

Mgr. Václav Římal, Ph.D.

<http://nmr.mff.cuni.cz/rimal>

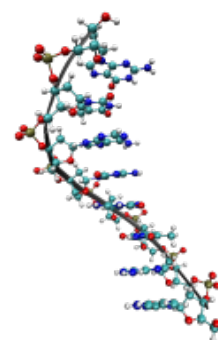
vaclav.rimal@mff.cuni.cz

Nabídka studentských projektů

1. Teplotní změny neselfkomplementární DNA

Pro výzkum stability komplexů nukleových kyselin, např. DNA dvoušroubovic či vlásenek, je třeba samostatně popsat jak tyto komplexy, tak vlastnosti samostatných nesbalených molekul vzniklých jejich rozpadem. Ukazuje se však, že parametry strukturovaných i nestrukturovaných řetězců DNA závisejí na teplotě [1,2]. Je však závislost chemických posuvů ve spektrech jaderné magnetické rezonance (NMR) skutečně lineární [3], jak napovídají experimenty prováděné v omezeném teplotním rozsahu?

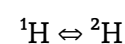
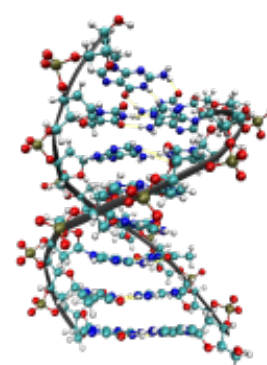
Pro rozšíření dostupných dat je třeba najít takové sekvence DNA, které zůstávají v širokém rozsahu teplot strukturně stabilní či naopak jako samostatná nesbalená vlákna. Na základě teoretických předpovědí [4] jsme navrhli sekvence, které vylučují tvorbu klasických komplexů obsahujících Watsonovy-Crickovy báze páry. Cílem projektu bude pomocí NMR vysokého rozlišení ověřit či vyvrátit tento předpoklad a následně vyhodnotit funkční závislost chemických posuvů na teplotě.



2. Vliv těžké vody na stabilitu methylované DNA

V biologických dějích hraje podstatnou roli nejen struktura, ale i pohyblivost a stabilita dvoušroubovice DNA. Methylace cytosinu v DNA reguluje aktivitu genů a je spojena s nárůstem pevnosti duplexu [5,6]. Na krátkých úsecích nukleových kyselin lze pomocí spektroskopie jaderné magnetické rezonance (NMR) přesně lokalizovat změny struktury dvoušroubovice během navyšování či snižování teploty [7].

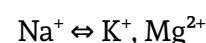
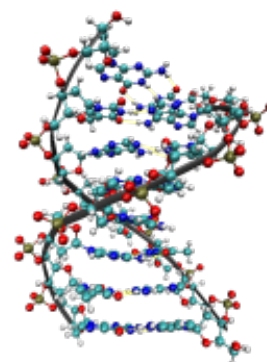
V tomto projektu bude vyhodnocen vliv postupné záměny vody za těžkou vodu (D_2O) na termodynamiku methylované DNA, což může přispět k lepšímu porozumění celému mechanismu stabilizace dvoušroubovice, potažmo pak fyzikálním základům regulace genové exprese.



3. DNA dvoušroubovice v různém iontovém prostředí

Pevnost a flexibilita dvoušroubovice DNA úzce souvisí s iontovým složením rozpouštědla [8]. Ve vodných roztocích jsou kationty nutné pro kompenzaci záporného elektrického náboje nukleových kyselin, kromě toho se ale mohou účastnit specifických vazeb, které závisí na chemickém prvku [9].

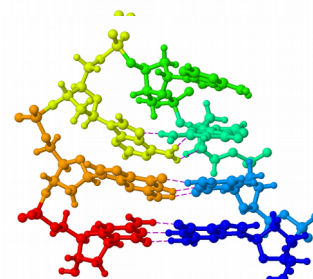
V rámci tohoto projektu budou pomocí jaderné magnetické rezonance měřeny spektrální a termodynamické vlastnosti modelové DNA dvoušroubovice během jejich tání, a sice pro různé složení iontů v roztoku. Lze nahradit sodík za draslík či hořčík nebo měnit jejich koncentrace; přesný plán bude upřesněn se zájemcem o tento projekt.



