

Přírodovědecká fakulta,
17. listopadu, 771 46 Olomouc



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí práce: Mgr. Pavel Banáš, Ph.D.

Autor: Bc. Pavel Polakovič

Olomouc, 2011

Poděkování

Chtěl bych poděkovat Mgr. Pavlu Banášovi, Ph.D za velmi trpělivou práci se mnou, za jeho cenné rady, náměty a řešení technických problémů při spouštění dynamik. Děkuji všem zaměstnancům katedry fyzikální chemie za jejich vstřícnost, ochotu, péči o své studenty a neuvěřitelnou trpělivost, speciálně pak vedoucímu katedry doc. RNDr. Michalovi Otyepkovi, Ph.D., který mě s tímto zajímavým vědním oborem seznámil. Samozřejmě děkuji svým rodičům, že mi umožnili studium na Universitě Palackého v Olomouci, za jejich psychickou a materiální podporu.

Prohlášení

„Prohlašuji, že diplomovou práci jsem vypracoval samostatně a uvedl veškerou použitou literaturu.“

V Olomouci dne

.....
(Pavel Polakovič)

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora:	Bc. Pavel Polakovič
Název práce:	Struktura a dynamika vybraných RNA enzymů
Typ práce:	Diplomová
Pracoviště:	Katedra fyzikální chemie
Vedoucí práce:	Mgr. Pavel Banáš, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2011

Abstrakt:

Ribozym hepatitidy D používá vlastní katalytický cytosin pro průběh acido-bazické reakce. Tato RNA molekula se skládá do několika sekundárních struktur a štípe svou vlastní cukro-fosfátovou dráhu. Produkty reakce jsou 2',3'-cyklický fosfát a hydroxylový 5'-konec. V reakci je kromě katalytického cytosinu přítomen nejméně jeden kovový kation. Ribozym za přítomnosti pouze monovalentních iontů prochází pomalou reakcí, ale strukturálně velmi dobře nahrazují divalentní ionty přítomné v přírodě. Za podpory mutačních experimentů nás dovedly výsledky k tvrzení, že nukleotid C75 je esenciální a jeho mutací na U75 dochází k inhibici reakce. Rentgenostrukturní data ukazují C75 v pozici blízké mechanismu pro obecnou bázi, ale poslední publikovaná struktura navrhuje stabilní geometrii vhodnou pro mechanismus obecné kyseliny. V této práci jsme zanalyzovali celkem 1100 ns molekulárně dynamických simulací v explicitním modelu vody, které nám poskytly atomární pohled na přítomnost iontů a dynamiku aktivního místa struktury v geometrii vhodné pro mechanismus obecné báze (1VC0) a v geometrii vhodné pro mechanismus obecné kyseliny (3NKB) s geometrií aktivního místa z hammerhead ribozymu (2OEU).

Klíčová slova: molekulární dynamika, ribozym, ribozym hepatitidy D, RNA, radiální distribuční funkce, RMSd

Počet stran:	70
Počet příloh:	3
Jazyk:	čeština

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Bc. Pavel Polakovic
Title: Structure and dynamics of selected RNA enzymes
Department: Department of Physical Chemistry
Type of thesis: Master
Supervisor: Mgr. Pavel Banáš, Ph.D.
The year of presentation: 2011

Abstract:

The hepatitis delta virus (HDV) ribozyme uses a cytosine to allow general acid-base catalysis. These RNAs fold into double-nested pseudoknot structure and cleave RNA molecule. Products of the reaction are 2',3'-cyclic phosphate and 5'-hydroxyl termini. Active-site cytosine and at least one metal ion are involved in self-cleavage reaction. Monovalent metal ions support slow catalysis and were proposed to compensate structural, but not catalytic, divalent metal ions in HDV ribozyme. Experimentalists from several laboratories discovered that C75 has catalytic function and substitution to uracil dramatically reduce activity. X-ray crystallographic data shows C75 in position for general base catalysis but last structure without substitution of C75 shows nucleotide in general acid position. We decided use MD simulation for determine geometry of active site for structure for general base and general acid mechanism. Here, we analyze 1100 ns of explicit solvent molecular dynamic simulations to provide an atomistic view of occupation of monovalent and divalent cations in precursor structure in geometry close to general base mechanism (1VC0) and in precursor structure in geometry close to general acid mechanism (3NKB) with the cleavage site from hammerhead ribozyme (2OEU).

Keywords: molecular dynamic, ribozyme, hepatitis delta ribozyme, RNA, radial distribution function, RMSd

Number of pages: 70
Number of appendices: 3
Language: Czech

Obsah

1.	ÚVOD	8
2.	TEORETICKÁ ČÁST	11
2.1.	RNA	11
2.1.1.	<i>Historie RNA</i>	12
2.1.2.	<i>Druhy RNA</i>	13
2.1.3.	<i>Struktura RNA</i>	15
2.1.4.	<i>Virus hepatitidy D</i>	16
2.1.5.	<i>Ribozym</i>	18
2.1.6.	<i>Ribozym hepatitidy D</i>	18
2.1.7.	<i>Struktura HDV ribozymu</i>	20
2.2.	HDV RIBOZYM: EXPERIMENTÁLNÍ DATA.....	22
2.2.1.	<i>Mechanismus obecné zásady (general base)</i>	23
2.2.2.	<i>Mechanismus obecné kyseliny (general acid)</i>	24
2.2.3.	<i>Závislost aktivity na pH v monovalentní soli</i>	25
2.2.4.	<i>Aktivita HDV ribozymu v monovalentní soli</i>	27
2.3.	BIOINFORMATIKA.....	28
2.4.	POČÍTAČOVÉ SIMULACE.....	29
2.4.1.	<i>Molekulární dynamika</i>	30
2.4.2.	<i>Potenciální energie</i>	31
2.4.3.	<i>Silové pole („force field“)</i>	33
2.4.4.	<i>Explicitní modely vody</i>	35
3.	PRAKTICKÁ ČÁST	37
3.1.	CÍL PRÁCE	37
3.2.	METODY.....	38
3.2.1.	<i>Příprava struktur</i>	38
3.2.2.	<i>Molekulární dynamika</i>	38
3.2.3.	<i>Analýza MD trajektorií</i>	39
3.2.4.	<i>Měřené hodnoty</i>	39
4.	VÝSLEDKY.....	42
4.2.	STRUKTURNÍ DYNAMIKA AKTIVNÍHO MÍSTA HDV RIBOZYMU V GEOMETRII VHDNÉ PRO MECHANISMUS OBECNÉ BÁZE (1VC0).....	42
4.3.	MECHANICKÉ MODELOVÁNÍ AKTIVNÍHO MÍSTA	44
4.4.	STRUKTURNÍ DYNAMIKA AKTIVNÍHO MÍSTA HDV RIBOZYMU V GEOMETRII VHDNÉ PRO MECHANISMUS OBECNÉ KYSELINY (3NKB)	46

4.4.1.	<i>Pseudotorzní úhel cukru nukleotidu U-1 („sugar pucker“)</i>	49
4.4.2.	<i>Torzni úhel páteře mezi U-1 a G1</i>	51
4.5.	ANALÝZA IONTŮ	52
5.	DISKUZE A ZÁVĚR.....	57
6.	PŘÍLOHY	62
7.	VYSVĚTLENÍ ZKRATEK	65
8.	POUŽITÁ LITERATURA	66

1. ÚVOD

Termín „RNA svět“ poukazuje na hypotetickou část evoluce časného vývoje života, kdy nebyl ještě vyvinut mechanismus pro syntézu proteinů. Zpočátku při poznávání RNA se objevovaly spekulace, že RNA katalýza existovala v ranném stádiu evoluce, že RNA byla jediným genetickým materiálem a že kanonické Watson-Crickovo párování byl základ replikace. Nikdo se tehdy nedomníval, že hypotetické RNA katalyzátory mohou být stále mezi námi [1-3]. Již v minulosti se vědci domnívali, že původní ribozom byl tvořen výhradně molekuly RNA, ale nikdo nepředpokládal, že tvorba peptidové vazby, hlavní funkce ribozomu, je i u dnešních ribozomů v režii RNA molekul.

Dlouhou dobu se hledaly důkazy o potvrzení hypotéz RNA světa, který existoval bez proteinů. V dnešní době je tato část vědy velmi populární a to hlavně po objevu, že RNA opravdu vykazuje katalytickou aktivitu [4]. Tyto objevy odstranily poslední námitky vztažené proti hypotéze RNA světa, dokonce hlavní námitku, že RNA se nedokáže chovat katalyticky. Prof. Sidney Altman a Prof. Thomas R. Cech si za tento objev odnesli roku 1989 Nobelovu cenu.

Už na střední škole se učí definice RNA jako makrobiomolekula, která se na rozdíl od DNA skládá pouze z jednoho polynukleotidového řetězce. Od DNA se liší navíc v jedné bázi, kdy thymin je nahrazen uracilem a přítomnosti 2'-OH skupiny na cukerné jednotce. RNA molekula vytváří mnoho rozdílných tvarů a plní různé funkce v buňce. Hlavními RNA molekulami jsou informační mRNA, která napomáhá přenosu genetické informace, mnoho druhů rRNA je přítomno v ribozomu, tRNA na sebe váže aminokyseliny a podílí se na syntéze proteinů. Kromě mRNA, tRNA a rRNA ale existuje celá řada tzv. nekódujících RNA (ncRNA) občas označovaných jako funkční RNA (fRNA). Řada výzkumných center a se dnes orientuje na možné funkce málo popsaných ncRNA molekul, co je stabilizuje, popřípadě jak předpovědět jejich strukturu. Od dob, kdy poprvé představili Watson a Crick strukturu DNA a vysvětlili její princip[5], uplynulo mnoho let a za tu dobu jsme v této oblasti udělali velký krok vpřed. První sekvenci RNA, která čítala 77 nukleotidů, objevil a popsal americký biochemik Robert W. Holley v roce 1965[6].

Významnou skupinou ncRNA jsou ribozymy (RNA enzymy), což jsou RNA molekuly se schopností katalyticky štěpit samy sebe nebo jiné RNA molekuly. Tyto ribozymy, podobně jako proteinové enzymy, snižují energetickou bariéru a napomáhají tak přechodu reaktantů na produkty. RNA katalyzátory, ribozymy, hrají velmi významnou roli v procesech živých organismů. Studium mechanismu, jak tyto katalyzátory pracují, má praktický význam v dnes velmi rozvíjejícím se oboru návrhové léčiv na počítači („drug design“). Dnes tvoří RNA enzymy (ribozymy) jen nepatrnou část ve srovnání s enzymy tvořenými proteiny. Nicméně jde o zajímavou a ne zcela probádanou oblast enzymové katalýzy.

Virus hepatitidy D je lidský patogen, který je satelitním virem hepatitidy B. Virus obsahuje cirkulární RNA molekulu skládající se z 1600 nukleotidů[7], kterou tvoří dvě domény: ribozymová část a gen pro jeden protein, který váže cirkulární RNA v jádře virové částice. Obal viru je výhradně z proteinů, které tvoří kapsidu HBV, ale v jiném poměru a tvaru než u HBV. Ribozymová podjednotka, složená z 85 nukleotidů, štěpí sama chemickým mechanismem acido-bazické katalýzy produkující 2',3'-cyklický fosfát a 5'-hydroxylový konec. Experimentální měření poukazují na esenciální roli nukleotidu C75, po jehož delecí nebo nahrazení jiným nukleotidem dojde k inhibici aktivity celého ribozymu. Rentgenostrukturní analýzy ukazují C75 v pozici vhodné k tomu, aby C75 fungoval jako obecná báze, ale poslední analýza z léta 2010 identifikovala C75 na pozici, která spíše ukazuje, že by C75 měl hrát roli obecné kyseliny[8]. Pro samoštěpící reakci využívá ribozym navíc kovové kationty (monovalentní nebo divalentní), které zde hrají roli kofaktoru[9]. Jakým mechanismem přesně dochází ke štěpení zatím nebylo úplně objasněno jak na půdě experimentální tak teoretické.

Teoretická chemie využívající ke svým výzkumům molekulární dynamiku, kvantovou chemii či hybridní metodu molekulární mechaniky a kvantové mechaniky je v dnešní době schopna přinést nejen strukturní náhled na biomakromolekuly, ale navíc nám poskytuje i informace o strukturní dynamice na atomární úrovni a energetickou bilanci daného procesu. Velký pokrok teoretických metod byl zapříčiněn rapidním vývojem výpočetní techniky. Teoretické výpočty se tak staly ve spolupráci s experimentálními metodami mocným nástrojem pro studium enzymatické katalýzy.

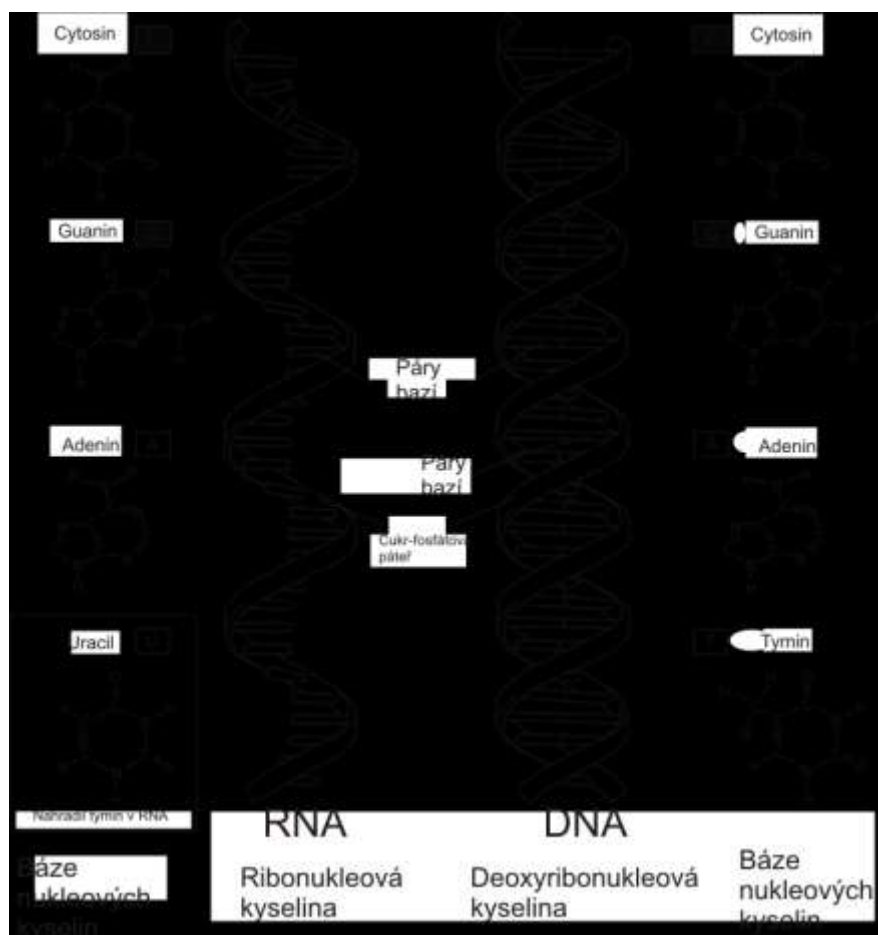
V diplomové práci jsem se zaměřil na strukturní popis ribozymu hepatitidy D, vliv mutací na geometrii aktivního místa, konformační dynamiky cukr-fosfátové páteře a vliv iontů na geometrii aktivního místa, nástrojem teoretické chemie, molekulární dynamikou. Zaměřil jsem se na polohu nukleotidu C75 v aktivním místě, výskyt monovalentních a divalentních iontů ve struktuře a na změny způsobené mutacemi v aktivním místě na pozicích 1 a 37. Společně s experimentálními výsledky jsem směřoval k otázce, zda je možný mechanismus, v němž protonovaný $C75H^+$ funguje jako obecná kyselina

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. RNA

Ribonukleová kyselina (RNA) patří mezi makromolekuly tvořené polynukleotidovým řetězcem. Obsahuje čtyři báze: adenin, guanin, cytosin a uracil (*Obrázek 1*). Ty jsou vázány na cukernou jednotku ribózu. Řetězec je pak vytvořen spojením pentóz pomocí fosfátových skupin. Nejpodstatnějším rozdílem je přítomnost 2'-OH skupiny. Po spárování bází do WC párů nezůstane DNA žádný donor protonu, kdežto RNA má stále jak donor protonu, tak akceptory, což vede k její strukturní variabilitě.

Obrázek 1 Schematické srovnání jednořetězcové RNA a dvojšroubovice DNA. V rámečku je zvýrazněna báze uracil, která v RNA nahradila thymin přítomný v DNA. Obrázek byl převzat z internetového serveru národního institutu pro výzkum lidského genomu (<http://www.molecularstation.com>).



V dnes známém světě biomakromolekuly DNA a RNA spolupracují za vzniku třetí třídy biomolekul, proteinů, a podporují tak Darwinovu evoluční teorii. Pokud srovnáme jednoduché viry s ostatními organismy, pak existence proteinů a jejich široké využití ve všech doménách života navozuje hypotézu, že teprve zapojením proteinů v průběhu evoluce dala organismu obrovskou výhodu oproti původnímu životu v RNA světě. Tato spolupráce produkuje enormní škálu života, která se vyskytuje na naší planetě. Po čtyřiceti letech výzkumu RNA molekul se vyskytly první spekulace, že RNA mohla stát na počátku Darwinovy evoluce bez dalších kódovaných molekul [10], DNA nebo proteinů. Termín „RNA svět“ je stále spojen se spekulacemi [11].

Pojem „RNA svět“ souvisí se dvěma třídami hypotéz. První třída se drží myšlenky, že první formy života na Zemi používaly RNA jako jedinou geneticky kódovanou složkou pro biologickou katalýzu. Tento fakt je podporován experimentálními výsledky [12-14]. Druhá třída je více striktní a méně podpořena reálnými výsledky. Myšlenka této hypotézy je, že RNA sama o sobě byla první formou života na planetě. Obecně řečeno, RNA se zde objevila z neživé hmoty a byla prvním chemickým systémem na Zemi, který vykazoval známky života.

Podle centrálního dogmatu molekulární biologie je hlavní funkcí RNA transkripce (přepis) genetické informace z DNA a její translace (překlad) na příslušný protein. I tento proces se však děje přes různé druhy RNA přímo či nepřímo a každá RNA zde má svou funkci.

2.1.1. Historie RNA

Geologická, geochemická a paleontologická data v kombinaci s výsledky z molekulární biologie společně podporují hypotézy, že moderní život na Zemi (využívající DNA, RNA a proteiny) se objevil před dvěma miliardami let [15]. Z toho vyplývá fakt, že RNA svět musel být přítomen ještě dříve. RNA jak ji známe dnes, prošla pravděpodobně mnohými změnami, než nabrala dnešní podobu. Mnohé experimenty v laboratořích poukazují na DNA a RNA s šesti a více nukleovými bázemi [16] a analogy založené na jiné cukerné jednotce než ribóza. Molekula TNA ((L)-a-threfuranosyl oligonekleotid) byla syntetizována v laboratoři a navržena jako možná alternativa a předek RNA [17].

Události vedoucí k separaci RNA začínaly ve čtyřicátých letech minulého století. V té době se obecně věřilo, že geny mohou obsahovat nebo se skládat z proteinů. Vědci tedy pokládali buněčné jádro za centrum syntézy bílkovin. V roce 1941 Caspersson navrhl, že RNA se bude podílet na syntéze proteinů[18]. V souladu s tímto nápadem si Caspersson stále myslel, že protein je nositelem informace z jádra buňky a střídavě byla syntéza proteinů v cytoplazmě aktivována do jisté míry RNA. Genetická role virové RNA byla dokázána v roce 1952 [19] jako její schopnost infekce.

Zpočátku tedy vědci neviděli zřejmý rozdíl mezi RNA a DNA. Pozdějšími experimenty chemici zjistili, že RNA obsahuje odlišný cukr od DNA a od něj se odvodil název ribonukleová kyselina. Až následně byly objeveny rozdíly v bázích, tymin byl nahrazen uracilem a vyskytovaly se zde další neobvyklé báze.

2.1.2. Druhy RNA

Se stále lepší experimentální technikou objevují vědci různé druhy RNA molekul. Funkce notoricky známých druhů RNA (mRNA, tRNA, rRNA) už byly objasněny, nicméně princip RNA interferencí a dalších ncRNA není stále úplně jasný (*Tabulka 1*). Stručně řečeno, mRNA se podílí na přenosu genetické informace, tRNA na sebe váže aminokyselinu a svým antikodonem se přiřadí na kodon mRNA, rRNA je pak základem ribozomů, strojů syntetizujících proteiny.

První návrh existence mRNA (informační ribonukleová kyselina) se objevil na konci padesátých let a zapadal do myšlenky základního biologického dogmatu, kde se DNA přepisuje na RNA a následně RNA tvoří templát pro syntézu proteinů. Příliš krátký život molekuly mRNA komplikoval její izolaci, ale na konci šedesátých let byl tento problém překonán [20-21].

Tabulka 1 Seznam RNA molekul a jejich krátká charakterizace.

