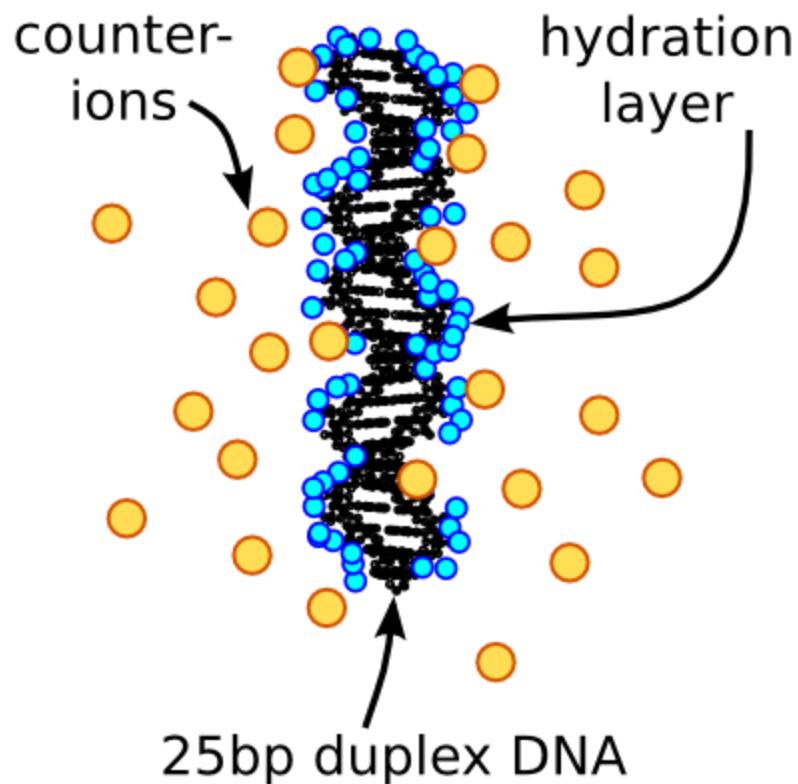
Vyšší strukturní celky NK

- Jak se nukleové kyseliny sbalují?
 - Řetězec NK má charakter polyaniontu → shlukování osamocených NK vyloučeno elektrostatickou interakcí



Vyšší strukturní celky NK

- NK v roztoku vždy obklopena kladnými ionty (proti-ionty)



- Kladné ionty neutralizují repulsi od záporně nabitě páteře
- Ionty od NK neoddělitelné – hovoří se o „iontové atmosféře“
- **Důležitá otázka pro experimenty:** *Je moje nukleová kyselina stabilní při dané koncentraci iontů v roztoku?*
- Koncentrace iontů (iontová síla) je důležitým vstupním parametrem pro programy predikující vlastnosti NK
 - **Implicitní** vs. **explicitní** popis

Vyšší strukturní celky NK

- V živých buňkách vstupuje do hry důležitý hráč
- **proteiny**



- DNA téměř vždy a RNA vždy interaguje v živých buňkách s proteiny
- Proteiny zajišťují expresi, opravy, rekombinaci, transkripci (DNA); ochranu, sestřih, transport, translaci (RNA)
- Drtivá většina DNA v buňce je sbalena (rozuměj, ve vazbě s proteiny)
- Osamocená RNA je okamžitě zničena buňkou (pravděpodobně se jedná o virus...)

Protein/NK komplexy

- Jak proteiny interagují s NK?
 - Využití stejných molekulárních interakcí jako u protein/protein, protein/ligand, či NA/NA interakcí
 - Elektrostatické interakce – solné můstky, vodíkové vazby, Hydrofobní interakce, Disperzní síly (stacking)