4. Teplotní rozpad DNA vlásenky

Variabilita prostorových struktur nukleových kyselin je značná: kromě dvoušroubovic mohou tvořit také útvary ze tří či čtyř vláken, ale i vlásenky z jediné molekuly [10]. Některé z vlásenek vykazují i v případě velice krátkých úseků DNA překvapivě vysokou stabilitu, jež silně závisí na drobných změnách v sekvenci bází [11].

V projektu bude ověřeno, zda u vybraného úseku DNA skutečně dochází k předpokládané tvorbě vlásenky, vyhodnocena její stabilita pomocí experimentů jaderné magnetické rezonance (NMR) vysokého rozlišení [12] a studovány změny vyvolané otočením koncových bázových párů nebo nukleotidu ve smyčce. Alternativami jsou přiřazení rezonancí v ^1H spektrech konkrétním atomům ve vybrané molekule DNA na základě 2D experimentů nebo výzkum možných mezistavů během tání vlásenky tvořené DNA z oblasti cTAR viru HIV.



Literatura

- [1] V. Římal, H. Štěpánková, J. Štěpánek, Analysis of NMR spectra in case of temperature-dependent chemical exchange between two unequally populated sites, *Concepts Magn. Reson. Part A*. 38A (2011) 117–127. doi:10.1002/cmr.a.20214.
- [2] V. Římal, NMR studium lokální strukturní stability v molekule DNA, Charles University in Prague, 2009.

- [3] J.-F. Lefevre, A.N. Lane, O. Jardetzky, A Description of conformational Transitions in the Pribnow Box of the *trp* Promoter of *Escherichia coli*, *Biochemistry*. 27 (1988) 1086–1094.
- [4] N.R. Markham, M. Zuker, DINAMelt web server for nucleic acid melting prediction, *Nucleic Acids Res.* 33 (2005) W577–W581. doi:10.1093/nar/gki591.
- [5] D. Renčiuk, O. Blacque, M. Vorlíčková, B. Spingler, Crystal structures of B-DNA dodecamer containing the epigenetic modifications 5-hydroxymethylcytosine or 5-methylcytosine, *Nucleic Acids Res.* 41 (2013) 9891–9900. doi:10.1093/nar/gkt738.
- [6] K.B. Geahigan, G. a Meints, M.E. Hatcher, J. Orban, G.P. Drobny, The dynamic impact of CpG methylation in DNA, *Biochemistry*. 39 (2000) 4939–4946. doi:10.1021/bi9917636.
- [7] V. Římal, *NMR Study of Oligonucleotide Structures*, Charles University, 2018.
- [8] J. SantaLucia, A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (1998) 1460–1465. doi:10.1073/pnas.95.4.1460.
- [9] S. Nakano, Nucleic acid duplex stability: influence of base composition on cation effects, *Nucleic Acids Res.* 27 (1999) 2957–2965. doi:10.1093/nar/27.14.2957.
- [10] M. Kaushik, S. Kaushik, K. Roy, A. Singh, S. Mahendru, M. Kumar, S. Chaudhary, S. Ahmed, S. Kukreti, A bouquet of DNA structures: Emerging diversity, *Biochem. Biophys. Reports*. 5 (2016) 388–395. doi:10.1016/j.bbrep.2016.01.013.
- [11] B. Hernández, V. Baumruk, N. Leulliot, C. Gouyette, T. Huynh-Dinh, M. Ghomi, Thermodynamic and structural features of ultrastable DNA and RNA hairpins, *J. Mol. Struct.* 651–653 (2003) 67–74. doi:10.1016/S0022-2860(02)00627-0.
- [12] O. Socha, *Charakterizace strukturních vlastností a stability DNA vlásenek pomocí NMR spektroskopie*, Charles University, 2016.