TYP RNA	FUNKCE
mRNA	messenger RNA, koduje proteiny
	ribosomální RNA, struktura ribozomu a
rRNA	katalýza syntézy proteinů
	transférová RNA, spojník mezi mRNA a
tRNA	aminokyselinami
	malá jaderná RNA, různé funkce v jádře,
snRNA	sestřih intronů
	Ribosomální RNA, struktura ribozomu a
snoRNA	katalýza syntézy proteinů
	malá cajalova RNA, modifikace snRNA a
scaRNA	snoRNA
miRNA	mikro RNA, regulace genové exprese
	malá interferující RNA, vypínání genové
	exprese na mRNA a ustálení chromatinové
siRNA	struktury
další	různé funkce v buňce zahrnující syntézu
nekodující	teleméry, inaktivace X chromozomu,
RNA	transport proteinů do ER

Transférová RNA (tRNA) je molekula skládající se ze 70 až 90 nukleotidů. Její funkcí je přenos aminokyselin na ribozom a podílí se tak na proteosyntéze. Aminokyselina se váže na 3' konec, kdy je vznik kovalentní vazby katalyzován aminoacyl-tRNA-syntázou. Molekula tRNA obsahuje specifické nukleotidy, které vznikly modifikací původních nukleotidů. Patří mezi ně pseudouridin, dihydrouridin, tymin, který se vyskytuje pouze v DNA, a mnoho metylovaných nukleotidů jako metylguanin.

Ribosomální RNA (rRNA) se vyskytuje v hojné míře v ribozomech, malých organelách v cytoplazmě a na povrchu endoplazmatického rezidua, kde se odehrává syntéza proteinů. V počátcích se vědci domnívali, že hlavní funkce v ribozomu zastávají proteiny. S postupem času vyšly na povrch informace, že nejdůležitější funkce

mají na starost právě malé molekuly rRNA. Podílí se na tvorbě peptidové vazby a rozeznávají kodony mRNA.

Zvláštním druhem RNA jsou pak ribozymy. Jde o primitivní katalyzátory chemické reakce. Ve většině případů jsou dnes katalyzátory chemických reakcí proteinové povahy a RNA katalyzátory se vyskytují jen okrajově. Nicméně z pohledu evoluce mohly mít RNA katalyzátory velký význam v prebiotické fázi života (viz kapitola 2.1.5).

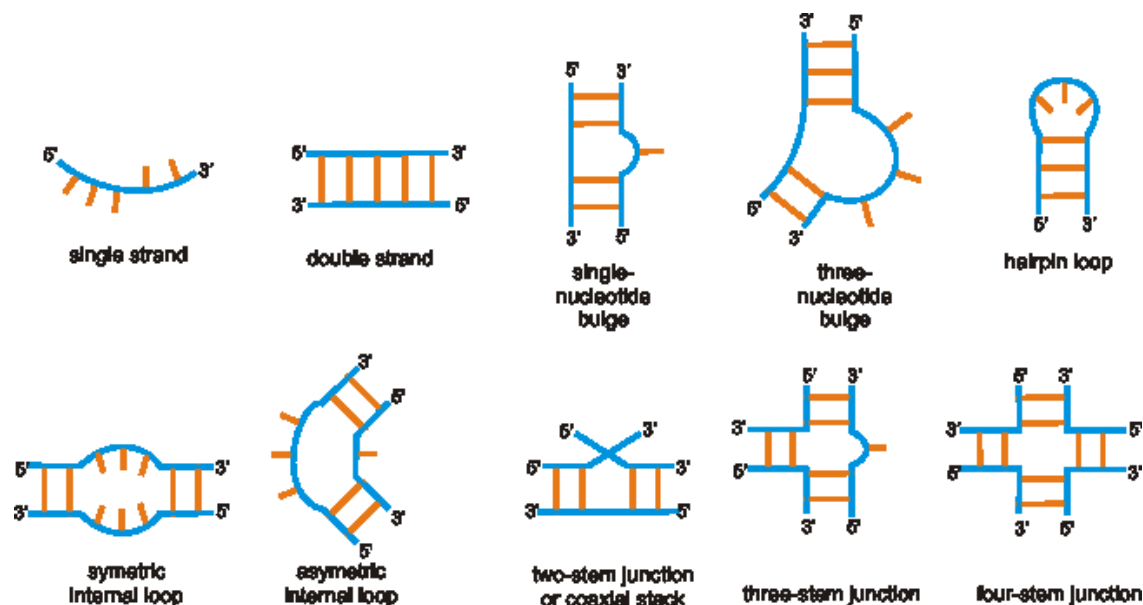
2.1.3. Struktura RNA

Základní jednotkou struktury RNA jsou nukleosidy. Ten se skládá z báze, která je spojena s cukernou jednotkou N-glykosidovou vazbou. Pokud se na nukleosid naváže fosfátová skupina na pozici C5', nazýváme tuto jednotku nukleotidem. Jednotlivé nukleotidy se na sebe váží diesterovou vazbou na pozici 5' a 3' za vzniku polynukleotidových řetězců.

Primární struktura je dána pořadím bází a je vždy zapisována ve směru od 5' konce k 3' koncem. Primární struktura je stejně definována u RNA, DNA nebo proteinů. S dalším prostorovým uspořádáním do sekundárních a terciárních struktur se molekula RNA stabilizuje a přizpůsobuje vnějším podmínkám [22]. Sekundární struktura je znázornění párování bází a reprezentována mnoha různými tvary (*Obrázek 2*). Je úzce spjat s párováním jednotlivých bází na základě tvorby vodíkových vazeb. Dalším stupněm organizace jsou terciární struktury, které jsou definovány jako prostorové uspořádání polynukleotidového řetězce. Jde o spojení sekundárních struktur pomocí mnoha van der Waalsových kontaktů a vodíkových vazeb. Zde se uplatňují další interakce, které nejsou zahrnuty do klasifikace sekundárních struktur např. interakce báze-fosfát [23].

Báze jsou planární aromatické heterocykly rozdělené do dvou skupin – pyrimidinové cytosin, thymin a uracil a purinové báze adenin s guaninem. Délka vazeb, úhly a celková geometrie všech bází, nukleosidů a nukleotidů byly zjištěny především rentgenovou krystalografií. Tyto parametry pak byly zavedeny do silových polí např. programového balíku Amber nebo Charmm a jsou používány pro molekulárně mechanické výpočty a molekulárně dynamické simulace.

Obrázek 2 Sekundární struktury, které může tvořit molekula RNA na základě párování nukleotidů.



Cukerná jednotka (ribóza) není v DNA nebo RNA planární a této neplanaritě se odborně říká vrásnění („puckering“). Přesnou konformaci cukerného kruhu můžeme popsat pomocí pěti torzních úhlů τ_0 (mezi atomy O4' a C1'), τ_1 (mezi atomy C1' a C2'), τ_2 (mezi atomy C2' a C3'), τ_3 (mezi atomy C3' a C4') a τ_4 (mezi atomy C4' a O4'). Známe několik typů vrásnění, které od sebe dělí energetická bariéra, a můžeme je definovat parametry P a τ_m [24]. Parametr P značí úhel pseudorotace a τ_m maximální stupeň vrásnění. Úhly pseudorotace jsou vyobrazeny na pseudorotačním kruhu a pohybuje se tedy mezi hodnotami 0-360 stupni. *Puckering* lze jednoduše vypočítat v programovém balíku Amber.

2.1.4. Virus hepatitidy D

V roce 1977 italský vědec Mario Rizzetto z Turína publikoval výskyt nového druhu hepatitidy B (HBV)[25], kterým trpěli lidé nakaženi klasickým virem hepatitidy B. Tento antigen, označován jako delta antigen, byl lokalizován v jádře jaterních buněk. Jeho výskyt je úzce spjat s přítomností viru hepatitidy B, neboť využívá HBV povrchový antigen (HBsAg) jako vlastní obal. V roce 1986 byl naklonován a sekvencován RNA genom viru hepatitidy D (HDV). Jedná se cirkulární RNA molekulu podobající se rostlinným viroidům[26]. Do dnešní doby byl virus hepatitidy D izolován pouze z lidských buněk.

HDV virion, nejmenší jednotka viru, která dokáže infikovat hostitele a množí se v něm, je velký 36 nm. Tato částice se stává reaktivní pouze ve spojení s proteiny HBsAg. Tento protein je syntetizován virem hepatitidy B. Virus je velmi odolný vůči vysokým teplotám, kdy dokáže přežít až 30 hodin při 60°C. Stabilita cirkulární RNA molekuly je dána hlavně párováním bází a tvorbou sekundárních struktur.

Molekula cirkulární RNA viru hepatitidy D se skládá přibližně z 1600 nukleotidů, kde obsahuje mnoho otevřených čtecích rámců (ORF). Nicméně pouze jeden ORF obsažený v antigenomické formě HDV je konzervován [27]. Tento ORF kóduje antigen hepatitidy D (HDAg). Dodnes není známa funkce ostatních otevřených čtecích rámců. Genomická i antigenomická molekula RNA se vyznačuje autokatalytickým štěpením. Ke štěpení dochází za přítomnosti hořčnatých iontů a bez pomoci proteinů. Tím, že se jedná o katalytickou aktivitu, můžeme označit část cirkulární RNA, kde dochází ke štěpení, jako ribozym, RNA enzym. Celý ribozym se skládá z 85 nukleotidů, z nichž jsou některé nukleotidy silně konzervované pro zachování aktivity ribozymu [28].

Velmi zajímavá je replikace a množení viru. Model, jak vstupuje virus do buňky, není znám, ale je možné, že k vstupu je zapotřebí interakce HBsAg s buněčným receptorem[29]. Virální RNA je transportována do jádra pravděpodobně za pomoci HDAg. V jádře pak chytře využívá lidskou RNA polymerázu II a RNA molekula je replikována přes „double rolling circle model“[30], popsany na (viz kapitola 2.1.6).

Vznik viru hepatitidy D není zatím jasný, nicméně jak jsem již výše zmínil, je závislý na viru hepatitidy B. Nebyla však pozorována sekvenční homologie mezi HDV a HBV. Fylogeneticky může být HDV spjat s rostlinnými satelitními viry jako je například virus tabákové mozaiky. RNA sekvence HDV se liší v závislosti na geografické poloze a také aminokyselinová sekvence izolovaného proteinu HDAg se ve virech hepatitidy D liší.

Mnoho otázek týkající se viru hepatitidy D, jako enzymatická aktivita při replikaci HDV, funkce různých forem HDAg, jsou stále nezodpovězené. HDV je jakýmsi pomyslným mostem mezi rostlinnými a zvířecími viry. Pochopení všech procesů viru hepatitidy D bude hrát důležitou roli pro budoucí vývoj prevence a léčby infekce HDV.

2.1.5. Ribozym

RNA molekuly se stejně jako proteiny skládají do stabilních terciárních struktur a jsou schopny biologické katalýzy [31]. Od jejich objevení před více než 30 lety byly katalytické RNA, ribozymy, nalezeny v mnoha biologických procesech jako sestřih („*splicing*“) intronů, translace, genová regulace často za přítomnosti proteinů [32]. Pro funkci ribozymů je typická přítomnost divalentních iontů Mg^{2+} [33], nicméně např. aktivita hairpin ribozymu nezávisí na typu iontů.

Ribozymy jsou často rozdělovány do dvou skupin. Prvními jsou velké ribozymy jako jsou samo-sestřihovací introny skupiny I a II nebo ribonukleáza P. Tyto katalytické RNA jsou velké přes 200-300 nukleotidů, obsahují terciární domény a mají aktivní místo, které je schopné vázat další molekuly RNA, nukleotidy nebo molekuly vody. Štěpí RNA substrát a vytváří 5'-konec s fosfátovou skupinou a 3'-konec s hydroxylovou skupinou. Tyto ribozymy nám prvně ukázaly roli kovových iontů v katalytických reakcích RNA molekul [34-36]. Mg^{2+} ionty se účastní přímo katalýzy, kde se chová jako Lewisova kyselina, která aktivuje nukleofilní skupinu, neutralizuje náboje koncových skupin a stabilizuje vysoce negativní náboj transitních stavů.

Malá ribozymy tvoří další hlavní skupinu katalytických RNA molekul. V přírodě se vyskytující členové této skupiny jsou např. ribozym viru hepatitidy D, hammerhead, hairpin, VS a ribozym glmS riboswitch. Malé ribozymy jsou většinou menší než 150 nukleotidů a mají pouze jednu funkci a to vykonávat fosfodiesterovou samoštěpící reakci. Aktivovaná 2'-hydroxylová skupina nukleotidu napadá fosfátovou skupinu následujícího nukleotidu. Produktem této reakce je pak 2',3' cyklický fosfát a 5'-hydroxylová skupina. Na rozdíl od velkých ribozymů, kde byla katalytická reakce zprostředkována hlavně přes kovový ion, malé ribozymy používají v mechanismu samoštěpící reakce bázi určitého nukleotidu nacházející se v aktivním místě [37].

2.1.6. Ribozym hepatitidy D

Ribozym viru hepatitidy D je malá samoštěpící RNA molekula, která stejně jako hammerhead nebo hairpin ribozym tvoří během procesu „*rolling-circle replikace*“ jednoláknité RNA [38-39]. Tyto malé ribozymy katalyzují štěpení fosfodiesterové vazby. Dnes jsou známy dvě formy HDV ribozymu, genomická a antigenomická, které se syntetizují během replikace viru. Celý ribozym se skládá z 85 nukleotidů, z nichž

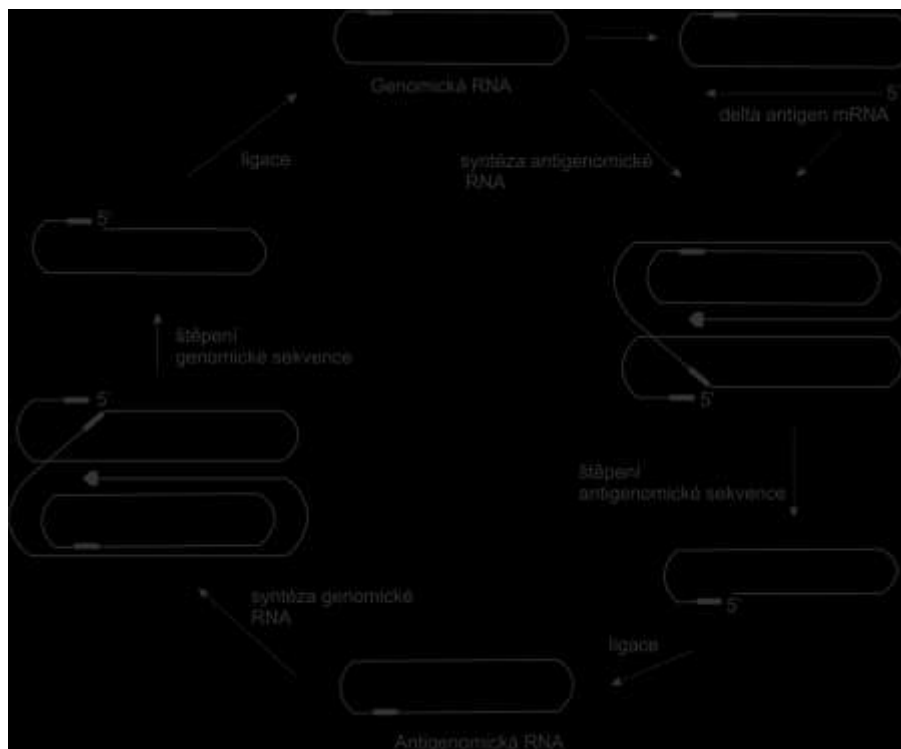
jsou některé nukleotidy silně konzervované pro zachování aktivity ribozymu [28]. Struktura ribozymu je tvořena sekundárními segmenty, které se podílí na stabilitě celé struktury.

Tabulka 2 Souhrn struktur HDV ribozymu dostupné na serveru Protein Data Bank. Struktury jsou označovány čtyř místnou zkratkou, jež jsou uvedeny v prvním sloupci.

struktura	metoda	rozlíšení	stav	ionty
1sj3	X Ray Diffraction	2,20 Å	prekurzor	Mg ²⁺
1sj4	X Ray Diffraction	2.70 Å	prekurzor	Cu ²⁺
1vbx	X Ray Diffraction	2.70 Å	prekurzor	EDTA
1sjf	X Ray Diffraction	2.75 Å	prekurzor	[Co(NH ₃) ₆] ³⁺
1vby	X Ray Diffraction	2.80 Å	prekurzor	Mn ²⁺
1vbz	X Ray Diffraction	2.90 Å	prekurzor	Ba ²⁺
1vc0	X Ray Diffraction	2.50 Å	prekurzor	Sr ²⁺
1vc5	X Ray Diffraction	3.40 Å	prekurzor	EDTA
1vc6	X Ray Diffraction	2.80 Å	prekurzor	Mg ²⁺
1vc7	X Ray Diffraction	2.45 Å	prekurzor	Sr ²⁺
1drz	X Ray Diffraction	2.30 Å	produkt	Mg ²⁺
2oj3	X Ray Diffraction	2.90 Å	prekurzor	Tl ⁺ a [Co(NH ₃) ₆] ³⁺
1cx0	X Ray Diffraction	2.30 Å	produkt	Mg ²⁺
2oih	X Ray Diffraction	2.40 Å	prekurzor	Tl ⁺
3nkb	X Ray Diffraction	1.92 Å	prekurzor	Mg ²⁺

Velmi zajímavé je množení samotného viru hepatitidy D (HDV). Infekce virem hepatitidy D vyžaduje předchozí infekci virem hepatitidy B (HBV) a HDV se zde vyskytuje tedy jako satelitní virus hepatitidy B. Pro replikaci HDV genomu byl navržen „double rolling circle model“ [30] (Obrázek 3). Cirkulární virální genomická RNA molekula je přepisována pomocí lidské RNA polymerázy II na antigenomické multimerní vlákno. Poté dojde ke štěpení antigenomického HDV ribozymu a následné ligaci, jejichž mechanismus stále není úplně objasněn. Celý proces se následně opakuje za vzniku další cirkulární genomické RNA. Tento mechanismus replikace je hojně využíván u prokaryot, nicméně cirkulární DNA nebo RNA jsou nacházeny i v lidských buňkách.

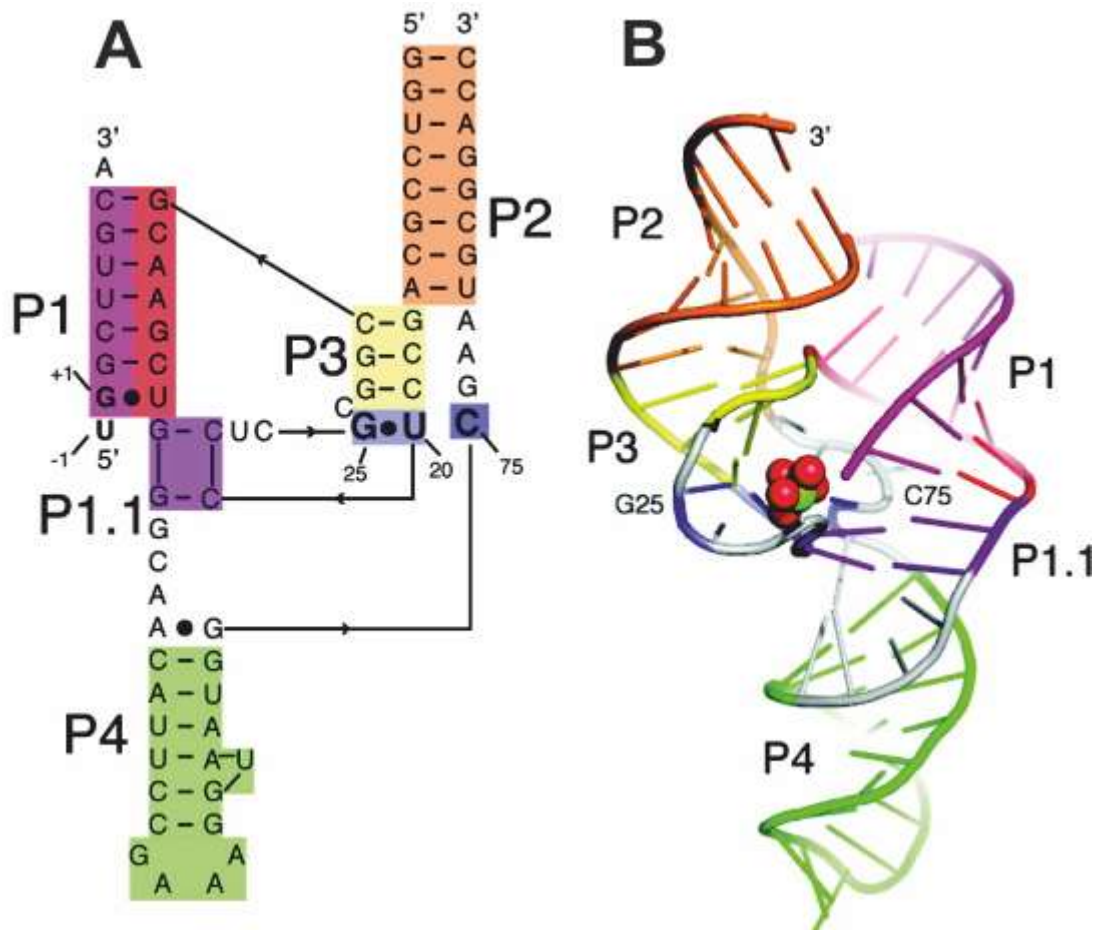
Obrázek 3 Rozmnožovací cyklus ribozymu hepatitidy D. K syntéze antigenomického a genomického vlákna RNA používá virus lidskou RNA polymerázu. Reakce štěpení se využívá ribozym hepatitidy D, kde dochází k samoštěpící reakci.