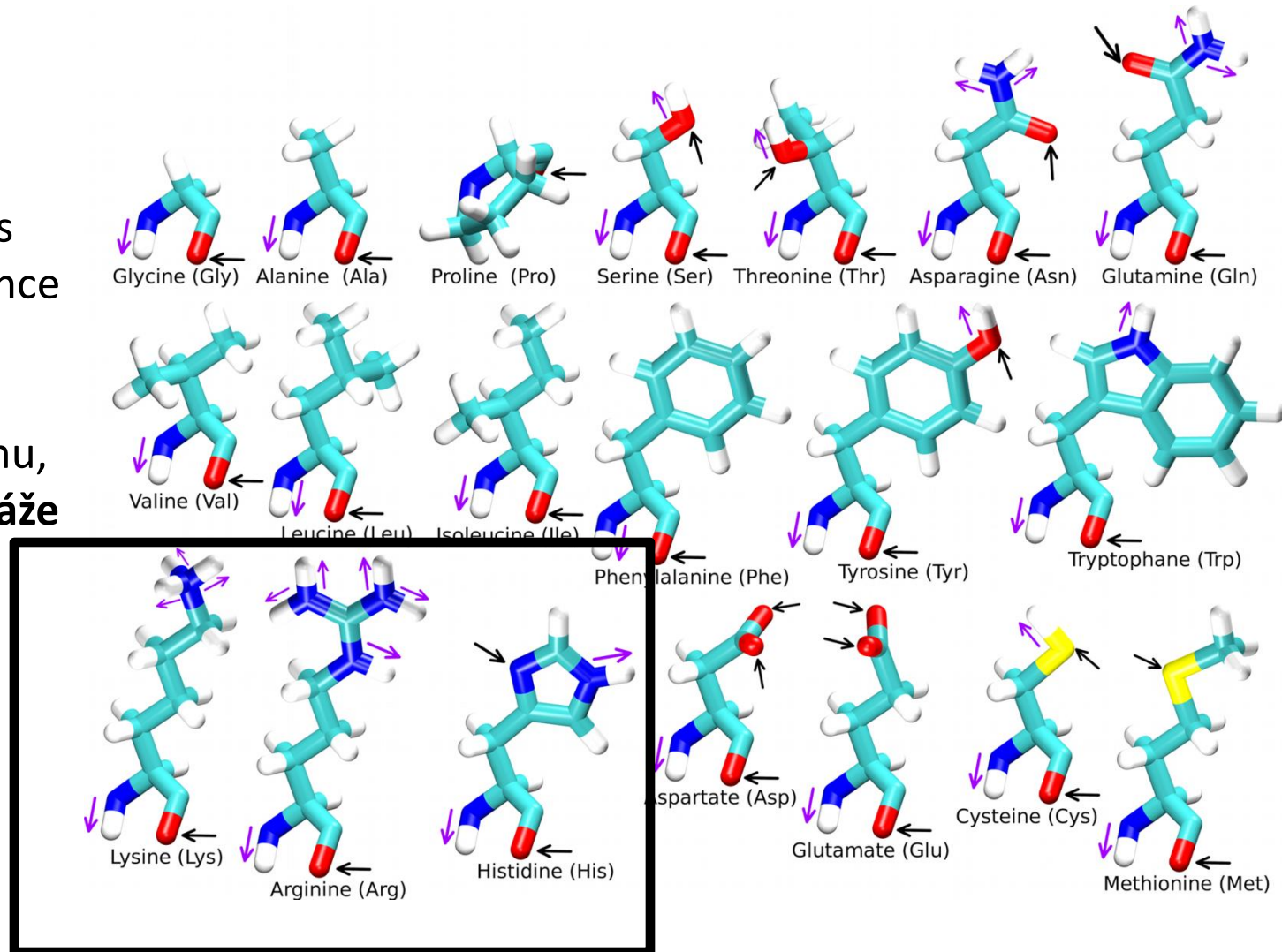
Protein/NK komplexy

- Elektrostatické interakce – solné můstky
 - Z principu velmi důležité pro NK (charakter polyaniontu) → proteiny částečně nahrazují iontovou atmosféru
 - Jsou dalekodosahové a nespecifické, velký podíl na celkové volné energii komplexu
 - → *každá chyba ve výpočetním modelu vede k obrovským odchylkám*

- predikce interakce s NK na základě sekvence proteinu

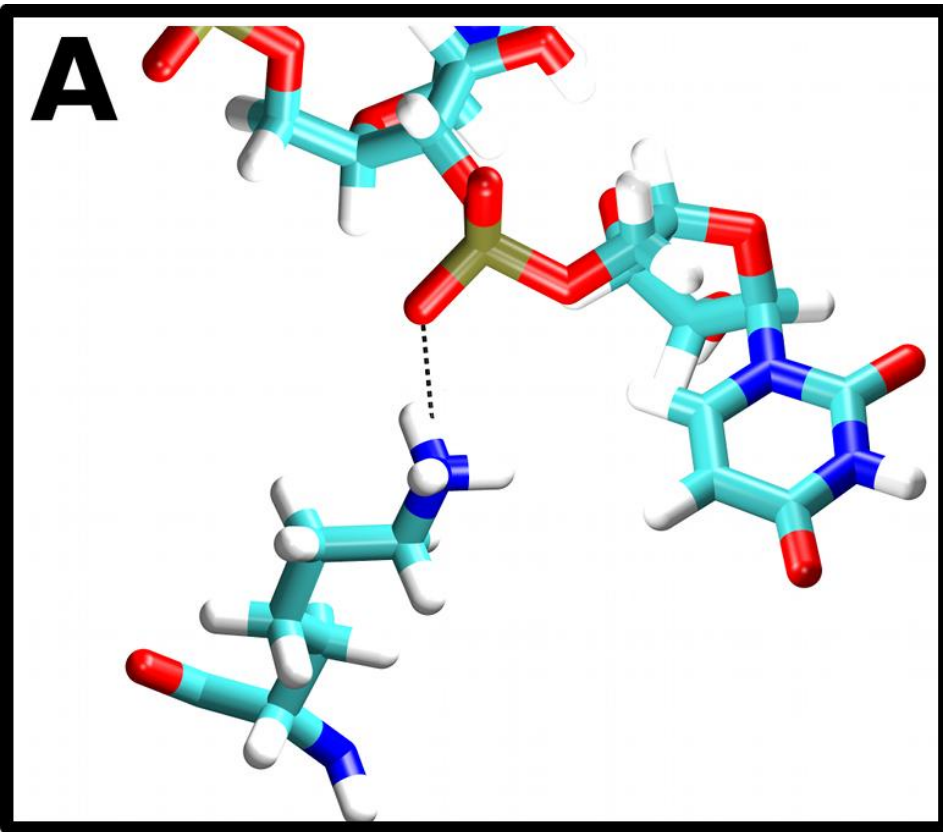
- vysoký podíl argininu, lysinu, histidinu → **váže NK**

- užitečné při automatických analýzách genomu



Protein/NK komplexy

- Elektrostatické interakce – solné můstky



- Síla solného můstku ovlivněna koncentrací volných iontů v roztoku → vazba proteinu na NK vytěsňuje ionty z jejího okolí
- Predikce stability protein/NK v daném experimentálním roztoku

Protein/NK komplexy

- Elektrostatické interakce – solné můstky
 - Elektrostatická interakce zásadní v iniciační fázi vzniku protein/NK interakce (opačné náboje „přitáhnou“ molekuly k sobě)
 - Elektrostatické interakce z principu nespecifické (jakýkoliv protein vázající NK bude přitahován k libovolné NK)
 - Po přiblížení proteinu a NK nastupují další interakce – vodíkové vazby, vdW → kratší dosah, ale specifické
 - Elektrostatická interakce může být „nepřímo“ specifická – rozpoznání tvaru