2.1.7. Struktura HDV ribozymu

Minimální sekvence požadovaná pro optimální samoštěpící aktivitu genomické a antigenomické RNA molekuly *in vitro* je složena z jednoho nukleotidu na 5' konci a dalších 84 nukleotidů na 3' konci od štípaného fosfátu [40-42]. Struktury, které obsahují méně než 84 nukleotidů na 3' konci, jsou pak inaktivní nebo méně stabilní než samotná v přírodě se vyskytující struktura HDV ribozymu [40-41, 43]. Pokud naopak přidáme sekvenci další nukleotidy, potřebujeme často denaturant nebo vysoké teploty pro efektivní účinnost reakce [40-43]. Jako většina katalytických RNA molekul také HDV ribozym potřebuje pro průběh reakce divalentní ionty [41, 44-46].

Obrázek 4 Struktura ribozymu hepatitidy D. (A) Primární a sekundární struktura genomické formy ribozymu hepatitidy D. (B) 3D struktura s barevně vyznačenými sekundárními segmenty. Hořčnatý kation se svou hydratační sférou je kulově vyznačen v reakčním centru ribozymu. Obrázek byl převzat z [8].



HDV ribozym se skládá do stabilní struktury skládající se z pěti šroubovicových segmentů spojené jako „*double pseudoknot*“ (**Obrázek 4**). Tyto regiony jsou spojeny do helikálních struktur přes vodíkové vazby bází jednotlivých nukleotidů a jsou značeny jako P1 kmen („*stem*“) až P4 kmen. Z krystalových strukturních dat byla zjištěna přítomnost šroubovice skládající se pouze ze dvou nukleotidů P1.1. Těchto pět kmenů tvoří dva paralelní sloupce („*stack*“): P1, P1.1 a P2 vytváří koaxiální sloupec, zatímco P2 a P3 tvoří druhý koaxiální sloupec. Dva šroubovicové kmeny jsou navzájem spojeny spojovacími částmi, nepárové nukleotidy, které se označují zkratkami J1/2 a J4/2. Jedná se o spojení mezi kmeny P1,P3 a na konci kmenu P1.1. Celková struktura je stabilizována působením párování mezi bázemi, stohování („*stacking*“) a interakcí

nekanonických párů mezi bázi a páteří nebo páteří a páteří. Kompaktní struktura zanořuje 5'-konec hluboko do aktivního místa, kde dochází k štěpící reakci mezi atomy G1(P) a G1(O5'), obklopen nukleotidy potřebných pro katalýzu. Spirálové skládání HDV ribozymu má výrazný vliv na jeho stabilitu, kdy přerušením jednoho ze dvou *pseudoknotů* ztrácí výrazně svou aktivitu. Rozštěpením ribozymu na pozici J1/2, který zničí první *pseudoknot*, produkuje ale aktivní molekulu označená jako *trans-acting* HDV ribozym. Nicméně tyto molekuly mají rychlost štěpící reakce přibližně o dva řády pomalejší než rychlost klasických *cis-acting* HDV ribozymů [28]. Experimentální práce zabývající se mutací nebo delecí jednotlivých nukleotidů demonstrují důležitost čtyř nukleotidů tvořících kmen P1.1. Jejich delece nebo mutace na nukleotidy, které zničí šroubovici P1.1 a z toho důvodu zmizí druhý *pseudoknot*, vede k snížení rychlosti o tři až pět řádů [47-48].

Aktivní místo se skládá z několika nukleotidů, s jejichž pomocí dochází k samoštěpící reakci fosfátové páteře mezi nukleotidem U-1 a G1. P1 helix formuje okraj aktivního místa svým „wobble“ párem (G1/U37), který tvoří z jeho spodku „stack“ s kmenem P1.1. Výzkum zaměřující se na mutaci nukleotidů zjistil, že energie tohoto „stacku“ a pozice 5'-konce má vliv na aktivitu a ne tolik už mutace G1/U37 „wobble“ páru [49]. Dalším esenciálním nukleotidem pro reakci je cytosin na pozici 75 u genomické struktury a 76 u antigenomické struktury, jehož mutace na uracil nám pomáhá inaktivovat ribozym a získat tak strukturu prekurzoru.

2.2. HDV RIBOZYM: EXPERIMENTÁLNÍ DATA

Ribozym hepatitidy D je jedna z nejrychlejších přírodně se vyskytujících samoštěpících se RNA molekul. Jeho rychlostní konstanta se pohybuje kolem 1 s^{-1} [47]. K rozštěpení páteře RNA dochází na 5'-konci v katalytickém jádře a je dáno také sekvencí nukleotidů nad místem rozštěpení [50]. Isotopový efekt [51], činnost protonu [52] a biochemické experimenty s profily křivek rychlosti reakce v závislosti na pH [53] ukazují, že rychlost limitující reakcí je u ribozymu hepatitidy D přenos protonu. Zvoncovitý profil pH křivek při štěpící reakci naznačuje dva body ekvivalence o hodnotě $\text{pK}_a \sim 6.5$ a ~ 9.0 [54]. Pro samoštěpící reakci je zapotřebí přítomnost divalentních kationtů Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} nebo Co^{2+} [52, 55]. Co se týče monovalentních iontů, tak ty také podporují katalýzu, ale pouze za velké koncentrace ($\sim 1 \text{ M NaCl}$) a mnohem pomaleji [51]. Komplexní kation $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ napodobuje

hydratovaný kation Mg^{2+} jako ve velikosti, tak v geometrii a inhibuje reakci ribozymu hepatitidy D [51].

Z velmi intenzivních experimentálních studií se dnes vyvinuly dvě teorie na katalýzu samoštěpení HDV ribozymu. Patří mezi ně mechanismus, kdy báze C75 hraje úlohu obecné kyseliny „general acid“ (GA) nebo obecné báze „general base“ (GB). Oba tyto mechanismy jsou závislé na přítomnosti nukleotidu C75 a pravděpodobně také iontů. Experimentátoři používají moderních instrumentálních metod, jako jsou IR spektrometrie, Ramannova spektrometrie [51], rentgenová strukturní analýza [28], ale i titrační metody [45, 53], pro objasnění mechanismu samoštěpení HDV ribozymu a jeho závislosti na vnějších podmínkách (pH, ionty).

Jako příklad velmi zajímavého experimentu můžeme uvést výzkum aktivity v roztoku imidazolu. Zjistilo se, že při nahrazení esenciálního nukleotidu C76 antigenomické sekvence uracilem, převezme úlohu přenosu protonu imidazol a samoštěpící reakce pokračuje [53].

2.2.1. Mechanismus obecné zásady (general base)

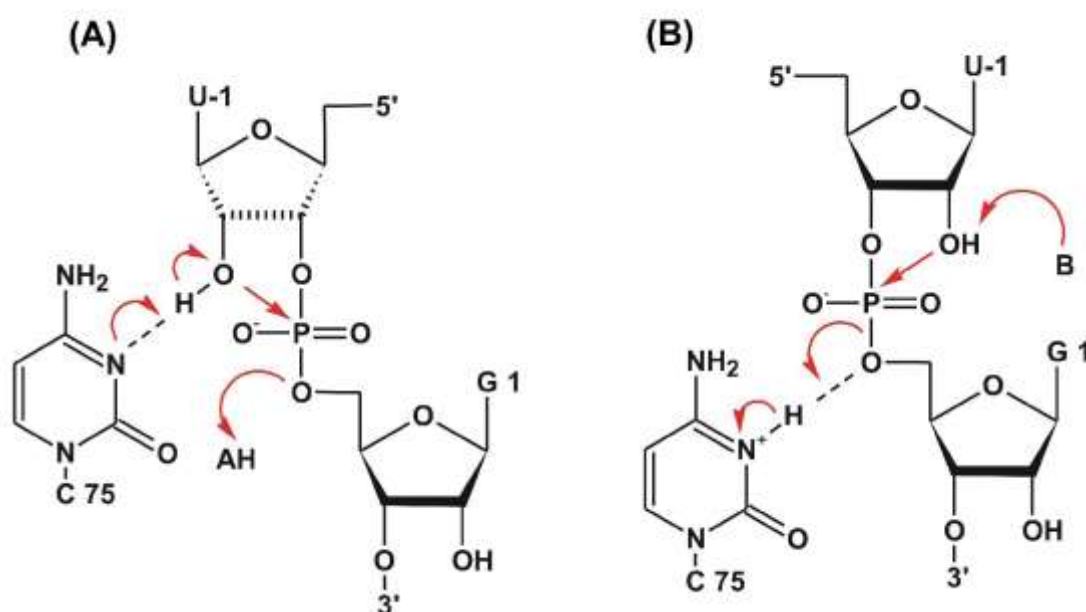
Mechanismus obecné zásady byl podpořen několika experimenty zaleženými na tom, že aktivita katalytické reakce v přírodě se vyskytujícího HDV ribozymu s katalytickým nukleotidem C75 roste se stoupající hodnotou pH [53]. Aktivita naprosto vymizí při nahrazení C75U. Tato teorie byla podpořena krystalovými strukturami *cis-acting* HDV ribozymu [56] a celý mechanismus byl podpořen teoretickými metodami jako jsou molekulární dynamika nebo hybridní metoda kvantové mechaniky/molekulární mechaniky (QM/MM) [57]. Teoretické studie vycházely z předpokladu, že se nukleotid chová jako obecná báze a ion Mg^{2+} naopak jako kyselina. Nejnižší reakční bariéra byla stanovena na 19,6 kcal/mol [58], což je ve velmi dobré shodě s experimentální hodnotou 18,2 kcal/mol [51, 59]. Z většiny strukturních dat *cis-acting* HDV ribozymu vyplývá uspořádání aktivního místa vhodné pro mechanismus obecné báze. Teoretické QM/MM výpočty přišly navíc s důkazem, že reakce je i s energetického hlediska možná. Které atomy se přesně účastní mechanismu obecné báze je schématicky vyobrazeno na *Obrázek 5A*.

2.2.2. Mechanismus obecné kyseliny (general acid)

Naopak mechanismus obecné kyseliny nevyplývá z většiny krystalových struktur získaných krystalizací *cis-acting* HDV ribozymu. Experimenty založené na nahrazení hořečnatých iontů monovalentními ionty ukázaly ale opačnou křivku závislosti rychlosti katalytické reakce na velikosti pH. Za nízkého pH lze pozorovat největší rychlost a experiment tak podporuje myšlenku, že by se nukleotid C75 mohl chovat jako obecná kyselina [51]. Narozdíl od krystalových struktur prekurzorů *cis-acting* HDV ribozymu, struktury produktů se nachází v geometrii, kdy je v kontaktu 5'-hydroxylový konec s atomem C75(N3), což by odpovídalo stavu pro reakci proběhlé mechanismem obecné kyseliny [8]. Hlavním důvodem, proč se neupustilo od této teorie, byly experimenty s *trans-acting* HDV ribozymem antigenomické molekuly HDV ribozymu. Tyto experimenty ukázaly, že nukleotid C75 je naprosto postradatelný v případě, kdy se nahradí 5' kyslík za síru [59].

Poslední strukturální data z rentgenové krystalografie ukázaly konformaci aktivního místa pro prekurzor, kde je C75 v pozici pro obecnou kyselinu a může se tedy nacházet v protonovaném stavu na atomu N3 [8]. Šlo o strukturu *trans-acting* HDV ribozymu. Aby mohla být struktura získána jako prekurzor, musela být struktura ribozymu inaktivována. Experimentátoři tentokrát nenahradili C75 za uracyl, neboť je zde předpoklad, že tato mutace napomáhá špatnému složení struktury aktivního místa, ale odstanili 2'-OH nukleotidům U-1, G1 a G2. Podle domodelování struktury na základě HHRz tvoří exocyklická amino skupina nukleotidu C75 vodíkovou vazbu s kyslíkem fosfátu nukleotidu C22, který se nachází ve smyčce L3, a atom C75(N3) je v kontaktu s O5' kyslíkem rezidua G1. Toto uspořádání je velmi podobné produktové struktuře. Důležitá je pozice hořečnatého iontu v aktivním místě, která vyplývá z biochemických, krystalografických a výpočetních dat [60-64]. Pro pozici je nepostradatelný „wobble“ pár U20/G25 v pozici *anti*, který tvoří dostatečnou kapsu záporného potenciálu pro záchyt iontu. Mutací G25A se tato schopnost vázat ionty destabilizuje změnou na klasický Watson-Crickův pár a redukuje rychlost reakce podle experimentů Westhofa a Beena 50-3000 násobně oproti klasickému *cis* HDV ribozymu [47-48]. Schématický náčrt, jak by měl navržený mechanismus obecné kyseliny vypadat, je vyobrazen na *Obrázek 5B*.

Obrázek 5 Dva navrhované mechanismy štěpení HDV ribozymu: **(A)** Mechanismus obecné zásady – atom U-1(O2') je deprotonován nukleotidem C75, proton se váže na atom C75(N3). Štěpení se děje na atomu G1(O5'). Ten získává proton od obecné kyseliny, kterou může být molekula vody koordinovaná na hořečnatý iont. **(B)** Mechanismus obecné kyseliny – proton atomu G1(O5') je poskytován protonovaným nukleotidem C75. Nukleofil U-1(O2') je deprotonován obecnou bází. Obrázek byl převzat z práce[58].

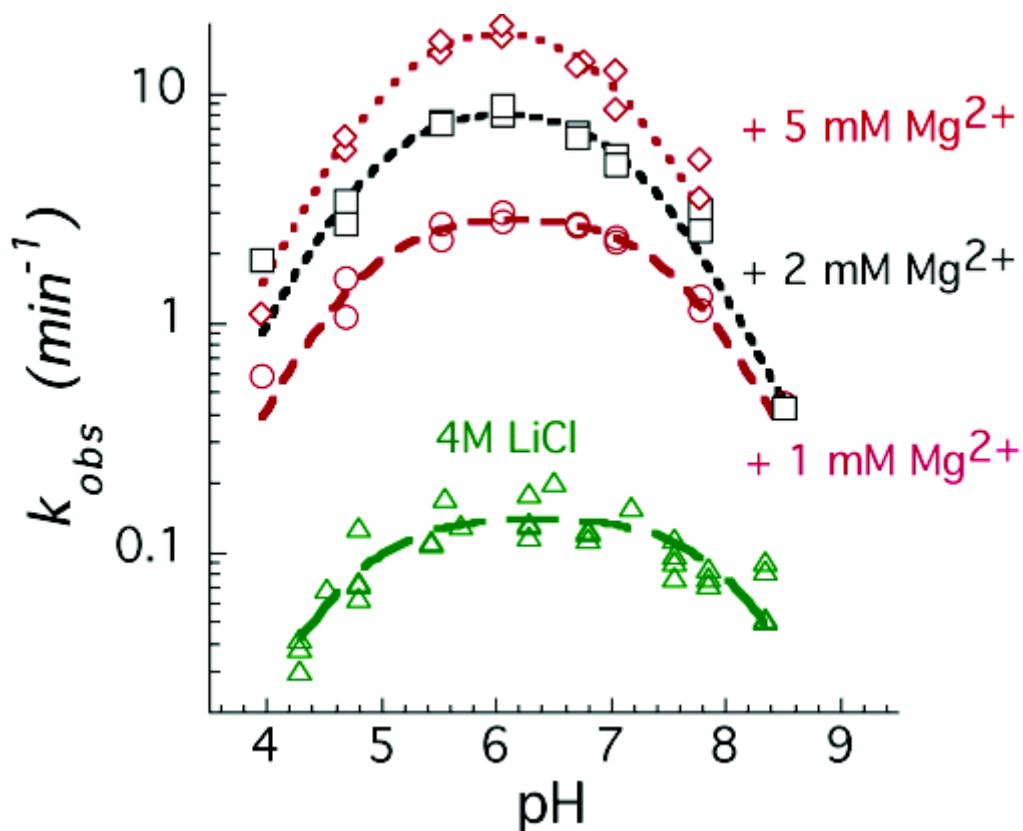


2.2.3. Závislost aktivity na pH v monovalentní soli

Křivky závislosti rychlosti reakce na hodnotě pH v monovalentní soli jsou zvoncovitého tvaru [65]. Zvoncovité křivky jsou charakteristické pro genomickou molekulu HDV ribozymu s hořečnatými ionty, ale podobně tomu je i v monovalentní soli jako LiCl, NaCl a NH₄Cl, kdy jsou křivky ale poněkud širší a optimální pH pro průběh reakce se nachází níže (~6-7 pH) ve srovnání s hořečnatou solí (7,5 pH)[65]. V dřívější studii byla nejvyšší aktivita reakce genomické struktury HDV ribozymu v 1M NaCl a 1mM EDTA (kyselina etylendiamintetraoctová) pod hodnotou pH~6 a klesala se vzrůstající hodnotou pH [51], což vedlo k předpokladu možného mechanismu obecné kyseliny. Měření hodnot rychlostní konstanty u roztoků, jejichž hodnota pH byla větší než 8,5, bylo znehodnoceno nespecifickou degradací RNA molekuly v monovalentní soli. Skutečná hodnota pH v 4M monovalentní soli je totiž

vyšší než bylo naměřeno a docházelo tak k alkalické degradaci, která je typická pro hodnoty pH 9,5 nebo 10. Důvodem pro posun hodnot pH u monovalentních solí může být vliv ionizace na pufr a skupiny v ribozymu, nebo vliv vysoké koncentrace soli na protonovou aktivitu měřenou skleněnou elektrodou [66]. Pokud k monovalentní soli byla přidána ještě divalentní sůl obsahující hořčík, rychlost reakce se zvyšovala, ale optimální hodnota pH pro průběh reakce zůstala na hodnotě kolem 6 (Graf 1). Z experimentálních výsledků vyplývá fakt, že divalentní ionty mají výraznější vliv na rychlost reakce než monovalentní ionty [65].

Graf 1 Závislost rychlosti štěpící reakce genomického ribozymu hepatitidy D na pH v $MgCl_2$ soli a $LiCl$ soli. Se zvyšující koncentrací $MgCl_2$ soli probíhá reakce rychleji. Křivka závislosti rychlosti reakce na pH má jak v monovalentní, tak divalentní soli zvoncovitý tvar s optimálním pH v neutrální oblasti. Obrázek byl převzat z [65].

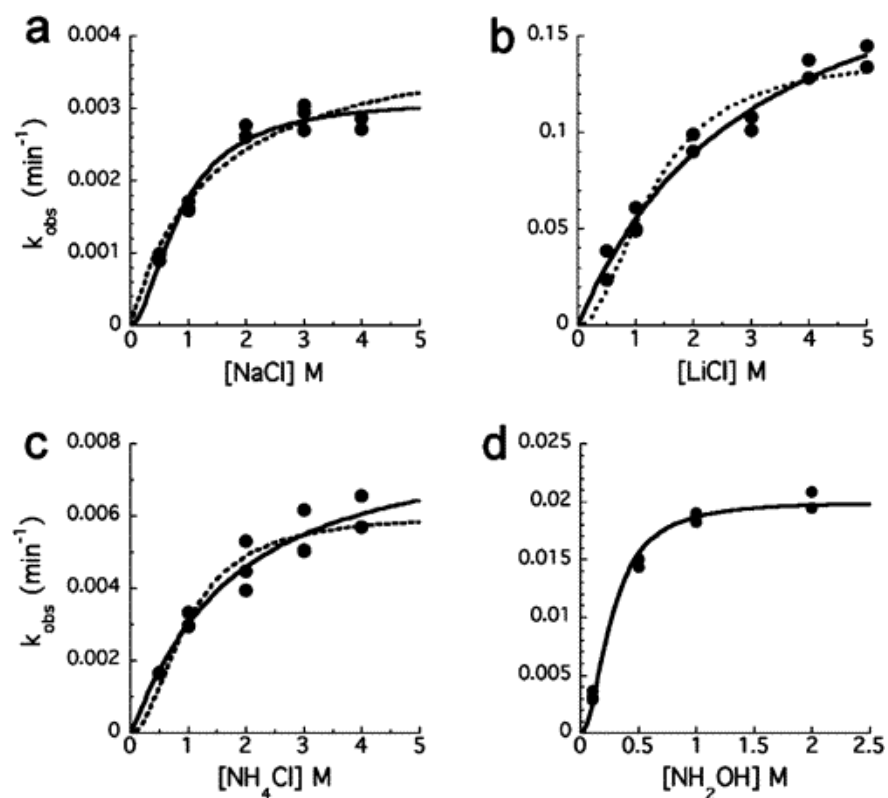


2.2.4. Aktivita HDV ribozymu v monovalentní soli

Za fyziologických podmínek využívá HDV ribozym pro svou katalytickou aktivitu divalentní ionty Mg^{2+} . Experimenty založené na absenci divalentních iontů ukázaly, že samoštěpící reakce může proběhnout i za přítomnosti monovalentních iontů.

Rychlostní konstanta reakce rostla v závislosti na koncentraci monovalentních iontů a druhu monovalentních iontů u genomické struktury HDV ribozymu[65] (*Graf 2*). Po překročení určité koncentrace dochází k nasycení a rychlostní konstanta se dále již nezvedá. Nejlépe lze tento jev pozorovat u sodných iontů. Pokud byly Na^+ ionty nahrazeny Li^+ ionty, rychlostní konstanta se až 50 násobně zvýšila. Aktivita byla pozorována i u iontů NH_4^+ . I tento iont vykazoval větší aktivitu ribozymu než tomu bylo u iontů Na^+ .

Graf 2 Závislost rychlostní konstanty genomického ribozymu hepatitidy D na koncentraci monovalentní soli. Rychlostní konstanta byla měřena pro systém s NaCl za konstantního pH=6,1 (a), s LiCl v pH=6,3 (b), s NH_4Cl v pH=6,6 (c) a s NH_3OH v pH=5,8 (d). Grafy byly převzaty z [65].



V dřívějších experimentálních pracích bylo zjištěno, že aktivita antigenomické struktury HDV ribozymu při koncentraci 1M NaCl bez Mg²⁺ iontů byla až 20-krát menší než tomu bylo u genomické struktury za stejných podmínek[67]. Nicméně se zvyšující se koncentrací monovalentní soli už byl průběh podobný genomické struktuře. Stejně výsledky ukazovala antigenomická struktura u aktivity ribozymu v závislosti na typu monovalentního iontu. Neboť nebyly pozorovány křivky nasycení, je zřejmé, že antigenomický ribozym potřebuje pro svou aktivitu mnohem vyšší koncentrace, aby dosáhla aktivity genomického ribozymu [65].

Monovalentní sůl inhibuje aktivitu genomického i antigenomického ribozymu za přítomnosti divalentní soli. Tyto výsledky ukazují, že v ribozymu je mnoho míst, kde se mohou vázat ionty kovů, které se v reakci chovají jako kofaktory reakce [65].

2.3. BIOINFORMATIKA

Bioinformatika je moderní věda, která se vyvinula společně s rozvojem výpočetní techniky. Definice pojmu bioinformatika jsou na internetu různé od těch nejobecnějších až po velmi striktní. Nejvíce mě zaujala formulace ze serveru <http://bioinformatics.org>, kde bioinformatika je definována jako oblast na pomezí biologie a informatiky, která se zabývá především zpracováním, prohledáváním a analýzou dat o sekvenci a struktuře biologických makromolekul [68]. V bioinformatice se nachází i mnoho matematiky, převážně statistiky.

Jak nám může pomoci tento vědní obor v počítačových simulacích? Už jen samotný ribozym hepatitidy D (viz kap. 2.1.9) je v PDB databázi evidován hned několikrát, nehledě na to, že počet anotací ve veřejně dostupných databázích stále narůstá. PDB server obsahuje informace o struktuře proteinů, nukleových kyselin a komplexů, které byly získány z experimentů. Strukturu si zde můžete najít, prohlédnout, stáhnout či analyzovat přímo na serveru a zcela zdarma.

Podle čeho si tedy vybíráme strukturu, se kterou budeme počítat molekulární dynamiku? Nejdříve zjistíme, z jakého organismu byla struktura získána. Následně nás bude zajímat, jaká metoda byla pro studium struktury použita. Nejhlavnějším parametrem však ve většině případů bývá rozlišení. Pokud je rozlišení vysoké (mezi 1-2 Å) jde o velmi kvalitní a přesnou strukturu. Zainteresovaní jedinci, kteří se v dané

problematice vyznají, budou zvědavý i na stáří publikace struktury, neboť v novějších strukturách mohlo dojít k velkým změnám v důsledku lepší experimentální metody.

Praktická bioinformatika by se měla stát klasickým nástrojem všech strukturních biologů, genetiků, chemiků či biofyziků. Je to mocná věda, která vám pomůže najít a zpracovat data o struktuře makromolekul, pro váš další výzkum. To vše bez nutnosti hlubších znalostí matematiky a programování.

Bioinformatika nám pomáhá předpovídat strukturu biomakromolekul, popisuje párování bází a jejich anomálie a konformace jako vrtulovitý twist (ω), buckle (κ) a helikální twist (Ω). Mnohé počítačové programy používané pro popis morfologie struktury nukleových kyselin jsou: *CURVES*[69-70] používaný pro výpočet šroubovice převážně nesprávných struktur a upozornění uživatele na neshody v párování, *RNA*[71] pro výpočet helikálních parametrů a nestandardních bází nebo *CEHS*[72] zaměřený na lokální parametry používající vektor C6-C8 páru bází jako osu y. Pomocí softwaru x3DNA [73] získáme celkovou strukturální analýzu nukleových kyselin.

2.4. POČÍTAČOVÉ SIMULACE

K pochopení, jak RNA molekuly nesou svou biologickou funkci, je zapotřebí porozumět struktuře a dynamice molekuly na atomární úrovni, čehož může být významně dosaženo kombinací výpočetních simulací s experimenty. V mé diplomové práci používám nástroj teoretické chemie, molekulární dynamiku (MD), pro získání informací o dynamickém chování molekuly HDV ribozymu v čase v explicitním solventu. Samozřejmě že i molekulární dynamika má své omezení, ostatně jako jakákoliv jiná metoda experimentální či teoretická.

Jedno z primárních omezení molekulární dynamiky je vzorkování („*sampling*“). Vzorkování je statistický výběr z množství teoreticky množných pozorování a jeho účelem je vytvořit dostatečně velký statistický soubor umožňující předpověď hledaných charakteristik. V běžné praxi molekulární dynamiky to znamená, že bychom potřebovali nekonečné množství simulací pro jeden systém, abychom pokryly všechny možné vývoje systému a jejich pravděpodobnosti. To však v závislosti na náročnosti výpočtu není možné ani pro několikanásobné simulace jednoho systému, a tak se většinou musíme smířit s jednou, popřípadě dvěma simulacemi pro jeden systém. Se

zlepšující se výpočetní technikou dochází k prodlužování simulací na úroveň stovek nanosekund až mikrosekundy a dochází tím ke zkvalitňování vzorkování. Nicméně delší simulace mohou ukázat nedostatky silových polí („*force field*“), které se s přibývajícím časem kumulují a stávají se tak významným problémem. Časová škála jednotlivých simulací je stále krátká pro popis skutečných událostí, nicméně tento nedostatek může být z části překonán spuštěním několika simulací různých struktur nebo použitím rozšířeného vzorkování MD metod, jako je např. REMD (*replica exchange MD*).

Počítače produkují čísla a struktury, ale nejsou zodpovědné za spolehlivost výsledků a jejich interpretaci. Nesprávné použití těchto simulací může pak poskytovat data omezené hodnoty, které mohou být matoucí. Naopak správně použité simulace molekulární dynamiky doplňují a pomáhají pochopit experimenty a poskytují kvalitní předpovědi.

2.4.1. Molekulární dynamika

Ideální pro teoretického chemika by byla možnost použít přesné kvantové chemie pro výpočet všech molekul nevhledě na velikost. To vzhledem k náročnosti výpočtu není možné. Pro studium struktury a dynamiky biomakromolekul se tedy využívá jednodušší metoda jak z hlediska výpočtu tak pochopení a to molekulární dynamika. Zde se omezujeme pouze na Newtonovskou fyziku (zákon setrvačnosti, zákon síly a zákon akce a reakce).

Důležitým základním zjednodušením je Born-Oppenheimerova aproximace. Tato aproximace je založena na faktu, že jádra atomů jsou tisíckrát těžší než elektrony. Proton je asi dvoutisíckrát těžší než elektron. Z toho vyplývá, že elektrony mohou být považovány za částice, které velmi rychle následují pohyb jader. Dalším důsledkem oddělení dynamiky elektronů od jader je, že jaderné částice jsou lépe prostorově lokalizované. V molekulární dynamice kompletně zanedbáváme existenci elektronů a řešíme pouze pohyb celých atomů reprezentovány jako koule. Tyto částice nesou parciální náboj, který je lokalizován ve středu částice, mají určitý poloměr reprezentovaný VdW potenciálem, který působí mezi atomy, který je získaný

z experimentálních hodnot a vazby jsou reprezentovány jako harmonické oscilátory. Energie systému je pak funkcí souřadnic jednotlivých atomů (rovnice 1).

$$E = f(R) \quad (1)$$

2.4.2. Potenciální energie

Jádrem silového pole je funkce potenciální energie používaná pro popis vztahu struktury a energie (rovnice 1). Nicméně funkce potenciální energie sama o sobě nedělá silové pole. To je kombinací právě funkce potenciální energie a parametrů nezbytných pro tuto funkci. V molekulární dynamice je potenciální energie tedy vyjádřena parametricky. V softwaru AMBER [74] používán pro výpočet MD trajektorií jsou ne vazebné interakce vyjádřeny pomocí van der Waalsových a elektrostatických (Coulombických) interakcí a vazebné interakce jsou funkcí délky vazeb, vazebnými úhly a torzními úhly [75]. Celková potenciální energie je vyjádřena jako suma všech ne vazebných a vazebných příspěvků (rovnice 2).

$$E_{pot} = \sum E_{vazba} + \sum E_{úhel} + \sum E_{torze} + \sum E_{vdW} + \sum E_{Coulomb} \quad (2)$$

Pokud se podíváme, jak vypočítáme jednotlivé příspěvky, je to velmi jednoduché a ve většině případů se jedná o prosté kvadratické funkce. Energii vazeb a vazebných úhlů získáme podle rovnic (3). Jde o závislost druhé mocniny odchylky z rovnovážné polohy stavu.

$$E_{vazba} = \sum_{vazba} K_r (r - r_0)^2 \quad E_{úhel} = \sum_{úhel} K_\alpha (\alpha - \alpha_0)^2 \quad (3)$$

E_{vazba} značí vazebný příspěvek a $E_{úhel}$ vyjadřuje úhlový příspěvek k potenciální energii, r je vazebná vzdálenost, α vazebný úhel, r_0 a α_0 je hodnota optimální vazebné vzdálenosti či úhlu získaná z experimentů nebo kvantově chemických metod. Konstanty K_r a K_α vyjadřuje tuhost vazby a úhlů získané také z experimentů nebo kvantových výpočtů. Z důvodu, že se jedná o kvadratické funkce, je zřejmé, že v molekulární dynamice nemůžeme pozorovat disociaci vazeb.

Energie torzních úhlů už je vyjádřena poněkud složitěji a je stanovena jako superpozice několika funkcí (rov. 4). Torzní úhel si můžeme představit jako úhel, který svírají dvě roviny.

$$E_{torze} = \sum_{torze} \sum_n \frac{E_n}{2} [1 + \cos(n\phi - \phi_{n0})] \quad (4)$$

E_{torze} značí torzní příspěvek k potenciální energii, ϕ_{n0} je fázový posun v n-té periodě, ϕ je vazebná torze. E_n značí výšku potenciálové bariéry v n-té periodě, n je perioda jedné harmonické složky.

Elektrostatické interakce jsou důsledkem vzájemného působení parciálních nábojů. Elektrostatickou energii, která je dalším příspěvkem k potenciální energii, vyjadřujeme Coulombovým zákonem jako interakce dvou parciálních nábojů (rov. 5).

$$E_{Coulomb} = \sum_{i < j} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \quad (5)$$

Energie elektrostatických sil $E_{Coulomb}$ vykazuje v čitateli součin parciálních nábojů atomů $q_i q_j$ a ve jmenovateli pak permitivitu vakua ϵ_0 a vzdálenost atomů r_{ij} . Silová pole od Weinera a dalších [76-77] používají kvantově mechanické výpočty pro získání elektrostatického potenciálu (ESP). Tehdy se použil pro výpočet metoda HF s STO-3G bázovým setem, který vede k dipólovým momentům rovným nebo menším než dipólový moment v plynné fázi, ale podhodnocuje kvadrupólový moment. Toto silové pole není v kompatibilní s explicitním rozpouštědlem TIP3P[78] nebo TIP4P[78] vodou, jejichž dipólový moment je přibližně o 20% větší než v plynné fázi. Z důvodu těchto nedostatků byly s postupujícím časem a lepší výpočetní technikou použity pro výpočet parciálních nábojů metoda HF s výkonnějším bázovým setem jako 6-31G* nebo B3LYP/cc-pVTZ.

Další nevazebné příspěvky jsou van der Waalovy interakce, které jsou popsány Lennard-Jonesovým potenciálem (rov. 6) (Obrázek 6). Jde o jednoduchý matematický model, který aproximuje interakce mezi neutrálními atomy nebo molekulami.

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

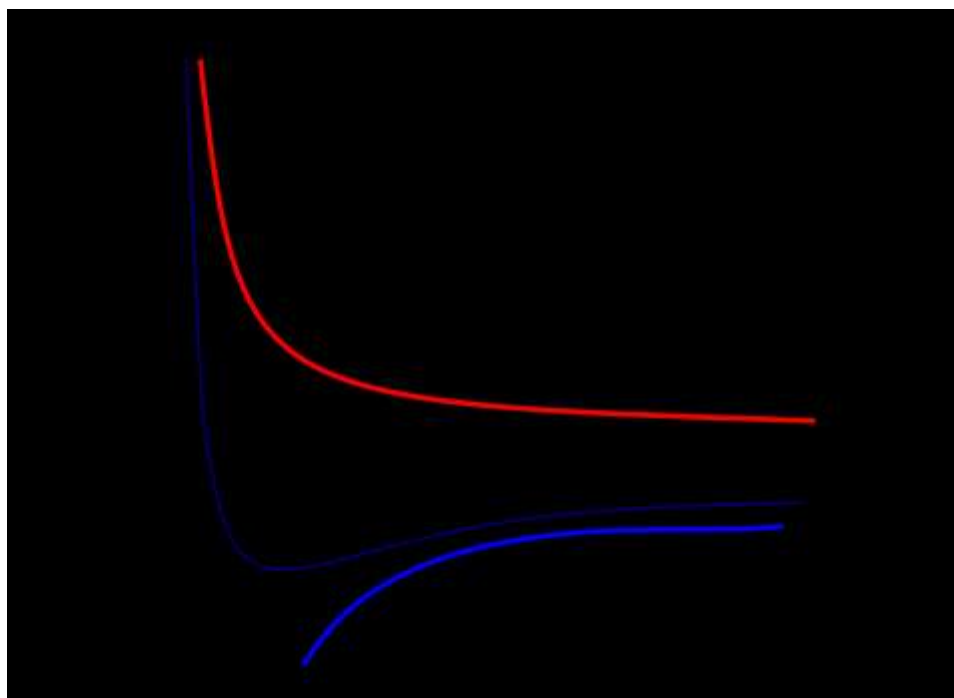
Energie van der Waalsových interakcí je vyjádřena hloubkou potenciálové jámy ε_{ij} , vzdálenosti dvou atomů r_{ij} a vzdálenosti dvou atomů, kdy je potenciální energie nulová σ_{ij} . Člen obsahující r_{ij}^{-6} značí disperzi, která vystihuje korelaci neuspořádaného pohybu elektronů kolem jádra, a r_{ij}^{-12} je člen pro repulzi, odpudivou sílu působící při přiblížení dvou atomů.

Elektrostatické a van der Waalsovy interakce jsou počítány pouze mezi atomy v různých molekulách nebo mezi atomy stejné molekuly odděleny nejméně třemi vazbami. Tyto ne vazebné interakce odděleny přesně o tři vazby („1-4 interakce“) jsou redukovány škálovým faktorem.

2.4.3. Silové pole („*force field*“)

Metody založené na empirickém silovém poli reprezentují hlavní nástroj teoretických aplikací pro zkoumání vztahu struktury a aktivity v biologických makromolekulách. S dnešní výpočetní technikou, použitím paralelního zapojení počítačů a lepšími silovými poli můžeme molekulární dynamikou pozorovat vývoj systému čítající více než 100 000 atomů v mikrosekundách. Úspěch těchto metod je dán jejich stále se zlepšující přesností reprodukovat experimentální podmínky a předpovídání vývoje na úrovni atomů. Je to hlavně zlepšování jednotlivých algoritmů, zohledňující hlavně ne vazebné interakce na delší vzdálenosti, zahrnující Ewaldovu metodu[79], a zlepšení integrátorů, ovlivňující simulaci termodynamického souboru, které tvoří hlavní důvody preciznosti a přesnosti metod molekulární dynamiky. Nicméně samotná kvalita silových polí kombinované s jejich správným používáním může být teprve považována za nejdůležitější prvek přesnosti empirických metod.

Obrázek 6 Schématický obrázek Lennard-Jonesova potenciálu pro dva atomy vodíku. Prostřední křivka znázorňuje průběh Lennard-Jonesova potenciálu, která je dána závislostí energie v atomových jednotkách na vzdálenosti atomů udané v Ångstemech. Červená křivka znázorňuje repulzi a tučně vyznačená modrá křivka značí disperzní složku. Energie v minimální hodnotě kolem -1.0 a.u. odpovídá hloubce potenciálové jámy ϵ_{ij} a místo, kde křivka protíná osu x a energie je tedy rovna nule, odpovídá hodnotě σ_{ij} .



Je zřejmé, že různé kovalentní vazby mají různou vazebnou vzdálenost a silovou konstantu, která vystihuje tuhost vazby. Nicméně podobné vazby se ve všech molekulách chovají stejně. Stejně parametry pro vazebnou vzdálenost a silové konstanty se tedy používají na podobné vazby. Tento fakt nám práci ulehčuje a zavádí se pojem atomové typy a vazebné typy (*Tabulka 3*)

Všechny parametry jako silová konstanta, rovnovážná vzdálenost, vazebný úhel a torzní úhly pro jednotlivé atomy a molekuly jsou pak shrnuty do jednoho silového pole. Silové pole je jakási simulace přírody. V dnešní době jsou dvě široce používané silové pole pro nukleové kyseliny, Cornell a další[80] a CHARMM27[81]. Silové pole

parm94-99 nebo parmbsc0 (Cornell a další) využívá programový balík AMBER a byly testovány na mnoha systémech obsahující RNA molekuly [82-84].

Tabulka 3 Schématická tabulka příkladů jednotlivých atomových typů pro uhlík a vazebných typů vazeb uhlíku.

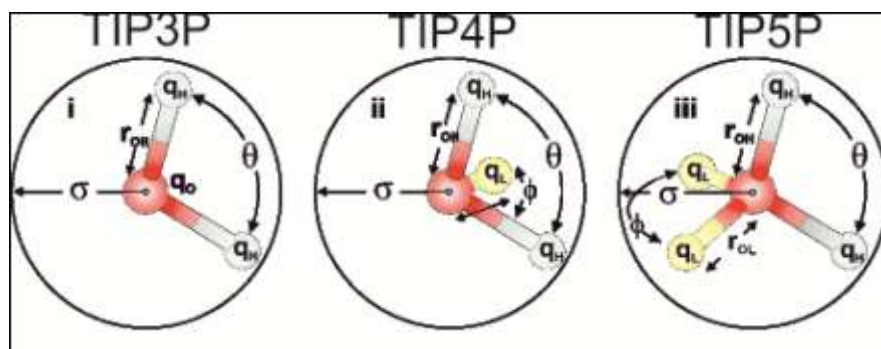
Atomovýtyp	Konformace	Popis
C	sp2	C karbonylovéskupiny
CA	sp2	C v benzenovémjádře
CK	sp2	C v purovémjádře
CT	sp2	alifatický C
Vazebnýtyp	silovákonstanta	vzdálenost
CT-CT	310.0	1.526
CT-HC	340.0	1.090
CT-N2	337.0	1.463
CB-CN	447.0	1.419

2.4.4. Explicitní modely vody

Správné ošetření silových polí pro vytvoření vodného prostředí je esenciální pro použití v simulacích biomakromolekul. Solvatace se v molekulární dynamice řeší dvěma hlavními způsoby a to přidáním explicitního nebo implicitního modelu vody. Explicitní modely představují řádné 3D modely molekul vody (*Obrázek 7*), zatímco implicitní model charakterizuje vodu pouze jako vzdálenostně závislá dielektrická konstanta. Je zřejmé, že explicitní solvent bude výpočetně náročnější.

Nejčastějšími explicitními modely u simulací biomakromolekul jsou TIP3P, TIP4P[78], SPC, SPC/E[85] a F3C[86]. Všechny tyto modely poskytují uspokojující výsledky pro vodu za pokojových teplot. TIP3P model vody patří mezi nejpoužívanější model a používám ho i ve své diplomové práci. Jeho omezení jsou hlavně podhodnocení druhého nebo-li tetrahedrálního píku radiální distribuční funkce a větší difúzní konstanta než vykazují experimenty[87]. Na druhou stranu interakce mezi biomakromolekulou a vodou zahrnují pouze první a druhou solvatační sféru, a tak chybějící dlouhé interakce nejsou většinou problémem. TIP3P je zkonstruován jako planární rigidní struktura s úhlem 104,52°.

Obrázek 7 3D zobrazení explicitních modelů vody. Parametry q_H , q_O a q_L značí parciální náboj na vodíku, kyslíku nebo volném elektronovém páru. r_{OH} a r_{OL} jsou vzdálenosti kyslík-vodík, kyslík-elektronový pár. Úhel θ je dán atomy vodík-kyslík-vodík a úhel ϕ se měří mezi volný elektronový pár-kyslík-volný elektronový pár. Parametr σ nám udává hodnotu van der Waalsova poloměru.