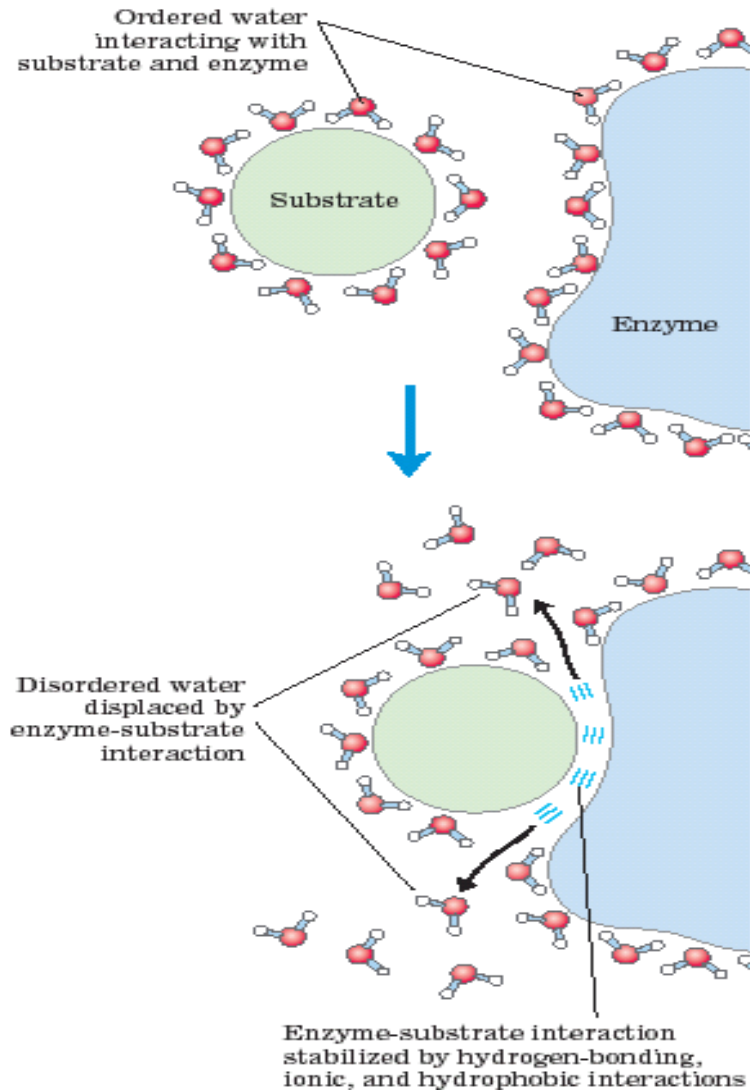
Protein/NK komplexy

- Vodíkové vazby (H-vazby)
 - Krátkodosahové (efektivní vzdálenost $< 4.0 \text{ \AA}$, navíc směrově specifické)
 - Malý příspěvek energie ale hodně selektivní
 - Atomové skupiny: Všechny polární atomové skupiny (donor/akceptor)
 - Nespecifické (páteř proteinu; cukr-fosfátová páteř NK), Specifické (boční řetězce aminokyselin, báze)
 - Specifické z hlediska NK či proteinu (e.g. Interakce báze/páteř proteinu, boční řetězec/cukr-fosfátová páteř)

Protein/NK komplexy

- Vodíkové vazby

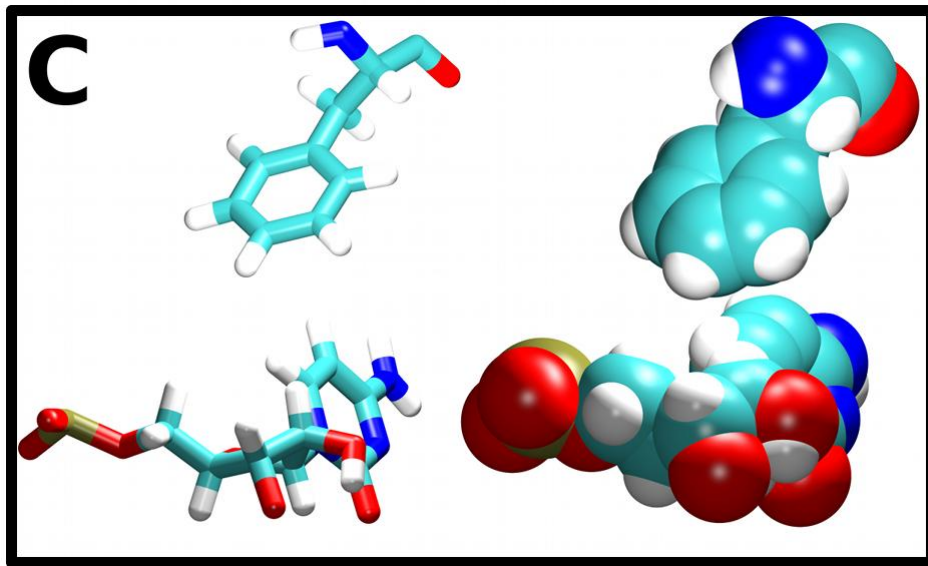
- Exponované donorní a akceptorní skupiny interagují s vodou
- Nevytvořené vodíkové vazby jsou energeticky drahé → hlavní brzda komplexace „uplně všeho“



Protein/NK komplexy

- Van der Waalsovy (VdW) interakce
 - Stabilizující interakce spočívající v atomovém překryvu jakýchkoliv dvou atomů (indukované dipóly)

- Povrchy proteinů a NK komplementární - uvězněné molekuly vod entropicky drahé ...nicméně bublina vakua je ještě dražší a proto občas mohou být (i ionty)

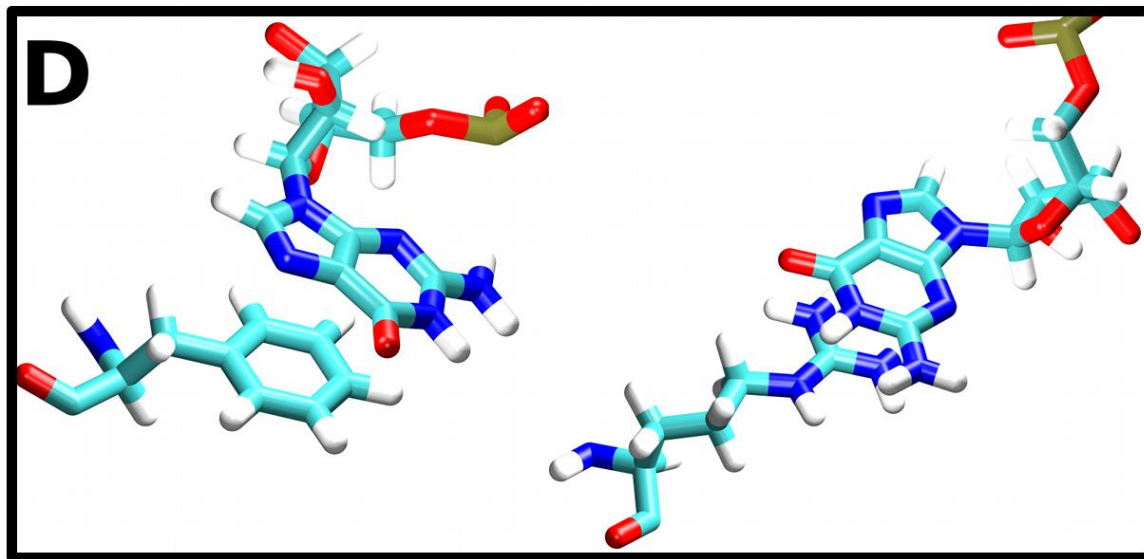


Protein/NK komplexy

- Van der Waalsovy (VdW) interakce
 - Nejkratší dosah, ale důležité pro tvorbu protein/NK komplexu → komplementární povrchy
 - Zkoumání komplementarity povrchů, jeho velikosti (překryvu), a vodě přístupnému povrchu typickým bioinformatickým úkolem
 - Definovaná VdW „velikost“ atomu, sonda dané velikosti jezdící po povrchu molekuly

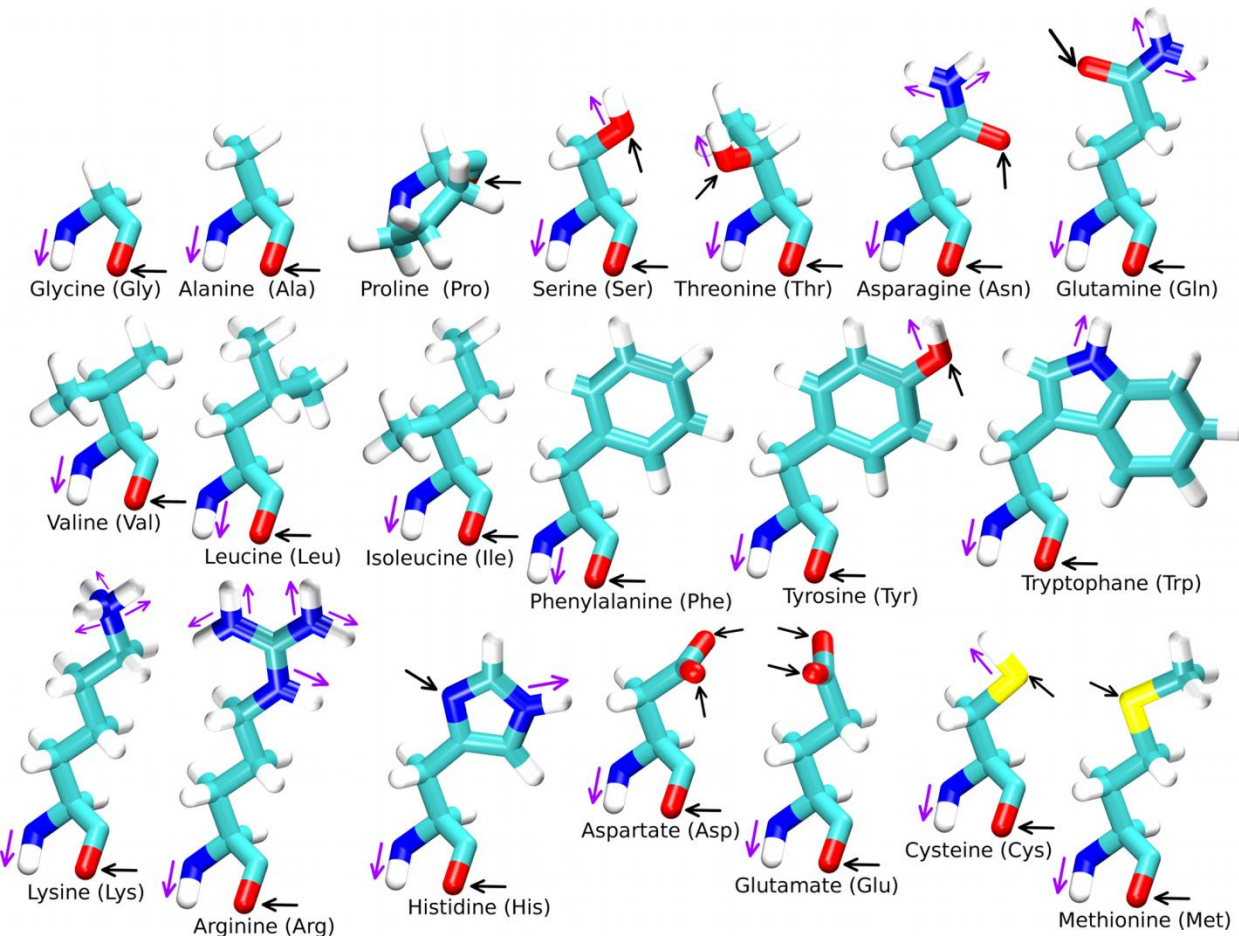
Protein/NK komplexy

- Stacking
 - Speciální případ VdW interakce který je typický pro nukleové kyseliny (planární báze)



- Energeticky výhodný překryv dvou planárních kruhů nebo jiných, relativně plochých částí biomolekuly
- Stacking báze/báze stabilizuje strukturu NK; stejně tak protein/NA

- U proteinu typicky interakce s Phe, Tyr, Trp, His
- ... ale i arginin, lysin, valin...
- Interakce báze (typicky), nebo ribózy



• **Stacking nespočívá v „ π - π “ interakci atomových orbitalů!!!!**

• Jedná se o prostou disperzní interakci spojenou s vytěsněním vody (výhodné entropicky)