Model TIP4P, který zahrnuje další částici s negativním nábojem na ose úhlu H – O – H modelující dipól, překonává všechny omezení, které nastávaly u TIP3P modelu, ale má vyšší nároky na výpočet právě kvůli přidané částici. Vzdálenost částice od atomu kyslíku je 0,15Å. TIP5P model neobsahuje zápornou částici na ose úhlu, ale ve vzdálenosti 0,7Å od atomu kyslíku jsou umístěny dva záporné náboje modelující dva volné elektronové páry svírající úhel 109,47°. Ze zmíněných modelů je TIP5P model asi 2,5 krát náročnější na výpočet, nicméně patří k dnešním nejkvalitnějším modelům vůbec. Všechny TIP n P modely svírají úhel v molekule vody podle experimentálních dat 104,52° a vzdálenost OH je 0,9572Å. Ve finále pak záleží na správném výběru explicitního modelu vody pro studovaný systém a faktu, zda je daný model kompatibilní s námi používaným silovým polem. Mnoho silovým polí jsou vytvořeny pro specifický model vody. Široce rozšířené silové pole ff99, ff99SB nebo ff03 využívané programovým balíkem AMBER spolupracují s explicitními modely TIP n P a SPC/E [88].

3. PRAKTICKÁ ČÁST

3.1. CÍL PRÁCE

Ribozym hepatitidy D je malá samoštěpící RNA molekula, která napomáhá rozmnožování viru hepatitidy D. Velkou neznámou je pro vědce mechanismus štěpení ribozymu hepatitidy D. Byly navrženy dva mechanismy, kde se buď katalytický nukleotid C75 chová jako obecná báze a odebírá vodík skupině 2'-OH, nebo jako obecná kyselina a odevzdává proton kyslíku na 5' konci. První mechanismus je spíše ve shodě s krystalovými strukturami prekurzorů a energeticky byl podpořen i teoretickými molekulárně dynamickými a kvantově mechanickými výpočty. Nicméně i druhý mechanismus byl v poslední krystalografické studii prekurzorů podpořen a biochemické experimenty v monovalentní soli tuto možnou cestu katalýzy nevykloučily.

Metody založené na empirickém silovém poli se staly respektovaným vědním oborem a společně s experimenty poskytují významné výsledky ze struktur a dynamiky biomakromolekul. Napomohl tomu velký rozvoj výpočetní techniky. Molekulární dynamika je jedinou metodou, která poskytuje pohled na strukturu v atomárním rozlišení.

Diplomová práce je zaměřena na zkoumání hypotetického mechanismu obecné kyseliny v HDV ribozymu nástrojem teoretické chemie, molekulární dynamikou. Výzkum byl zaměřen na strukturní analýzu přírodního ribozymu hepatitidy D a jeho mutantů izostericky nahrazující „wobble“ pár na pozici 1/37, výskyt monovalentních Na⁺ a divalentních Mg²⁺ iontů a jejich kvantifikace v aktivním místě. Výpočty probíhaly na dvou krystalových strukturách prekurzorů, kdy jedna byla s C75 v pozici pro obecnou bázi a druhá s C75 v pozici pro obecnou kyselinu. Celkem proběhlo 11 simulací s celkovým časem 1100ns.

3.2. METODY

3.2.1. Příprava struktur

Inaktivovaná krystalová struktura C75U ribozymu hepatitidy D (např. 1vc0) a struktury s nízkým rozlišením C75 jsou v souladu s možností, že je C75 v pozici pro mechanismus obecné báze, ačkoli atom U75(N3) netvoří vodíkovou vazbu s vodíkem atomu U-1(O2') u inaktivovaných struktur a u starších struktur s C75 nebyl identifikován kyslík U-1(O2'). Jeden z posledních experimentů získat krystalovou strukturu bez mutace C75U navrhl model pro geometrii aktivního místa v mechanismu obecné kyseliny (3NKB) [8]. Tento model byl získán superpozicí štěpného místa z *hammerhead* ribozymu (2OEU) [89] s G1 z komplexu HDV-inhibitor. V této struktuře je Mg²⁺ ion v kontaktu s atomem U-1(O2') a C75(N3) s G1(O5').

Simulace prezentované v diplomové práci startovaly z krystalových struktur před rozštěpením cukr-fosfátové páteře, tedy z prekurzorů. Struktura *cis-acting* HDVr inaktivovaná mutací C75U (PDB ID 1vc0, rozlišení 2,5Å) [90] byla modifikována na katalyticky aktivní strukturu s C75. Na této struktuře byly pak provedeny mutace na pozici 1/37 a protonace nukleotidů C75 a C41. Struktura *trans-acting* inaktivována delecí kyslíku U-1(O2') s katalytickým C75 (PDB ID 3NKB, rozlišení 1,9Å)[8] byla upravena na klasickou strukturu přidáním kyslíku na nukleotid U-1, G1 a G2. Následně byla struktura protonována na nukleotidů C41 a C75. Použité struktury neobsahovaly plně rozlišený nukleotid U-1 na 5' konci, který je velmi flexibilní, a byl domodelován podle HHRz. V případě struktury 1vc0 byl U1A protein používán pro krystalizaci odstraněn.

3.2.2. Molekulární dynamika

Všechny molekulárně dynamické simulace byly počítány použitím programového balíku AMBER 10.0 [91] se silovým polem parm99 od Cornell a kol. [80, 92-93] a parmbsc0 [94], kde jsou ošetřeny α/γ přechody v nukleových kyselinách s reparametrizací pro χ torzi [95]. Molekula ribozymu hepatitidy D byla solvatována v kvádrovém boxu explicitních molekul vod TIP3P [78] rozšířený do vzdálenosti $\geq 10\text{\AA}$ od jakéhokoliv atomu. Nejbližší možná vzdálenost rozpouštědla od atomu RNA molekuly byla nastavena na hodnotu 0,7Å. Parametry pro protonizované stavy nukleotidu C75H⁺ a C41H⁺ byly do programu Leap dodatečně dodány [58]. Systém

byl neutralizován sodnými kationty Na^+ a v některých simulacích byly přidány maximálně čtyři hořečnaté kationty Mg^{2+} . Ionty byly umístěny nástrojem LeaP. Nástroj Sander programového balíku AMBER 10.0 byl použit pro ekvilibraci a výpočet simulací použitím standardního protokolu. Jednotlivé trajektorie byly spuštěny při teplotě 300K s konstantním tlakem, okrajovými podmínkami a časovým integračním krokem 2ps.

3.2.3. Analýza MD trajektorií

Trajektorie byly analyzovány nástrojem Ptraj programového balíku AMBER 10.0 a skriptem pro analýzu vodíkových vazeb. Statické struktury byly zobrazovány programem PyMOL [96], dynamické struktury a hustotní mapy pak programem VMD [97]. Hodnoty RMSD byly získány použitím nástroje Ptraj a počítány přes všechny atomy fosforu páteře molekuly RNA. Pseudorotace cukru nukleotidu U-1 byl počítán nástrojem Ptraj. Radiální distribuční funkce (RDF) byla kalkulována do vzdálenosti 10Å od atomu modulem Ptraj. Grafický náhled na výskyt kationtů Na^+ v aktivním místě (hustotní mapy) byl získán opět modulem Ptraj a do publikační podoby převedeny programem Corel Draw X4. Grafy byly vytvořeny programem Grace. Jako formát grafů byl použit PNG s rozlišením 1280x1024.

3.2.4. Měřené hodnoty

Střední kvadratická odchylka (RMSD = Root mean square deviation)

Střední kvadratická odchylka je definovaná jako hodnota průměrné vzdálenosti mezi atomy dvou molekul nebo intramolekulární průměrná vzdálenost atomů v molekule. V nukleových kyselinách se často jedná o vzdálenosti fosforů nukleotidů a pozorují se tak změny ve struktuře páteře. Matematicky se jedná o druhou odmocninu součtu čtverců rozdílů souřadnic dělena počtem jedinců, v chemii často atomů

$$RMSD = \left(\frac{\sum_{i=1}^N w_i \cdot d(x_i, y_i)^2}{N \sum_{i=1}^N w_i} \right)^{1/2}, \quad (11)$$

kde $d(x_i, y_i)$ vyjadřuje vzdálenost odpovídající atomům x_i a y_i , N je počet atomů a w_i je hodnocení jednotlivých atomů., kdy tento parametr je nejčastěji roven jedné nebo relativní

atomové hmotnosti. RMSD je často spojována s měřením strukturní podobnosti biomakromolekul.

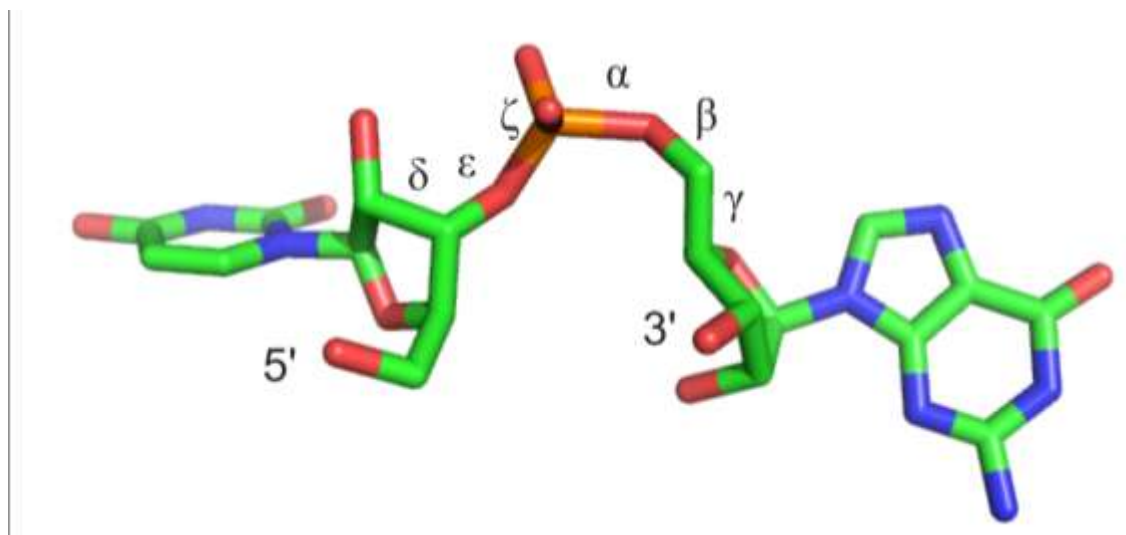
Radiální distribuční funkce (RDF)

Radiální distribuční funkce popisuje, jak se mění hustota atomů se zvyšující se vzdáleností od určitého atomu. Matematicky řečeno, pokud je atom v počátku O a jestliže $n=N/V$ je průměrná hodnota hustoty, pak lokální hustota ve vzdálenosti r od O je vyjádřena funkcí $ng(r)$. Hodnota $g(r)$ má fundamentální význam v termodynamice, protože makroskopické termodynamické veličiny jako energie nebo tlak mohou být vypočítány použitím právě funkce $g(r)$.

Dihedrální úhel páteře nukleových kyselin

Torzní úhel je dán úhlem mezi dvěma rovinami. Pro charakterizaci dihedrálního úhlu potřebujeme čtyři body, kdy body 1-3 udávají první rovinu a body 2-4 druhou rovinu. V nukleových kyselinách rozdělujeme několik dihedrálních úhlů: alfa (α), beta (β), gama (γ), delta (δ), epsilon (ϵ), zeta (ζ) (*Obrázek 8*). Torzní úhel alfa je dán atomy $O3' - P - O5' - C5'$, beta atomy $P - O5' - C5' - C4'$, gama atomy $O5' - C5' - C4' - C3'$, delta atomy $C5' - C4' - C3' - O3'$, epsilon atomy $C4' - C3' - O3' - P$ a torzní úhel zeta atomy $C3' - O3' - P - O5'$.

Obrázek 8 Dihedrální úhly mezi dvěma nukleotidy nukleových kyselin.



Pseudorotační úhel cukru („Sugar pucker“)

Ribóza, cukr obsahující v kruhu pět atomů, se nachází v nukleových kyselinách. Bylo zjištěno, že tento cukr není z prostorových důvodů rovinný útvar. Jeden nebo dva atomy jsou vytočeny z roviny. V ribofuranóze je fixovaná rovina $C1'-O4'-C4'$. Zda je cukr v konformaci *endo* či *exo*

rozhodují tedy pouze atomy C2' či C3'. *Endo-pucker* znamená, že C2' nebo C3' jsou vytočeny ve směru atomu O5'. *Exo-pucker* popisuje posun v opačném směru. V molekule RNA najdeme ve většině případů C3'-*endo* uspořádání. Za pokojové teploty jsou obě uspořádání v rovnováze. Struktura cukru se významně podílí na tvorbě sekundárních struktur v nukleových kyselinách.

Vodíková vazba

Vodíková vazba je určitě jedna z nejdůležitějších nekovalentních interakcí, která určuje strukturu a funkci biomakromolekul. Vodíková vazba vzniká, když atom vodíku kovalentně vázán na protonový donor A-H interaguje s volným elektronovým párem atomu X, který se chová jako vodíkový akceptor. Nepříliš velká síla vazby A-H způsobuje prodloužení této vazby a v souvislosti s tím snížení (červený posun) frekvence vazby A-H. V některých systémech může být situace odlišná a naopak dochází k tzv. modrému posunu v IR spektru [98].

Hustotní mapa

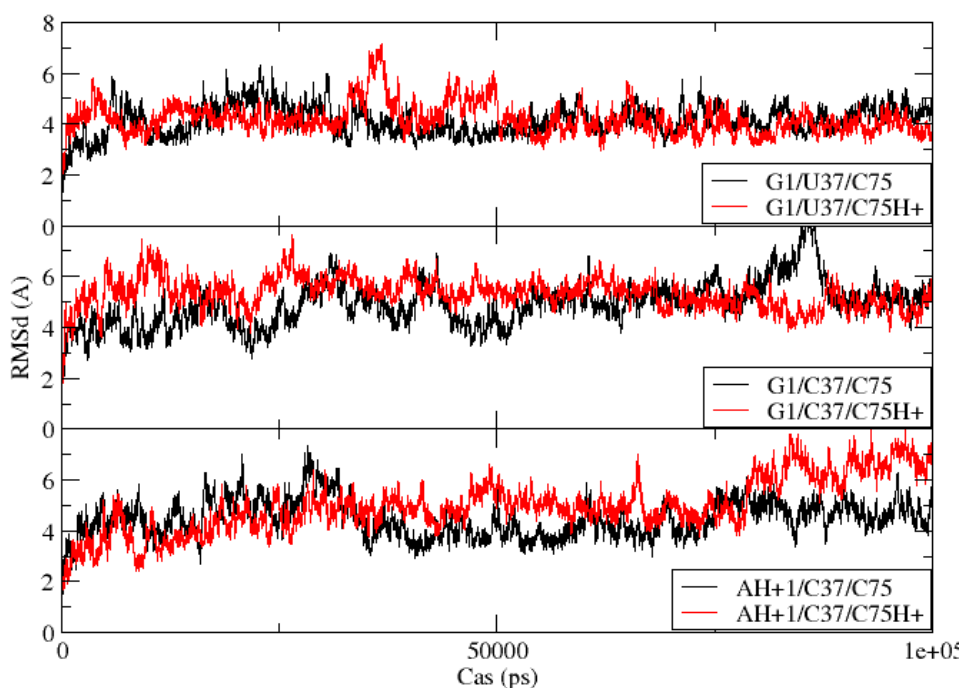
Hustotní mapa iontů v molekule RNA nám poskytuje informaci o rozložení jednotlivých atomů, molekul či iontů (v diplomové práci kationty Na⁺). Modul Ptraj v programovém balíku AMBER 10.0 nabízí možnost sestavení 3D mapy s největším výskytem atomu, molekuly či iontu ve studované molekule. Tento formát následně můžeme jednoduše zobrazit v programu VMD [97].

4. VÝSLEDKY

4.2. Strukturální dynamika aktivního místa HDV ribozymu v geometrii vhodné pro mechanismus obecné báze (1vc0)

Závislost dynamického chování HDV ribozymu na protonovaném či neprotonovaném stavu nukleotidu C75 byla zkoumána na šesti simulacích struktur před rozštěpením cukr-fosfátové páteře (1vc0) (Tabulka 4), kde nukleotid C75 je v pozici pro obecnou bázi. Simulace byly neutralizované monovalentním iontem Na⁺ a délka jednotlivých simulací dosáhla 100ns. Všechny simulace vykazují stabilní časové trajektorie, ve kterých pět šroubovicových regionů P1, P1.1, P2, P3 a P4 zůstávají blízko jejich krystalové struktury, což ukazují hodnoty RMSD (Graf 3). Tato celková stabilita molekuly je dána kompaktním složením struktury, sítí vodíkových vazeb a patrových interakcí (stacků).

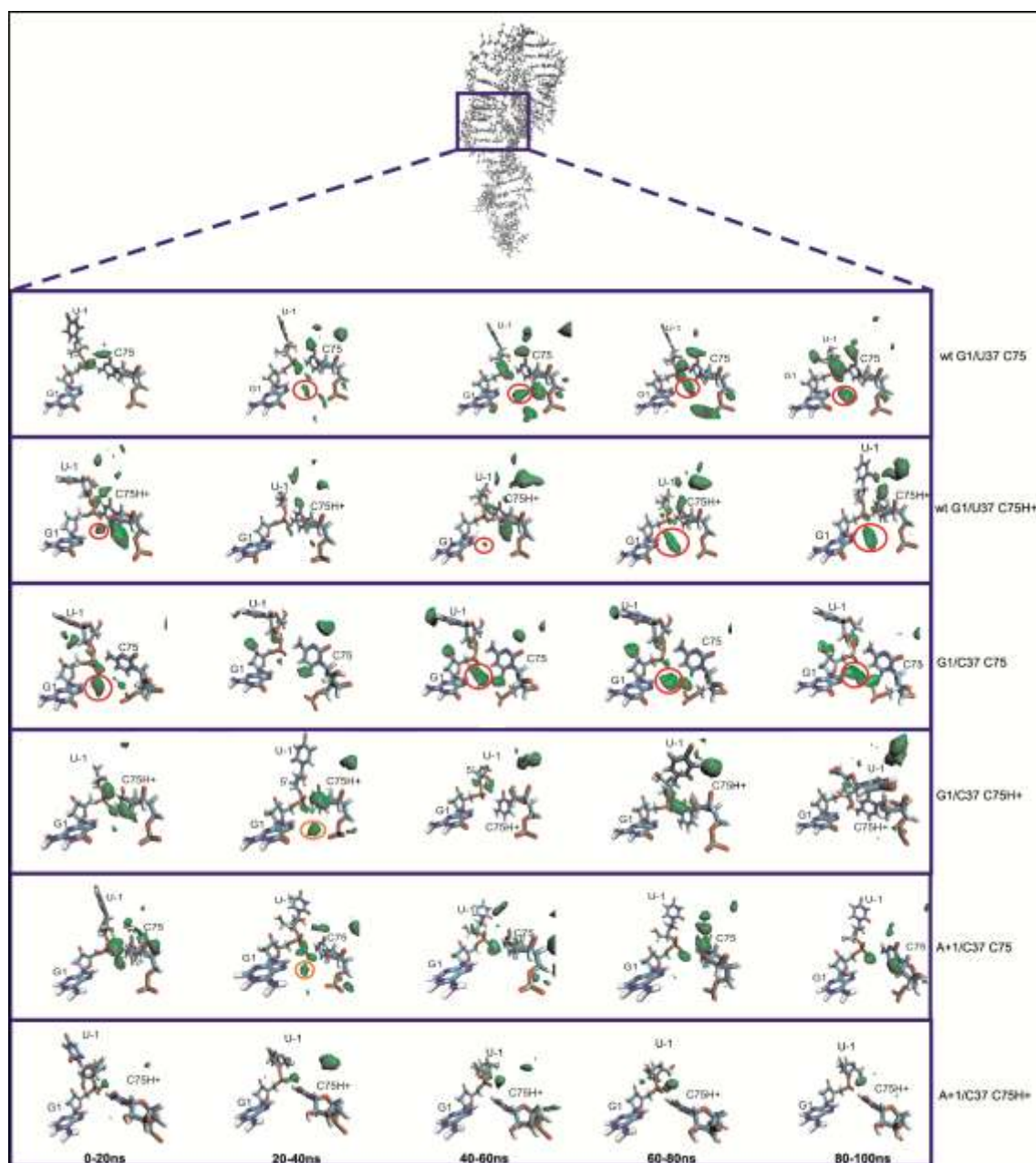
Graf 3 Střední kvadratická odchylka struktur pocházející z krystalové struktury 1vc0. RMSd byla počítána přes všechny atomy fosforu.



Vycházeli jsme z předpokladu, že mechanismus obecné báze je energeticky i strukturálně schůdný [58], nicméně nezavrhovali jsme myšlenku mechanismu obecné kyseliny, kterou potvrzovaly některé biochemické experimenty [53]. Protonací atomu C75(N3) a puštěním molekulárně dynamických simulací na delší časové škály jsme chtěli docílit reorganizace aktivního místa. V simulacích po přidání vodíku na atom

C75(N3) v *cis-acting* struktuře prekursoru vidíme stabilní vazby C75H⁺(N3) s atomy C75(O1P)/(O2P). Ve všech simulacích zůstalo aktivní místo v geometrii blízké krystalové struktuře a nedocházelo ani po 100ns ke změně geometrie na takovou, která by byla kompatibilní s mechanismem obecné kyseliny (Obrázek 9). Systém se tedy nacházel ve svém lokálním nebo globálním minimu.