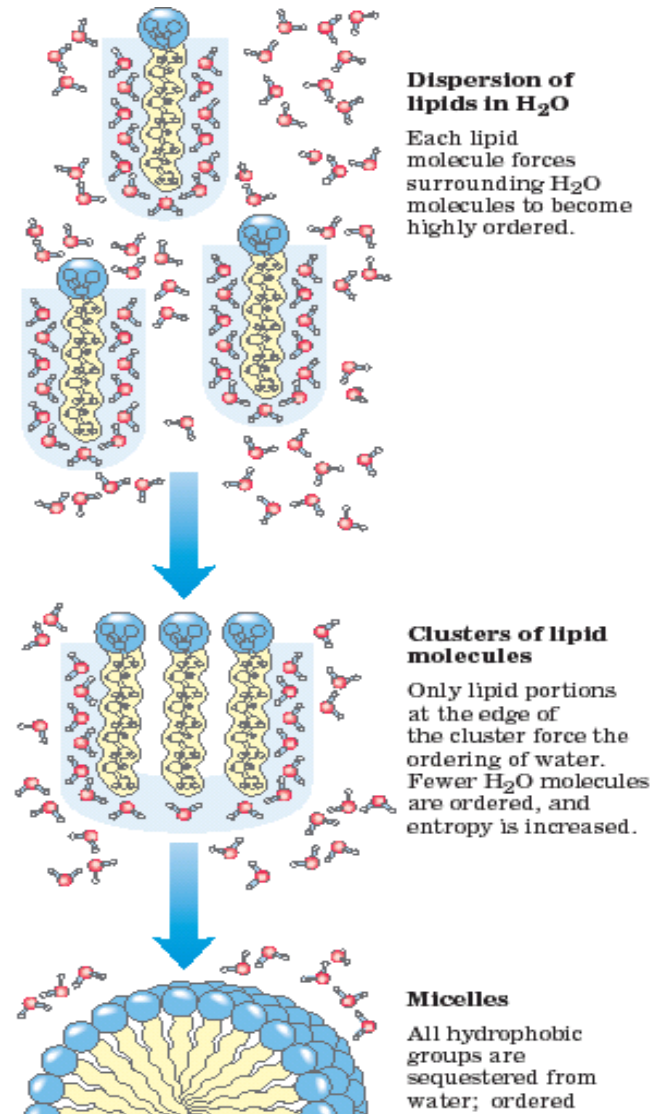
Protein/NK komplexy

- Hydrofóbní interakce
 - Daná úspořádaným chováním molekul vody u povrchu biomolekul
 - Zmenšení jejich povrchu (tvorbou komplexu) se zvýší entropie systému (více vody se „osvobodí“ od povrchu)
 - Souvisí s komplementaritou povrchů (čím více povrchu komplexu, tím více vody se „osvobodí“)
 - Komplexy protein/NK u kterých nedochází k úplnému vyloučení vody z protein/NK rozhraní jsou nepravděpodobné (ale pozor na „pohřbené“ strukturní vody!)

Protein/NK komplexy

- **Hydrofóbní interakce**

- Zmenšením povrchu (tvorbou komplexu) se zvýší entropie systému (více vody se „osvobodí“ od povrchu)
- Souvisí s komplementaritou povrchů (čím více povrchu komplexu, tím více vody se „osvobodí“)
- Komplexy protein/NK u kterých nedochází k úplnému vyloučení vody z protein/NK rozhraní jsou nepravděpodobné, ale možné
- Předpověď pohřbených vod (dutin) důležitá → ovlivňuje specifitu, ale špatně viditelné v experimentech



Protein/NK komplexy

- Experimentální metody zjišťování struktury protein/NK:
 - **X-ray krystalografie, NMR spektroskopie, kryo elektronová mikroskopie (cryo-EM)**
- Metody nutné je doplňovat dalšími (kinetické a termodynamické studie, cílená mutageneze)
- Protein/NK více problematické než monomery (dynamika rozhraní, slabá vazba, exp. podmínky...)

Protein/NK komplexy

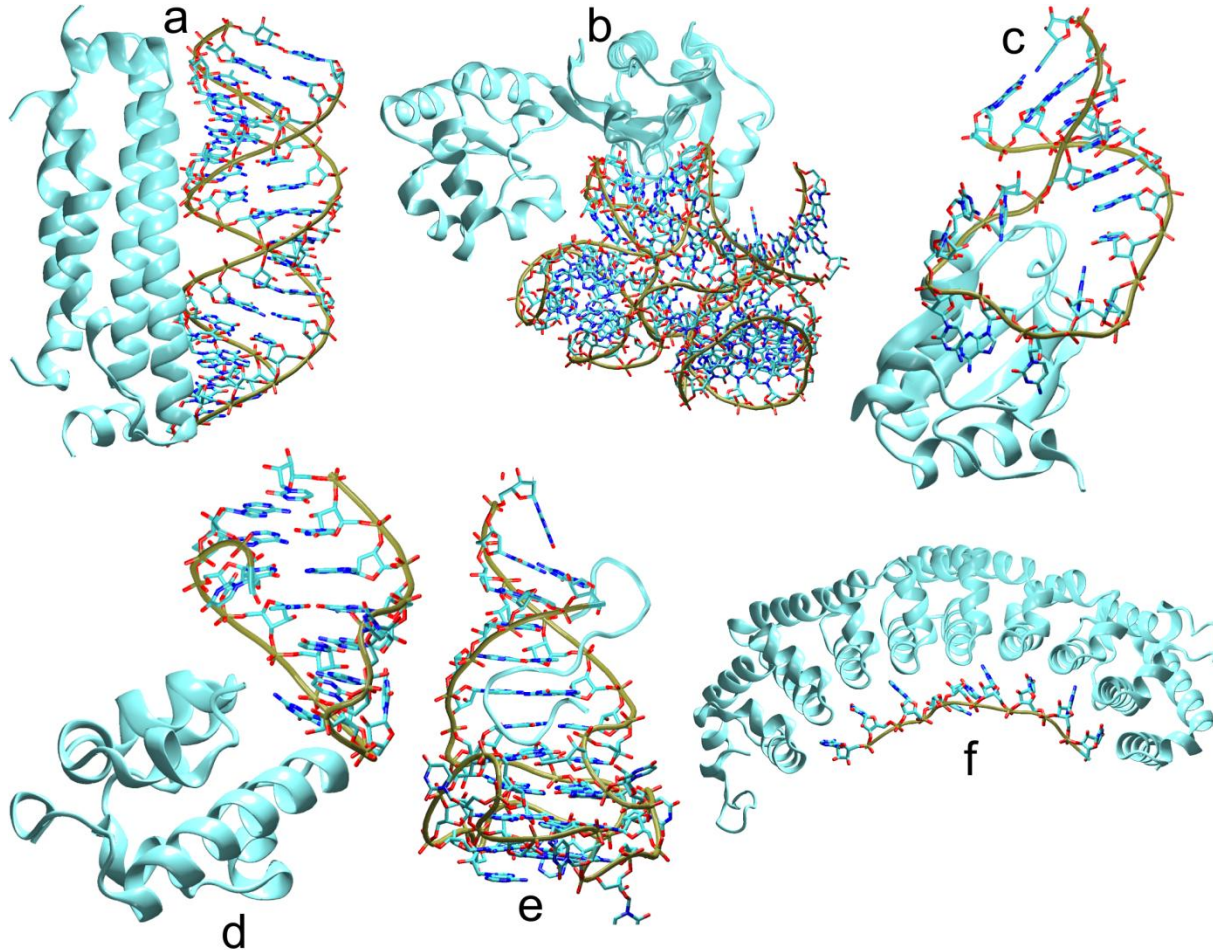
- Důležitá úloha výpočetních metod
- Experimentálně lze obvykle zjistit pouze součet, nikoliv jednotlivé energetické příspěvky
- Teoretické metody umožňují energetickou dekompozici, ale jsou zatížené chybami
- Pozor na metody využívající implicitní solventy, PB či GB elektrostatiку → pro nukleové kyseliny problematické (role solvatace, polyaniont)

Protein/NK komplexy

- Principy strukturního rozpoznávání:
 - Specializace proteinů na typ nukleové kyseliny (e.g. jednovláknová, šroubovice, vlásenka, etc.)
 - Schopnost některých sekvencí NK se specificky konformačně měnit (ohyb, distorze) → nepřímé čtení
 - Buď inherentní (termální fluktuace) nebo indukované proteinem

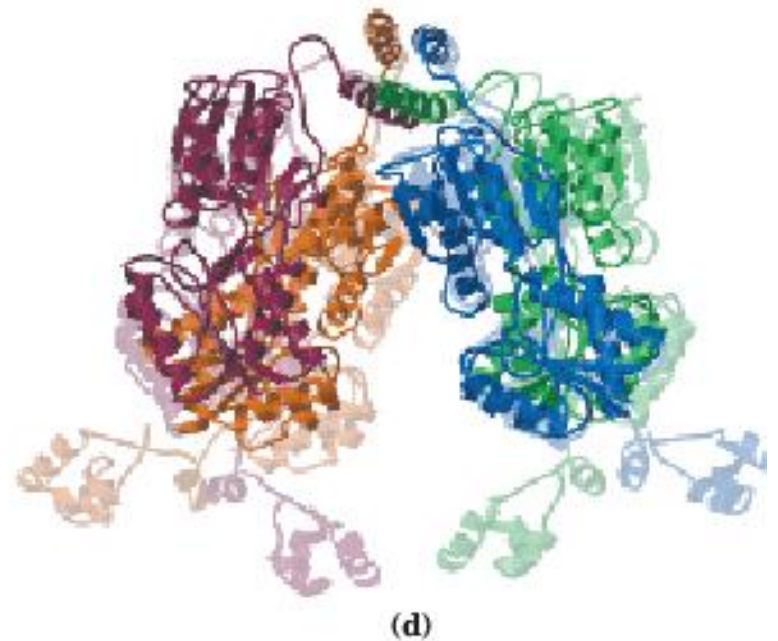
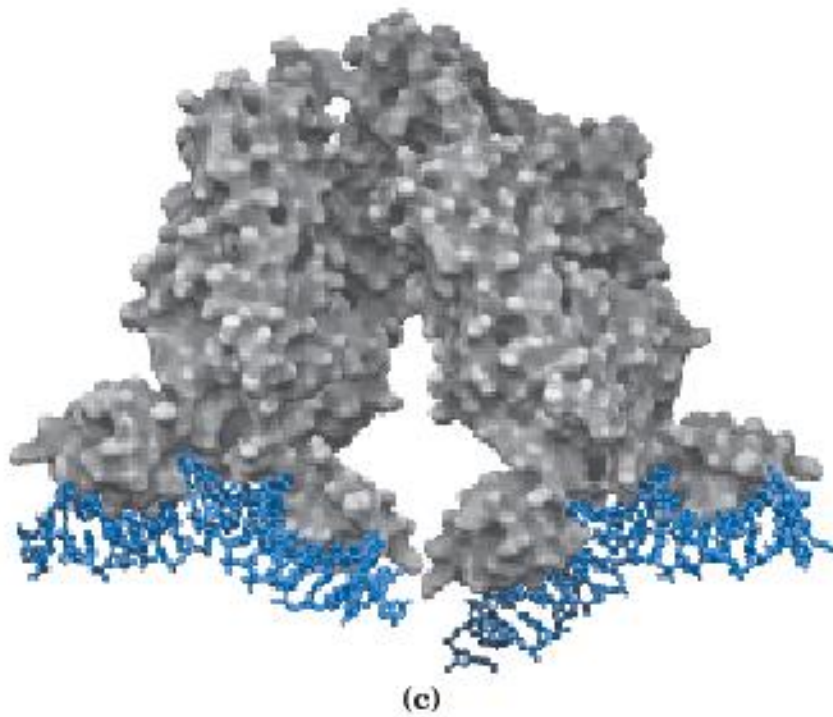
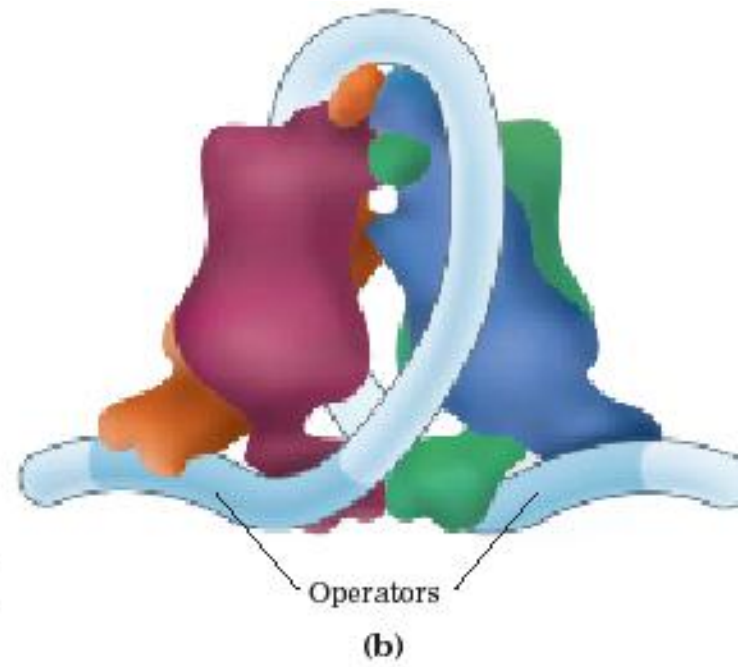
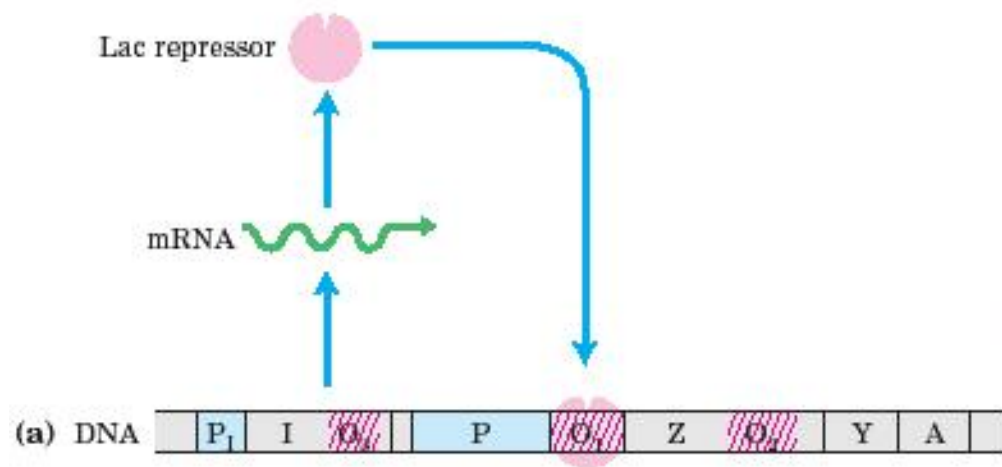
Protein/NK komplexy