Obrázek 9 Hustotní mapa sodíkových kationtů a geometrie aktivního místa struktury *Ivc0*. Zeleně jsou vyznačeny jednotlivé okupance iontů. Červeným kroužkem jsou vyznačeny hustotní mapy kationtů v blízkosti atomu G1(N7).



Tabulka 4 Seznam všech molekulárně dynamických simulací pocházející z krystalové struktury 1vc0. Proton či neproton vyjadřují výskyt vodíku na atomu C75(N3).

Simulace	Počáteční struktura	Počet nukleotidů	Protonační stavy	Pár 1/37	Délka simulace (ns)	Počet iontů
G1/U37 proton	1vc0	73	C41H ⁺ /C75H ⁺	G/U	100	69 Na ⁺
G1/U37 neproton	1vc0	73	C41H ⁺ /C75	G/U	100	70 Na ⁺
G1/C37 proton	1vc0	73	C41H ⁺ /C75H ⁺	G/C	100	69 Na ⁺
G1/C37 neproton	1vc0	73	C41H ⁺ /C75	G/C	100	70 Na ⁺
A+1/C37 neproton	1vc0	73	C41H ⁺ /C75H ⁺	A+/C	100	69 Na ⁺
A+1/C37 proton	1vc0	73	C41H ⁺ /C75	A+/C	100	70 Na ⁺

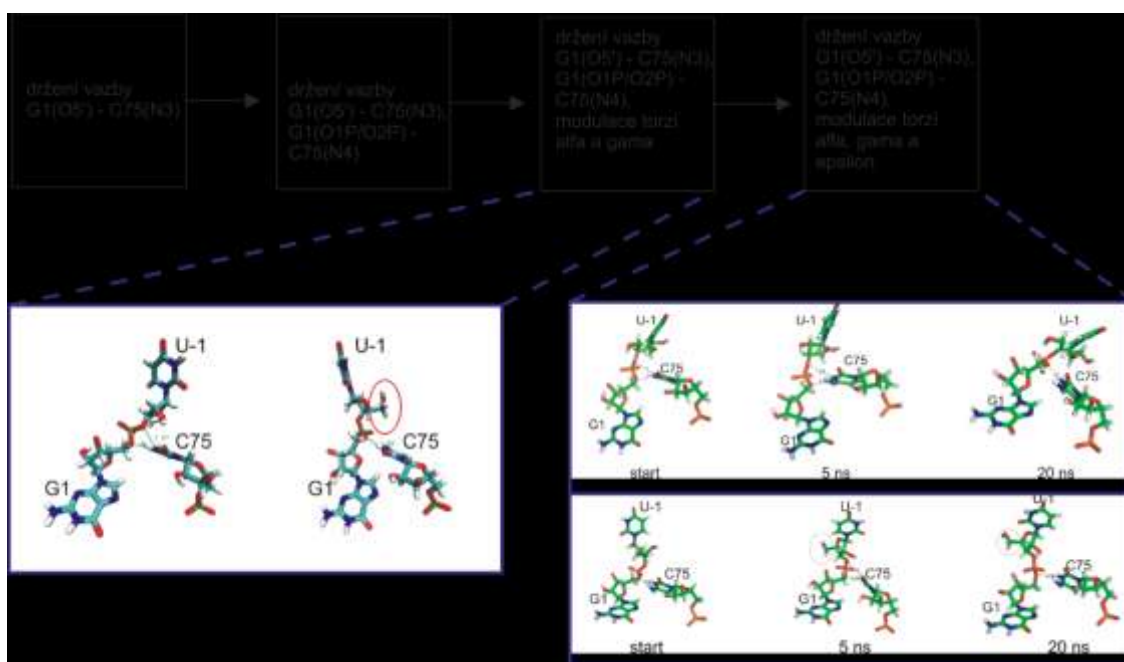
4.3. Mechanické modelování aktivního místa

Ve struktuře, která se nacházela v geometrii vhodné pro mechanismus obecné báze, nedocházelo ani po protonaci C75 k samovolné změně geometrie na uspořádání vhodné pro mechanismus obecné kyseliny. V krátkých simulacích jsme malými umělými silami působili na namodelovanou *trans-acting* strukturu ribozymu (struktura 1sj3 s deletovaným J1/2 segmentem) postupně na vazby mezi atomy C75(N3) – G1(O5'), C75(N4) – G1(O1P)/(O2P) a na torze α , γ , ε (Obrázek 10) tak, abychom dostali stabilní strukturu vhodnou pro mechanismus obecné kyseliny.

První simulace byla orientována pouze na vazbu G1(O5') – C75(N3), kde jsme použili restrain o velikosti 50kcal/mol po dobu 10ns. Tato vazba se ale po uvolnění restrainu udržující kontakt rozpadla ve volné dynamice po 10ns. Následně jsme se pokusili udržet vazbu G1(O5') – C75(N3) a G1(O1P) – C75(N4) nebo G1(O2P) – C75(N4). Drželi jsme tyto vodíkové vazby silou 50kcal/mol po dobu 10ns. Nicméně i tyto vazby se po uvolnění sil rozpadly a simulace neposkytla stabilní geometrii vhodnou pro mechanismus obecné kyseliny. Abychom docílili geometrie obecné kyseliny, museli jsme správně natočit torzní úhel G1(α) společně s G1(γ) a podržet je v dané geometrii ($\alpha = -90^\circ$ a $\gamma = -160^\circ$) po určitou dobu. Po otočení torzí alfa a gama došlo k dosažení geometrie vhodné pro mechanismus obecné kyseliny a dokonce tato struktura byla po dobu 2ns stabilní s úhlem mezi atomy U-1(O2'), G1(P) a G1(O5') kolem 160° , což je nejbližší „in line“ kontaktu důležitého pro geometrii vhodnou pro mechanismus obecné kyseliny (Obrázek 10, Graf 4). Jediná

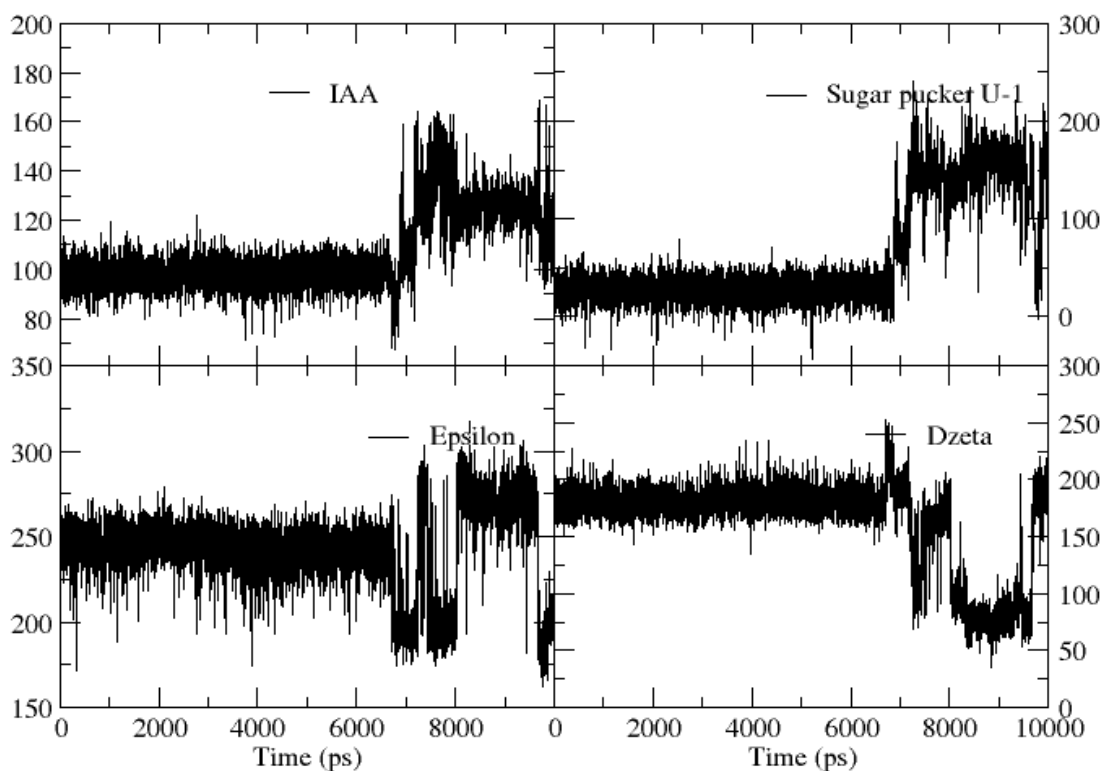
věc, která nevyhovovala mechanismu, byla orientace 5'-konce. Ten vyčníval dovnitř struktury.

Obrázek 10 Schéma MD simulací. Vypsány jsou vždy údaje, které vazby a torzní úhly byly modulovány použitím restrainů. Obrázky znázorňují volný průběh molekulárních dynamik, jak se struktury chovaly po uvolnění restrainů.



Logickým krokem tedy byl restrain torzního úhlu epsilon, za účelem otočení 5' konce nukleotidu U-1. Otáčeli jsme epsilon torzi ve dvou směrech (z hodnoty -110° do hodnoty -270° nebo z -110° do 100°) současně s držením vazeb G1(O5') – C75(N3) a G1(O1P) – C75(N4) nebo G1(O2P) – C75(N4). Po uvolnění struktur jsme dostaly uspokojivé výsledky ohledně vazby G1(O5') – C75(N3) a vysunutí 5'-konce ze struktury ven. Nicméně nepozorovali jsme „in line“ konformaci.

Graf 4 Hodnoty úhlu pro „in line attack“ mezi atomy U-1(O2'), G1(P) a G1(O5'), vývoj torzního úhlu cukru na nukleotidu U-1 a torzí epsilon a zeta nukleotidu U-1 ve volné dynamice při držení vazeb G1(O5') - C75(N3), G1(O1P) - C75(N4) a torzních úhlů alfa a gama.

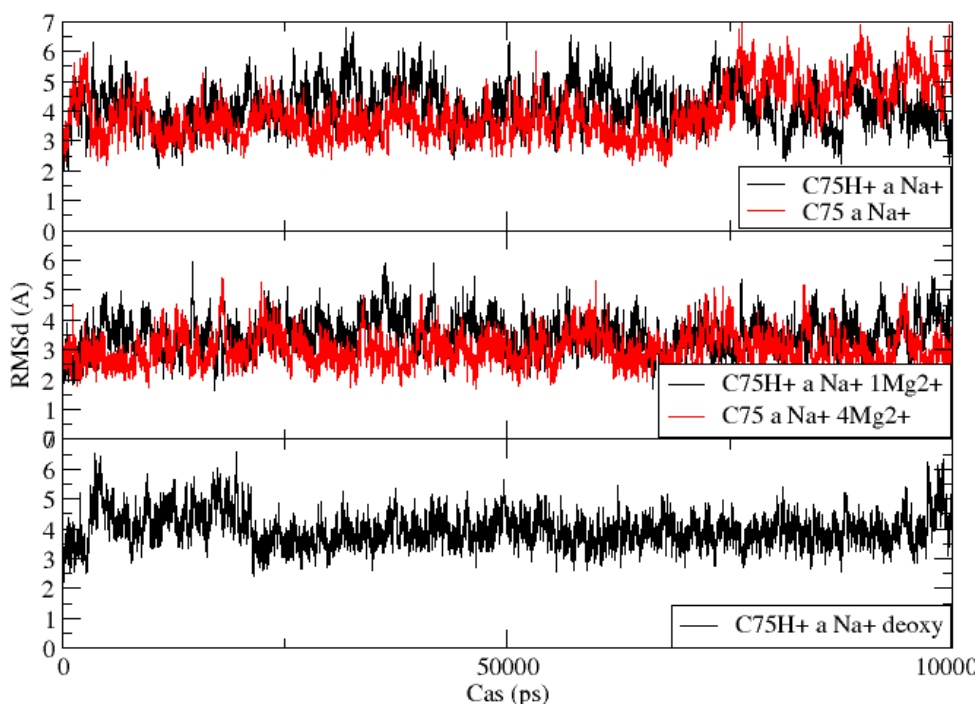


4.4. Strukturální dynamika aktivního místa HDV ribozymu v geometrii vhodné pro mechanismus obecné kyseliny (3nkb)

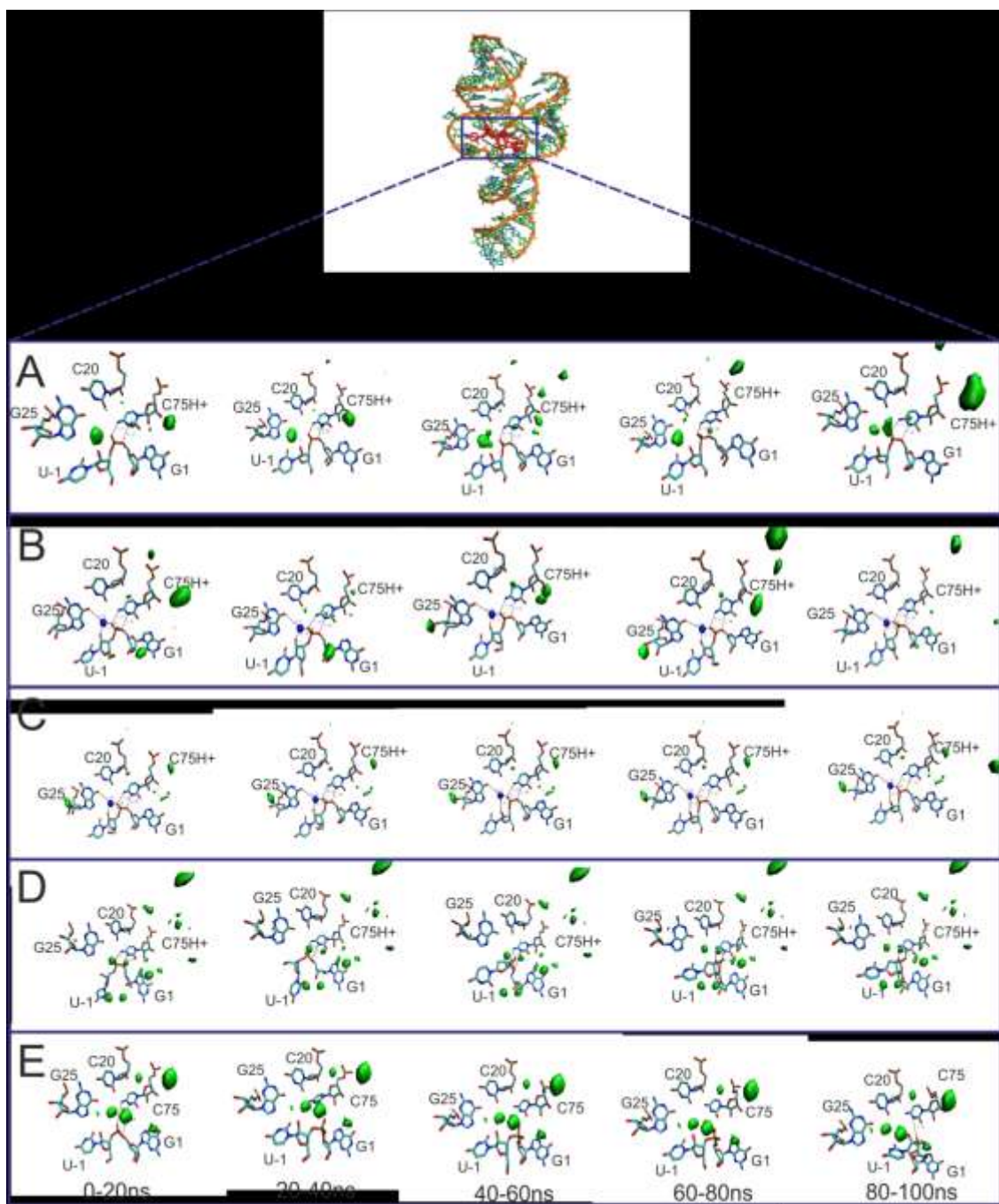
V průběhu této práce byla objevena struktura *trans-acting* ribozymu, v níž byla domodelována geometrie U-1 a G1 nukleotidu, která byla vhodná pro mechanismus obecné kyseliny. Pro zjištění stability geometrie vhodné pro mechanismus obecné kyseliny byly spuštěny simulace založené na struktuře od Barbary Golden (3nkb) [8] (Tabulka 5) (viz kapitola 3.2.1). Všechny simulace vykazují stabilní časové trajektorie, což bylo potvrzeno grafy RMSd (Graf 5). Z krystalografických dat vyplývá, že aktivní místo má uspořádání, v němž nukleotid C75 je s největší pravděpodobností protonovaný a katalytický kovový kation je ve vazební blízkosti u aktivního místa (viz kapitola 4.5). Atom C75(N3) je v této struktuře ve vazební vzdálenosti k atomu G1(O5') a to ve vzdálenosti 3,7Å a to, že by se atom C75(N3) mohl nacházet

v protonovaném stavu, podporují výsledky Ramanové spektroskopii ribozymu [99]. Vzdálenost hořečnatého kationtu od atomu C75(N3) byla vypočtena na 5,5Å. Mezi těmito dvěma kladně nabitými atomy se nachází záporný fosfát. Přesnou konformaci nukleotidu U-1 bylo velmi složité experimentálně získat, neboť kvůli malé elektronové hustotě je nukleotid velmi špatně rozlišitelný. Jedna z mála vazeb na nukleotidu U-1, který byl domodelovaný ze struktury HHRz, je patrná na atomu O2', který je v kontaktu s kovovým kationtem. Domodelovaná báze U-1 ve struktuře 3nkb je stabilizovaná patrovou interakcí s nukleotidem U23, která ve struktuře 1vc0 také nebyla pozorována. Elektronová hustota pro geometrii patrové interakce báze U-1 s nukleotidem U23 byla získána také pro strukturu produktu 1CX0. V dřívějších strukturách kromě struktur produktů bylo postavení nukleotidů U20/G25 v orientaci *cis*. Nicméně ve struktuře 3nkb je geometrie nukleotidů v poloze *trans*.

Graf 5 Střední kvadratická odchylka (RMSd) struktur pocházející z krystalové struktury 3nkb. RMSd byla počítána přes všechny atomy fosforu.



Obrázek 11 Hustotní mapy a strukturní změny v aktivním místě ribozymu hepatitidy D. Zeleně jsou vyznačeny okupance sodíkovými ionty a modrou kuličkou je vyznačen hořečnatý kation. (A) Struktura obsahující pouze Na^+ kationty a protonovaný nukleotid C75. (B) MD simulace struktury s jedním Mg^{2+} kationtem a protonovaným cytosinem C75. Mg^{2+} ion se nacházel v aktivním místě a tvořil přímou vazbu s nukleotidem U-1 a G1 (C) Struktura se čtyřmi kationty Mg^{2+} a protonovaným C75H⁺. Hořečnatý kation opět nahradil sodíky v aktivním místě a tvořil přímou vazbu s nukleotidem U-1 a G1. (D) Struktura neobsahující atom U-1(O2'), G1(O2') a G2(O2') se sodíkovými kationty. Kationty nemohou tvořit vazbu s atomem U-1(O2') a struktura aktivního místa se rozpadá. (E) Struktura s deprotonovaným C75 v sodíkových kationtech. Deprotonací vymizí vazba s G1(O5') a dojde k rozpadu struktury.



Důležité kontakty na udržení geometrie pro mechanismus obecné kyseliny jsou vodíková vazba mezi C75(N3) s G1(O5') a přímá vazba mezi kationtem a atomem U-1(O2'). Pokud byl cytosin C75 v simulaci protonován na atomu C75(N3) a přítomen 2'-hydroxyl na bázi U-1, tak bylo uspořádání stabilní po celou dobu simulace (Obrázek 11A,B,C). V simulacích, kde chyběl atom U-1(O2'), se stal nukleotid U-1 flexibilnějším a dochází ke změnám torzních úhlů (Graf 7) a vazeb mezi C75 a G1 (Tabulka 5). Velmi důležitým faktorem ovlivňující stabilitu aktivního místa je protonace atomu C75(N3). V simulaci, kde byl tento atom deprotonován, dochází již po 20ns k ztrátě vazby C75(N3) s G1(O5') (Tabulka 5, Obrázek 11E). Na udržení iontů v aktivním místě má výrazný vliv *trans* konformace „wobble“ páru U20/G25. Pár svými kyslíky U20(O2) a G25(O6) byl v kontaktu s první solvatační sférou kovových kationtů (Obrázek 11).

Tabulka 5 Seznam všech molekulárně dynamických simulací pocházející z krystalové struktury 3nkb.