- Zejména protein/RNA komplexy strukturně variabilní



Protein/NK komplexy

- *Dvouvláknové NK (B-DNA, A-RNA)*
 - K odlišení různých sekvencí NA je třeba aby protein tvořil mnoho vodíkových vazeb
 - Ve „specifických“ protein/B-DNA komplexech je poměr 1:1 pro vazby s bázemi a s fosfáty
 - Interakce s fosfáty, (deoxy)ribosou, s bázemi přes žlábký
 - U DNA se nejčastěji umísťuje alpha-helix proteinu do velkého žlábků (přímé čtení - vodíkové vazby)
 - Nepřímé čtení rovněž hraje roli (ohyb B-DNA), zvyšuje množství možných interakcí

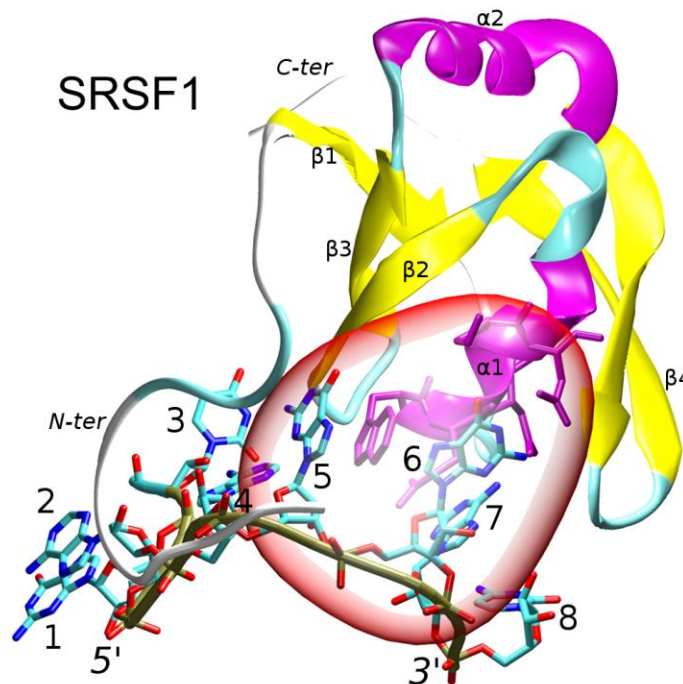
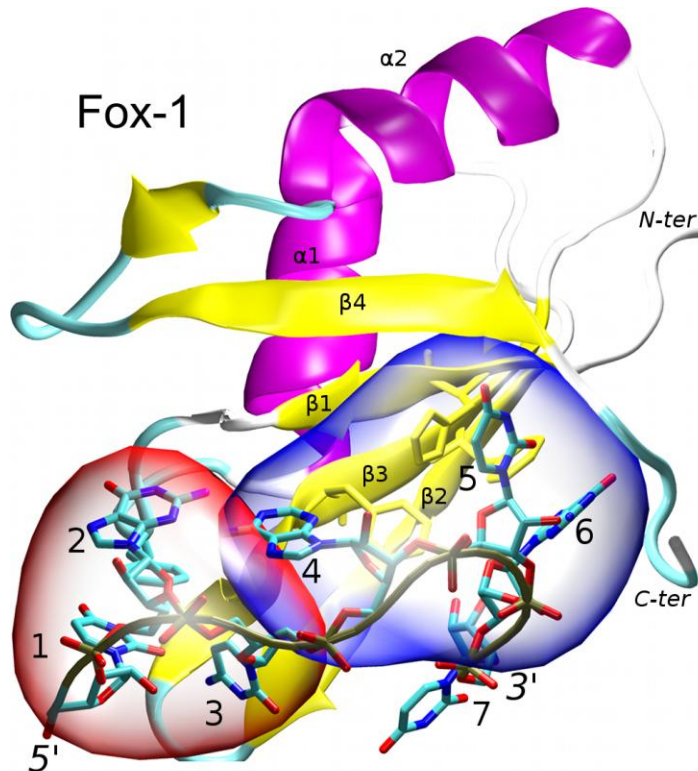