Simulace	Počáteční struktura	Počet nukleotidů	Protonované stavy	Pár 1/37	Délka simulace (ns)	Počet iontů
trans C75H ⁺	3nkb	73	C41H ⁺ /C75H ⁺	G/U	100	68 Na ⁺
trans C75H ⁺ s 1Mg ²⁺	3nkb	73	C41H ⁺ /C75H ⁺	G/U	100	66 Na ⁺ a 1Mg ²⁺
trans C75H ⁺ s 4Mg ²⁺	3nkb	73	C41H ⁺ /C75H ⁺	G/U	100	60 Na ⁺ a 4Mg ²⁺
trans C75H ⁺ deoxy	3nkb	73	C41H ⁺ /C75H ⁺	G/U	100	68 Na ⁺
trans C75	3nkb	73	C41H ⁺	G/U	100	69 Na ⁺

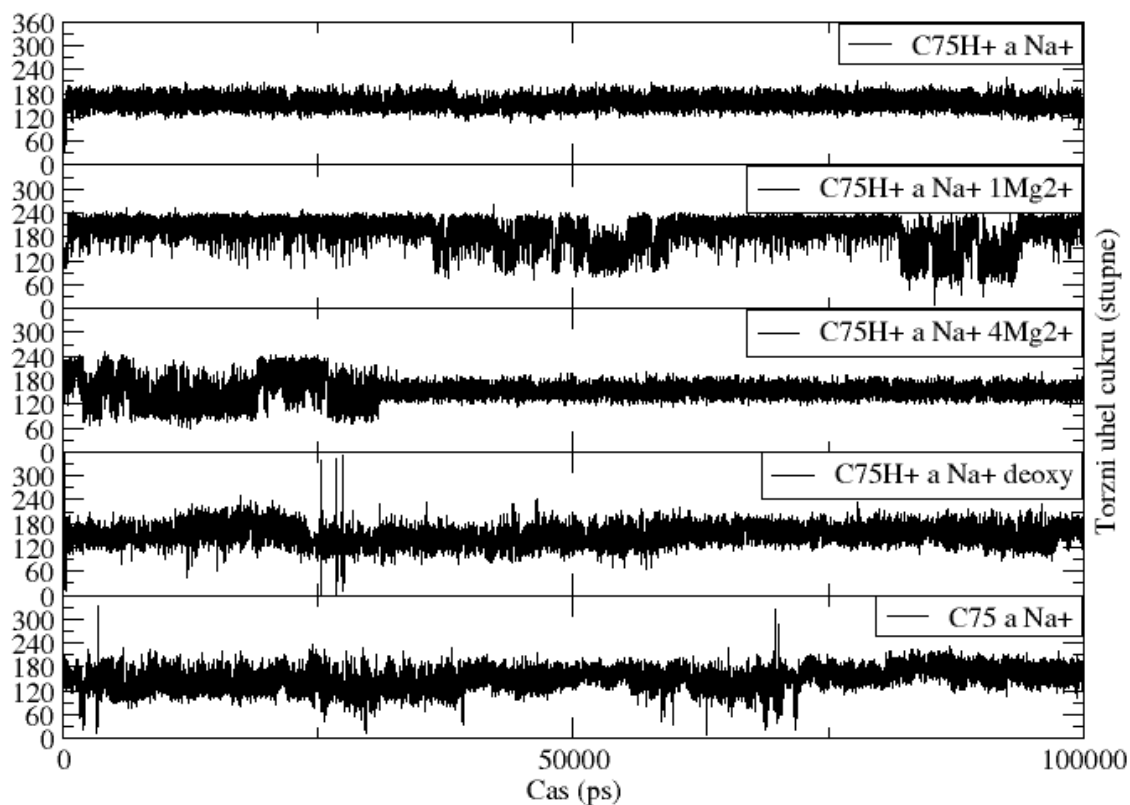
4.4.1. Pseudotorzní úhel cukru nukleotidu U-1 („sugar pucker“)

Na uspořádání nukleotidu U-1 má určitý vliv i hodnota pseudotorzního úhlu cukerné jednotky nukleotidu. Krystalová struktura 3nkb vykazuje hodnotu pseudotorzního úhlu ribózy 165°. Tato hodnota odpovídá uspořádání C2'-endo, která je pro molekuly RNA velmi častá. Pro vývoj torzního úhlu cukru v čase a jeho vliv na strukturu je molekulární dynamika výborným nástrojem, neboť změny pozorujeme na atomární úrovni (Graf 6).

V simulaci s protonovaným C75 neutralizované pouze ionty Na⁺ nedochází ke změně konformace cukru a pucker zůstává na hodnotě mezi 144-180°, což odpovídá uspořádání C2'-endo (Tabulka 5). U struktury, kde jsme ponechali deoxy ribózu na nukleotidech U-1, G1 a G2 (Tabulka 5), se hodnota úhlu ribózy na nukleotidu U-1

pohybovala taktéž v konformaci pro C2'-endo, ale v krátkých časových úsecích pozorujeme hodnoty lehce nad 180°. To odpovídá hodnotě pro C3'-exo. U simulací, kde jsme přidali hořečnaté kationty je situace trochu odlišná a kovový kation má na hodnotu puckeru U-1 ribózy určitý vliv. Ve struktuře s jedním Mg²⁺ iontem je velikost torzního úhlu cukru v rozmezí mezi 180° až 240°. Tyto hodnoty odpovídají geometrii pro C3'-exo a C4'-endo. V krátkých časových úsecích přechází cukr do hodnot pro C2'-endo geometrii (Tabulka 5). Systém obsahující čtyři hořečnaté kationty na začátku simulace vykazuje široké rozmezí hodnot pro torzní úhel mezi 90° až 240°. Po 3ns dochází ke stabilizaci úhlu na hodnotách 140-180°, což odpovídá opět geometrii C2'-endo. U simulací s neprotonovaným C75 pozorujeme větší flexibilitu změny geometrií (Tabulka 5). Systém obsahující Na⁺ kationty se převážně nachází v hodnotách kolem 150° v geometrii C2'-endo (Tabulka 5). Nejčastější geometrií v ribóze nukleotidu U-1 je C2'-endo, která je podle experimentů nejčastější konformací v ribonukleových kyselinách.

Graf 6 Průběh pseudotorzních úhlů cukru („sugar pucker“) jednotlivých simulací ve stupních.

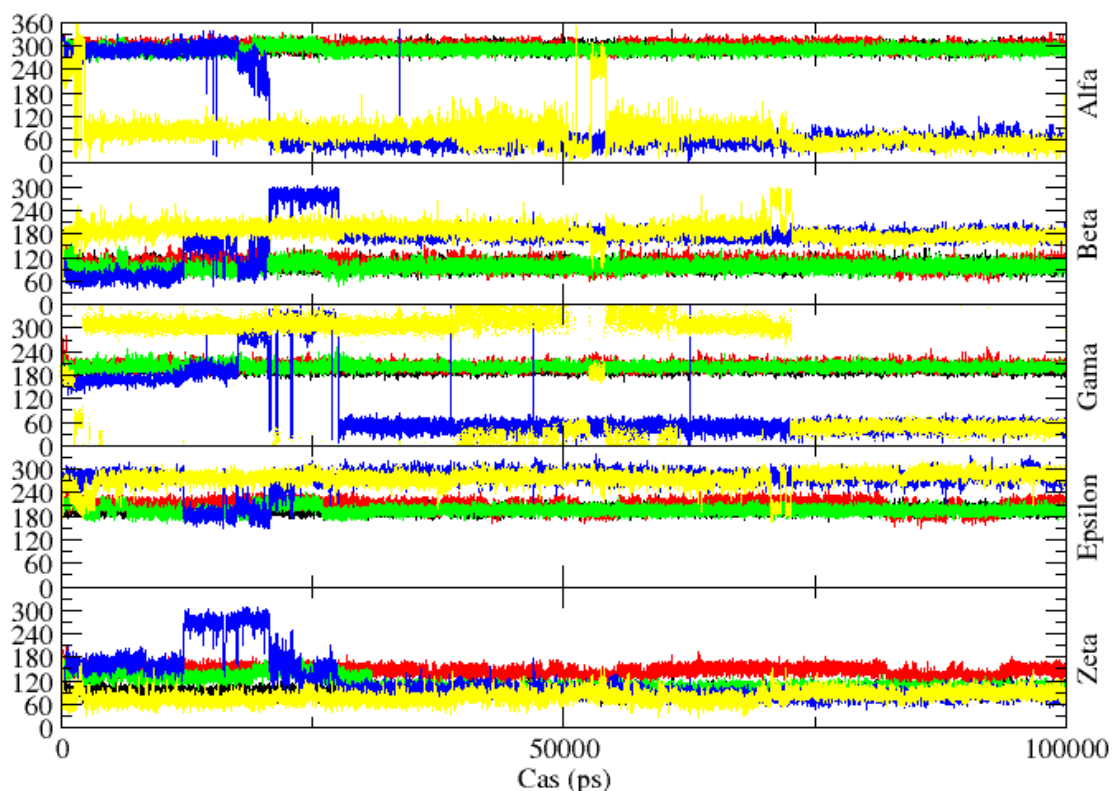


4.4.2. Torzní úhel páteře mezi U-1 a G1

Strukturální chování nukleotidů U-1 a G1, mezi kterými dochází ke štěpení cukr-fosfátové páteře, jde velmi dobře popsat pomocí dihedrálních úhlů páteře (*Graf 7*). Definice jednotlivých torzních úhlů je vyobrazena na *Obrázek 8*. Hodnoty jednotlivých úhlů v krystalové struktuře 3nkb s domodelovanými nukleotidy U-1 a G1 z HHRz jsou: alfa $261,65^\circ$, beta $113,34^\circ$, gama $242,37^\circ$, epsilon $208,24^\circ$ a zeta $135,71^\circ$. Z těchto hodnot pak startovaly všechny simulace a vývoj torzí v čase je znázorněn v *Graf 7*.

Hodnota torzního úhlu alfa se u simulace s protonovaným $C75H^+$ obsahující pouze Na^+ kationty, Na^+ kationty a $1Mg^{2+}$ nebo $4Mg^{2+}$ neměnila a zůstávala na průměrné hodnotě 290° , což odpovídá hodnotě označované jako *gauche (-)*. Úhel alfa se u dalších dvou simulací (*trans C75H⁺ deoxy*, *trans C75*) odchýlil k nižším hodnotám (*Tabulka 5*). Systém s $C75H^+$ deoxy přejde z hodnot kolem 290° po 2ns na průměrnou hodnotu 60° *gauche (+)*. Stejný přechod pozorujeme u systému s neprotonovaným nukleotidem C75, kde dojde k přechodu po 0,5ns.

Graf 7 Průběh torzních úhlů alfa, beta a gama nukleotidu G1, epsilon a zeta nukleotidu U-1 v simulacích *trans C75H⁺* (černá), *trans C75H⁺ s 1Mg²⁺* (červená), *trans C75H⁺ s 4Mg²⁺* (zelená), *trans C75H⁺ deoxy* (modrá) a *trans C75* (žlutá).



Beta torze je podobně jako u torze alfa v prvních třech simulacích C75H⁺ s Na⁺, Na⁺ a jedním popřípadě čtyřmi kationty Mg²⁺ nemění po celou dobu dynamiky. Průměrná hodnota je 98°. Průběh beta torze u simulace s trans C75H⁺ deoxy je odlišný (*Tabulka 5*). Z počáteční průměrné hodnoty 97° se změní torzní úhel na průměrnou hodnotu 277°, ve které vydrží přibližně 1ns. Poté se ustálí úhel na průměrných 176°. V simulaci ribozymu hepatitidy D trans C75 došlo ihned po startu k přeskoku beta torze na průměrnou hodnotu 177°, kde se udržela až do konce simulace (*Tabulka 5*).

Gama torze se opět neměnila u simulací s protonovaným nukleotidem C75H⁺ neutralizované Na⁺, jedním nebo dvěma ionty Mg²⁺ a průměrná hodnota po celou dobu trajektorie byla 202° (*Tabulka 5*). Simulace trans C75H⁺ deoxy měla počáteční hodnotu kolem 189°. Po 2ns došlo k přeskoku na průměrnou hodnotu 300°. V této poloze vydržela cca 2ns a pak přešla na průměrných 49°, kde se nacházela až do konce simulace. Systém trans C75 se z počáteční průměrné hodnoty 180° přesune na hodnotu kolem 300°. Poslední 2,5ns se ustálí na velikosti úhlu kolem 50° (*Tabulka 5*).

Simulace s ribozymem v protonovaném stavu C75H⁺ neutralizovaném ionty Na⁺, jedním Mg²⁺ a čtyřmi Mg²⁺ měla velmi stálou hodnotu torze epsilon o průměrné hodnotě 200° (*Tabulka 5*). Zbývající dvě simulace (trans C75H⁺ deoxy a trans C75 (*Tabulka 5*)) měnily své průměrné hodnoty po celou dobu trajektorie z 200° na 280° a zpět.

Hodnoty dihedrálního úhlu zeta se příliš neměnily u žádné ze simulací a průměrná velikost úhlu byla kolem 90°. Zeta se ale překvapivě lišila u simulace s jedním atomem Mg²⁺, kde hodnota zeta byla větší a pohybovala se kolem 145° po celou dobu simulace (*Tabulka 5*).

4.5. Analýza iontů

Z dřívějších experimentálních studií pro monovalentní ionty Tl⁺ v inaktivní struktuře s mutací C75U a pomocí Ramanovy spektroskopie byla potvrzena přítomnost kationtu v blízkosti atomu G1(N7) [62, 100]. Ve čtyřech simulacích, jejichž startovní struktura vycházela ze struktur 1vc0 jsme mutovali báze na pozici 1/37, kde jsme nahradili „GU wobble“ pár kanonickým párem G1/C37 a izosterickým AH+1/C37 párem. Pomocí těchto nahrazení jsme pozorovali snížení koncentrace iontů v aktivním místě. Snížení počtu kationtů Na⁺ v aktivním místě bylo způsobeno nahrazením U37 za C37. Uracil

obsahuje kyslík na pozici čtyři a ten se stará o vazbu dalšího kationtu a spolu s guaninem „GU wobble“ páru vytváří takzvanou iontovou kapsu. Cytosin má místo kyslíku skupinu $-\text{NH}_2$ a ta nedokáže vázat další kation. Tento fakt byl potvrzen radiální distribuční funkcí (Graf 8). U mutantu $\text{AH}^+1/\text{C37}$ naprosto vymizela iontová hustota v okolí $\text{AH}^+1/\text{C37}$ páru a tedy i vazebné místa pro kationty. Protonovaný adenin neobsahuje atom O6 a navíc byl kladně nabitý. Redukce iontů v aktivním místě byla potvrzena hustotními mapami a radiální distribuční funkcí (Obrázek 9). Abychom výskyt iontů kolem atomu $\text{AH}^+1/\text{G1}(\text{N7})$ kvantifikovali, použili jsme integrál radiální distribuční funkce, jehož hodnoty odpovídají koordinačnímu číslu (Tabulka 6). Ve vzdálenosti 3 Å je v posledních dvaceti nanosekundách simulace nejpravděpodobnější výskyt jednoho kationtu Na^+ u nativní struktury s neprotonovaným C75 (0,981) a ve vzdálenosti 6 Å se zde objevují dva ionty Na^+ (2,067). Z koordinačních čísel pro simulaci s protonovaným adeninem na pozici 1 je patrné, že první kation se vyskytuje u atomu $\text{AH}^+1(\text{N7})$ nejdříve ve vzdálenosti 6 Å.

Tabulka 6 Koordinační čísla k atomu $\text{G1}(\text{N7})$ pro celou simulaci (100 ns) a po 20 ns úsecích. První číslo značí koordinační číslo ve vzdálenosti 3 Å a druhé ve vzdálenosti 6 Å.

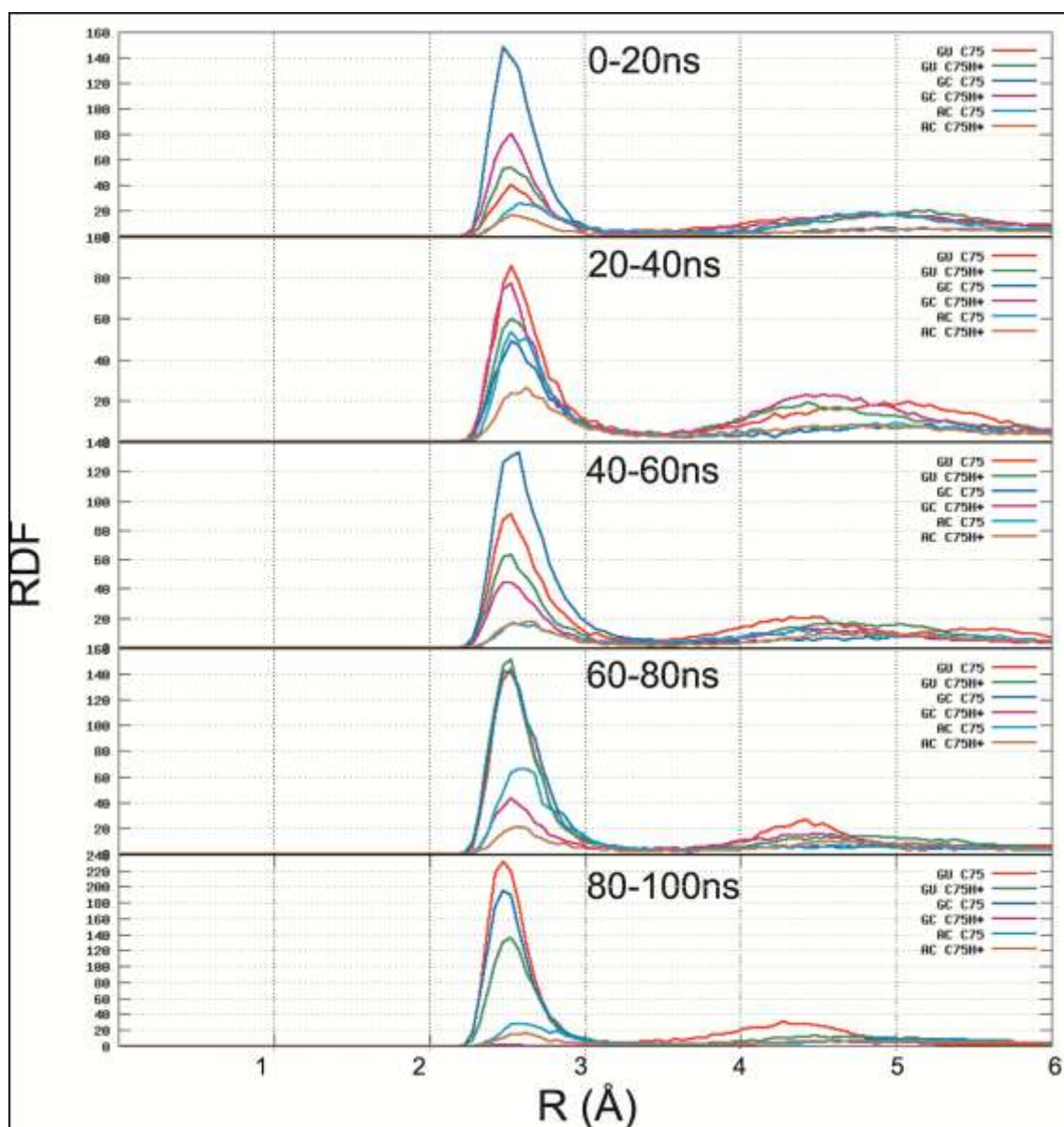
čas/struktura	G1/U37/C75	G1/U37/C75H+	G1/C37/C75	G1/C37/C75H+	AH+1/U37/C75	AH+1/U37/C75H+
0-100ns	0.591/1.871	0.494/1.665	0.702/1.33	0.278/1.282	0.269/1.064	0.134/0.749
0-20ns	0.252/1.616	0.305/1.659	0.719/1.223	0.399/1.783	0.205/1.376	0.094/0.544
20-40ns	0.481/1.911	0.374/1.606	0.319/0.934	0.425/1.827	0.331/1.010	0.201/0.819
40-60ns	0.520/1.961	0.361/1.539	0.810/1.425	0.280/1.088	0.136/1.068	0.122/0.845
60-80ns	0.690/1.701	0.738/1.810	0.782/1.440	0.260/1.144	0.442/0.958	0.140/0.832
80-100ns	0.981/2.067	0.676/1.617	0.869/1.563	0.005/0.482	0.213/0.835	0.104/0.637

Procentuální zobrazení okupance jednotlivých atomů v aktivním místě je shrnut v Tabulka 7. Čísla jsme získali výpočtem času, jak často byl kation Na^+ přítomen u daného atomu ve vzdálenosti $\leq 3,5 \text{ \AA}$. Pozorovali jsme výraznou procentuální změnu na atomu $\text{AH}^+1(\text{N7})$ u mutantu s protonovaným adeninem na pozici 1. Pokud je protonovaný adenin i katalytický cytosin, okupance ionty klesne na pouhých 8,2%.

Dalšími atomy často okupovanými sodíkovými kationty jsou samozřejmě kyslíky fosforu O1P nebo O2P nukleotidu $\text{AH}^+1/\text{G1}$ nebo C75, které byly sledovány. Z tabulky taky vyplývá, že ionty se vážou na atom G1(O6) a kyslík tak napomáhá zvětšení koncentrace Na^+ v aktivním místě. Pokud jsme nahradily guanin adeninem,

který neobsahoval kyslík na pozici 6, ale skupinu $-NH_2$, došlo k vymizení okupance u tohoto atomu.