Protein/NK komplexy

- *Dvouvláknové NK (B-DNA, A-RNA)*
 - Indukované změny nejen u NK, i protein může při vazbě měnit konformaci
 - Oligomerizace (více proteinových domén v rámci proteinu, dimery, trimery... prudce zvyšuje afinitu a specifitu)
- Proteiny musejí umět (spolehlivě) rozlišit jednu NK od druhé → základ regulace genové exprese na úrovni transkripce a translace, silný evoluční tlak

Protein/NK komplexy

- *Jednovláknové NK (typicky RNA)*
 - Hydrofobní povrchy bází jsou exponovány → Proteiny navíc interagují pomocí hydrofobních aminokyselin (Tyr, Phe, Trp)



Protein/NK komplexy

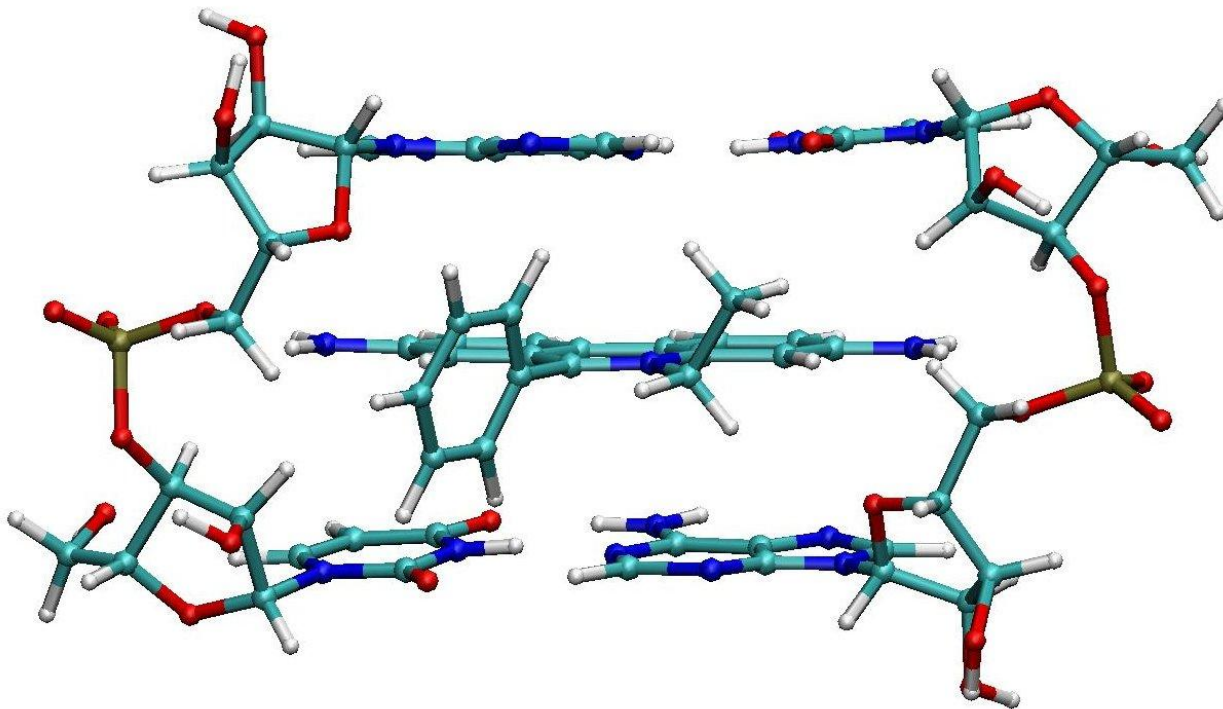
- *Jednovláknové NK (typicky RNA)*
 - Výskyt: ssDNA se vytváří při replikaci, ssRNA při transkripci
 - V obou případech proteiny neutralizují páteř pomocí lysinu a argininu a aromatické aminokyseliny stackují s bázemi

Protein/NK komplexy - shrnutí

- ***Každá molekula RNA in-vivo interaguje s proteinem (pokud ne, je degradována)***
- Odlišné protein/DNA a protein/RNA → DNA je monotónní dvoušroubovice, vystačí si s několika motivy
- RNA je strukturně rozmanitá molekula → veliké množství vazebných motiv
- Dlouhodosahové elektrostatické interakce zajistí výchozí přiblížení NK a proteinu (NK má charakter polyaniontu, protein je zpravidla kladně nabitý)
- Komplementární povrch (shape-recognition, vdW interakce) a počet vytvořených vodíkových vazeb rozhodnou o dlouhodobé stabilitě komplexu

NK ve vazbě s ligandy

- Antibiotika, jedy...
- U DNA (dvoušroubovice) vazba přes žlábký nebo interkalace



NK ve vazbě s ligandy

- U RNA typicky blokace funkčních míst (e.g. ribozom)