Graf 8 Radiální distribuční funkce kolem atomu $G1/AH^+1(N7)$ pro kationty Na^+ v simulacích startujících z krystalové struktury *Ivc0*. V 60-100ns je výrazný červený pík odpovídající nativnímu stavu ribozymu hepatitidy D s „wobble“ párem na pozici 1/37. Druhý pík odpovídá výskytu iontů u atomu $U37(O4)$, který se nenachází v simulacích s cytosinem na této pozici.

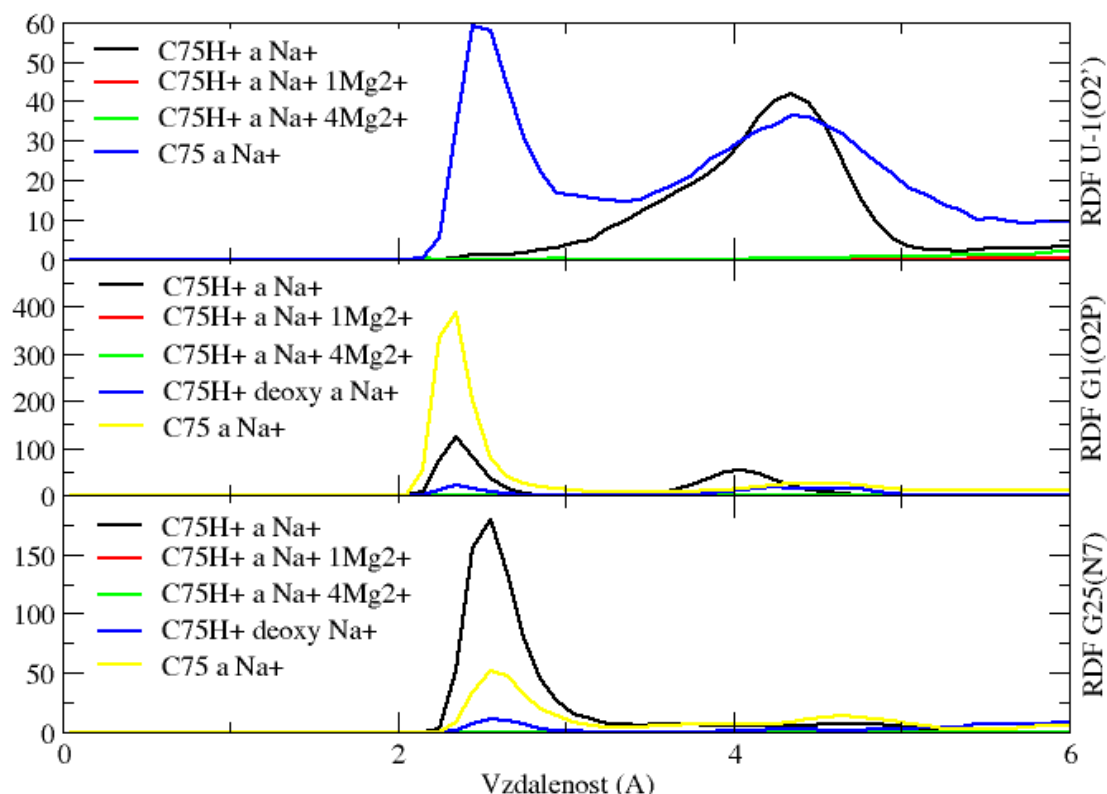


Tabulka 7 Okupance ionty Na^+ v procentech k jednotlivým atomům v aktivním místě. Vyznačená oblast znázorňuje pokles okupancí atomu $\text{AH}^+1/\text{G1}(\text{N7})$ Na^+ ionty v závislosti na typu simulace.

atom/simulace	G1/U37/C75	G1/U37/C75H ⁺	G1/C37/C75	G1/C37/C75H ⁺	AH ⁺ 1/U37/C75	AH ⁺ 1/U37/C75H ⁺
U-1(O2)	32.44	22.77		42.51	9.49	54.4
U-1(O4)	4.35		42.51	20.78	3.81	6.95
U-1(N3)				18.73		
U-1(O3')	94.67			4.12	41.37	1.08
U-1(O5')	18.02	5.63	9.13	7.79	6.12	23.66
G1(O6)/A ⁺ 1(N6)	14.22	5.75	15.49	7.89		
A ⁺ 1/G1(N7)	59.2	44.97	67.17	23.72	26.04	8.2
A ⁺ 1/G1(O1P)	22.01	15.95	55.09	16.94	39.16	11.34
A ⁺ 1/G1(O2P)	104.3		10.55	5.86	90.45	
A ⁺ 1/G1(O3')	7.03	3.43	71.68			
A ⁺ 1/G1(O5')	1.84				5.9	
C75(N3)	34.77	19.24	1.33	13.11	7.72	2.8
C75(O1P)	14.65	40.29	1.54	32.33	24.92	2.41
C75(O2P)	19.32	57.05	1.38	55.97	20.1	4.7
C75(O3')					7.48	
C75(O5')		4.09	1.32	13.78	5.5	2.79

U struktury 3nkb, která má uspořádání aktivního místa spíše kompatibilní s mechanismem obecné kyseliny, je situace ohledně pozic iontů v aktivním místě odlišná. Zde je z krystalových struktur hořečnatý ion umístěn mezi U20/G25 „wobble“ pár smyčky L3, nukleotid U-1 a katalytický C75. Domodelovaný hořečnatý kation je v přímém kontaktu s atomy U-1(O2') (vzdálenost 2,4Å), G1(O2P) (vzdálenost 2,2Å), U23(O2P) (vzdálenost 2,3Å) a jeho první solvatační sféra je navázána na G25(N7) a G25(O6). V našem případě jsme tuto strukturu neutralizovali kationty Na⁺ a navíc do dvou struktur jsme přidali jeden nebo čtyři hořečnaté kationty. Naše pozorování odhalilo vazbu iontů v aktivním místě a potvrdilo obsah kationtů ve stejném místě jako krystalové struktury 3nkb. Na rozdíl od experimentu jsme ale mohli pozorovat výskyt sodných kationtů. Sodné kationty bez přítomnosti hořečnatých kationtů se nacházely také mezi nukleotidy C20, G25, U-1 a C75 jak ukazují hustotní mapy a radiální distribuční funkce (Graf 9).

Graf 9 Radiální distribuční funkce sodných kationtů kolem atomu U-1(O2'), G1(O2P) a G25(N7).



V simulaci s jedním hořečnatým kationtem došlo k okamžitému nahrazení sodných kationtů v aktivním místě právě tímto Mg²⁺ iontem. Hořečnatý kationt se okamžitě ujal své pozice mezi nukleotidy C20, G25, U-1 a C75. S větší koncentrací hořečnatých

kationtů se koncentrace sodných iontů v aktivním místě a kolem něj ještě o něco zmenšila (*Obrázek 11, Graf 9*). Dalšími místy, kde se váží hořčnaté kationty, jsou fosfáty nukleotidů A77, A78 a P4 kmenu.

5. DISKUZE A ZÁVĚR

Ribozym hepatitidy D byl prvním RNA enzymem, u kterého se poprvé objevila myšlenka, že využívá jeden ze svých nukleotidů pro průběh acido-bazické katalýzy [28, 51, 53]. První krystalová struktura byla získána v roce 1998 [28] a dodnes, i když získaných struktur je již patnáct, nebyl objasněn přesný mechanismus katalýzy.

Zatímco názor, že nukleotid C75 se účastní katalýzy, je podpořen mnoha mutačními experimenty [47, 53], jeho přesná role buď jako obecné báze, nebo jako obecné kyseliny, je v důsledku nepřesností mechanistických studií už více nejasná. Oba modely mechanismů jsou spojeny s přesnými návrhy pro konformační uspořádání nezbytné pro katalýzu (*Obrázek 5*). V krystalových strukturách před rozštěpením cukr-fosfátové páteře mezi nukleotidy U-1 a G1 s mutací C75U je aktivní místo v geometrii spíše vhodné pro mechanismus obecné báze, zatímco krystalové struktury produktů se ukazují v konformaci svědčící spíše pro mechanismus obecné kyseliny. Nejnovější struktura prekurzoru bez mutace C75U sice nedokázala rozlišit konformaci U-1 nukleotidu a štípaného fosfátu, nicméně je spíše kompatibilní s geometrií pro mechanismus obecné kyseliny. Nukleotid U-1 a G1 musely být kvůli nízkému rozlišení domodelovány. Na první pohled nepatrnou změnu obsahovala struktura 3nkb, kdy oproti všem prekurzorovým strukturám měla „wobble“ pár U20/G25 v poloze *trans*. Pro výzkum strukturální dynamiky enzymu a vyplnění mezery mezi rentgenovou krystalografií, která poskytuje atomistický, ale statický pohled na strukturu, a mechanistickými studii, které zkoumají mechanismus katalýzy pomocí biochemických metod, jsme použili molekulárně dynamické simulace v explicitním modelu vody.

MD simulace struktury 1vc0

Struktura 1vc0 se vyznačovala uspořádáním nukleotidů v aktivním místě, které bylo vhodné pro mechanismus obecné zásady. V závislosti na mutacích na pozici 1 a 37 a protonace atomu C75(N3) jsme pozorovali, jak bude ovlivněna geometrie aktivního místa. Z výsledků vyplynulo, že struktura aktivního místa skládající se z nukleotidu U-

1, G1 a C75 se v zásadě nemění a konformace je stále blíže uspořádání pro mechanismus obecné kyseliny (*Obrázek 9*). Vyskytují se zde alfa gama přeskoky, které jsou způsobeny použitím silového pole parm99, který tento jev nemá ošetřen, jak tomu je u silového pole parmbc0 [94]. Nepozorujeme vazbu potřebnou pro mechanismus obecné kyseliny G1(O5') – C75(N3). Startovní struktura byla získána z prekursoru s mutací C75U. Tato mutace mohla způsobit deformaci aktivního místa vytvořením nového lokálního nebo globálního minima na hyperploše potenciální energie. Energetická bariéra vedoucí z tohoto minima byla příliš velká na to, abychom rekonformaci aktivního místa pozorovali ve volné dynamice na 100ns časové škále.

Na základě experimentálních prací [7] zabývajících se výskytem iontů v blízkosti „wobble“ páru G1/U37 vychází jednoznačné odpovědi, že atom G1(N7) je esenciálně důležitý pro katalytickou reakci. Jeho delecí a vytvořením 7-deazoguanizinu mnohonásobně klesla aktivita ve srovnání s klasickým ribozymem bez mutace. Byla navržena struktura prekursoru, v němž je ion vázán na G1(N7) a prostřednictvím své solvatační sféry hraje roli obecné báze, zatímco protonovaný C75 by byl obecnou kyselinou. Abychom mohli tento model podpořit, zanalyzovali jsme ionty v aktivním místě pomocí hustotních map a radiálních distribučních funkcí (*Obrázek 9, Graf 8*). Z výsledků vyplynulo, že u struktury s „GU wobble“ párem se vyskytuje nejvíce iontů, neboť vytváří takzvanou iontovou kapsu. U této struktury s neprotonovaným C75 jsme pozorovali ve vzdálenosti 4,5Å od atomu G1(N7) druhý výrazný pík na radiální distribuční funkci, který jsme identifikovali jako okupanci sodných kationtů u atomu U37(O4). Po mutaci „GU wobble“ páru na kanonický G1/C37 jsme už nezaznamenali tento druhý pík, neboť cytosin neobsahuje atom O4. Nicméně struktura s G1/C37 obsahovala stále výrazný výskyt sodných iontů u atomu G1(N7). Výrazný pokles iontů v aktivním místě zaznamenala až mutace tohoto páru na AH⁺1/C37. Protonovaný adenin snížil markantně výskyt iontů v aktivním místě. Nicméně pro tento pár izosterický s G1/U37 nedocházelo v experimentech ke snížení aktivity ribozymu hepatitidy D [101]. Výrazně nesnížená aktivita tohoto mutantu spolu s vymizením iontové hustoty u páru AH⁺1/C37 svědčí pro to, že minimálně u tohoto mutantu je navržený mechanismus [101] neudržitelný. Je možné, že struktura ribozymu využívá několik mechanismů pro své štěpení nebo je navržený mechanismus nekonzistentní a výskyt katalyticky aktivních iontů by tak byl lokalizován na jiném důležitém místě.

Modelování struktury na mechanismus obecné kyseliny

Z předcházejících výsledků jsme zjistili, že abychom docílili jakési geometrie, která by odpovídala mechanismu obecné kyseliny, nebude nám stačit volný průběh molekulární dynamiky. Použili jsme tedy umělých sil, abychom získali požadovanou geometrii.

Působením síly na udržení vazeb $G1(O5') - C75H^+(N3)$ a $G1(O2P/O1P) - C75H^+(N4)$ jsme požadované stabilní uspořádání nukleotidů nedostali, neboť po uvolnění sil došlo ve volné molekulární dynamice k okamžitému rozpadu klíčové vazby $G1(O5') - C75H^+(N3)$. Z detailní analýzy dynamiky aktivního místa jsme usoudili potřebu změny hodnot jednotlivých torzí. Prvně jsme měnili hodnotu úhlu $G1(\alpha)$ a $G1(\gamma)$ za stálého držení vazeb $G1(O5') - C75(N3)$ a $G1(O2P/O1P) - C75(N4)$. Tím se nám podařilo získat strukturu, kde zůstávala stabilní vazba $G1(O5') - C75(N3)$ a pozorovali jsme po dobu dvou nanosekund „in line attack“ potřebný pro průběh reakce (*Graf 4*). Jediným nedostatkem celé struktury byla orientace 5'-konce. Ta směřovala dovnitř struktury ribozymu a 5'-konec by tak nemohl pokračovat dále do struktury celé molekuly viru hepatitidy D (*Obrázek 10*). Abychom vytlačili 5'-konec ven ze struktury, museli jsme změnit hodnotu epsilon torze. Po otočení jsme dostali strukturu, kde docházelo k pravidelné změně vazby mezi $C75(N3)$ s $G1(O5')$ nebo $G1(O1P)$. Vazba potřebná pro mechanismus obecné kyseliny tedy nebyla stabilní a navíc jsme nepozorovali „inline attack“.

Dvě struktury vycházející z volné dynamiky po restrainech pouze na torze alfa a gama byly velmi blízko ideální stabilní struktury (*Obrázek 10*), která by odpovídala struktury pro mechanismus obecné kyseliny. Určitou roli hrála *cis* orientace „wobble“ páru U20/G25. Až na určité nedostatky struktury můžeme říci, že jsme šli správným směrem. Před dokončením těchto simulací byla publikována stabilní struktura odpovídající struktury mechanismu obecné kyseliny [8]. Struktura byla získána rentgenovou krystalografií pro *trans-acting* HDV ribozym delecí atomu U-1(O2'), $G1(O2')$ a $G2(O2')$ potřebného pro mechanismus. V této struktury byl identifikován „wobble“ pár U20/G25 v orientaci *trans*.

MD simulace struktury 3nkb

Zmiňovanou novou strukturu jsme podrobili molekulárně dynamické simulaci a pozorovali vývoj struktury a výskyt iontů v čase. Zjistili jsme, že struktura musí

splňovat určité podmínky, aby byla stabilní. První podmínkou je protonovaný atom C75(N3) a druhou je, že domodelovaná konformace pro mechanismus obecné kyseliny vyžaduje přítomnost atomu U-1(O2'). Struktury obsahující jak proton vodíku na atomu C75(N3), tak atom U-1(O2') (*Obrázek 11A,B,C*) zachovala geometrii vhodnou pro mechanismus obecné kyseliny po celou dobu simulace, což vyplývá z jednotlivých snímků geometrie (*Obrázek 11 A,B,C*) a grafů torzních úhlů mezi nukleotidy U-1 a G1 (*Graf 7*). Protonovaný C75(N3) tvořil vodíkovou vazbu s atomem G1(O5') a atom U-1(O2') byl v kontaktu s iontem sodíku nebo hořčíku, který se vázal na další atomy přímo nebo přes svou první solvatační sféru, a tím držel geometrii uracilu. Ribozym hepatitidy D s neprotonovaným cytosinem nemohl tvořit vazbu C75(N3) – G1(O5') a tudíž došlo k rozpadu uspořádání nukleotidů v aktivním místě, které by bylo vhodné pro mechanismus obecné kyseliny. Rozpad a změnu konformace struktury nukleotidů U-1 a G1 jsme pozorovali přímo v jednotlivých snímcích (*Obrázek 11 D,E*) a ve změnách hodnot jednotlivých torzí (*Graf 7*). Struktura vhodná pro mechanismus obecné kyseliny se rozpadla i pro simulaci s deoxy-uracilem na pozici -1, 1 a 2. Cukr uracilu nemohl tvořit vazbu s kationem sodíku, došlo k větší flexibilitě uracilu, což pozorujeme na změnách hodnot torzních úhlů páteře i cukru. Následně dojde ke ztrátě kontaktu C75(N3) – G1(O5'). Ze strukturních dat jasně vyplývá, že struktura navržená experimentátory je stabilní, ale závisí na protonovaném stavu atomu C75(N3) a přítomnosti atomu U-1(O2').

Aby mohla probíhat katalytická reakce, je zapotřebí v organismu přítomnost hořečnatých kationtů. Hořečnaté kationty se podílí na katalýze. V mechanismu obecné kyseliny se ionty, respektive jejich solvatační sféry, chovají jako obecné zásady a přijímají vodík z atomu U-1(O2') (viz kapitola 0). Experimenty zjistily, že reakce může probíhat i za absence divalentních iontů v přítomnosti monovalentních kationtů. Protože divalentní ionty jsou v molekulární dynamice špatně parametrizovatelné, použili jsme sodné kationty a ve dvou simulacích jeden a čtyři hořečnaté kationty. Jak jde vidět v simulaci s C75H⁺ neutralizované pouze sodnými ionty, monovalentní kation se uchytil na stejné místo jako divalentní kation, uložené experimentátory mezi nukleotidy U-1, G1, U20, G25 a C75. Pravděpodobnost výskytu iontů v aktivním místě jsme vyjádřili pomocí radiální distribuční funkce. Z RDF grafů (*Graf 9*) a snímků hustotních map (*Obrázek 11*) je patrné, že pokud se v simulaci vyskytuje hořečnatý kation, nahradí sodné kationty a celkový výskyt monovalentních iontů v aktivním místě

klesne. Aktivní místo vytváří silnou elektronegativní kapsu fosfátem nukleotidu G1 a U20/G25 „wobble“ párem, který v *trans* uspořádání drží kation pomocí atomů G25(N7) a G25(O6). V simulaci s neprotonovaným C75 se u atomu U-1(O2') nacházejí dva kationty sodíku ve vzdálenosti 2,5Å a 4,5Å. Naznačuje to situaci, že chybějící proton na atomu C75(N3) se snaží nahradit ve vazbě s atomem G25(O5') kation sodíku. Vazba ovšem nebyla dostatečně silná a kontakt se nepodařil udržet.

Z výsledků vyplývá, že struktury prekurzorů získané mutací C75U vytvářející geometrii vhodnou pro obecnou zásadu jsou ve své geometrii stále po celou dobu simulace a nepřecházejí samovolně do uspořádání pro obecnou kyselinu ani po změně U75 na katalytický protonovaný cytosin. Struktura se nachází ve svém energetickém minimu. Struktura s geometrií vhodnou pro mechanismus obecné kyseliny (3nb) je udržitelná ve své konformaci za předpokladu protonace atomu C75(N3) a přítomnosti atomu U-1(O2'). Dalším směrem výzkumem by mělo být ověření, zda mechanismus obecné kyseliny v geometrii je z energetického hlediska schůdný pomocí nástroje kvantové chemie, podobně jako tomu bylo u geometrie pro mechanismus obecné zásady [58].

Navzdory některým omezením molekulární dynamiky (viz kapitola 2.4.1) je tento nástroj teoretické chemie nejlepší pro popis biomakromolekul v explicitním rozpouštědle a poskytuje důležité kvalitativní strukturální informace pro RNA katalýzu. MD simulace velmi užitečně doplňují experimentální techniky, zvláště pak statickou rentgenovou krystalografii, a proto si zasloužila důstojné postavení ve vědě.

6. PŘÍLOHY

Příloha 1 Parametry pro protonovaný cytosin.

```
RCP INT 1
CHANGE OMIT DU BEG
0.00000
1 DUMM DU M 0.000000 0.000000 0.000000 0.000000
2 DUMM DU M 1.449000 0.000000 0.000000 0.000000
3 DUMM DU M 2.078700 1.385600 0.000000 0.000000
4 P P M 2.314489 1.776673 -0.478436 1.166200
5 O1P O2 E 1.933410 3.073374 -1.081549 -0.776000
6 O2P O2 E 3.156547 0.871841 -1.292450 -0.776000
7 O5' OS M 2.994369 2.142475 0.922974 -0.498900
8 C5' CT M 2.156035 2.551837 2.019887 0.055800
9 H5'1 H1 E 1.452687 1.753841 2.257803 0.067900
10 H5'2 H1 E 1.604968 3.450028 1.741178 0.067900
11 C4' CT M 3.008252 2.847921 3.243186 0.106500
12 H4' H1 E 2.447118 3.477373 3.933851 0.117400
13 O4' OS S 3.228121 1.605168 3.977231 -0.354800
14 C1' CT B 4.558614 1.150950 3.777548 0.006600
15 H1' H2 E 5.072002 1.095281 4.737461 0.202900
16 N1 N* S 4.485689 -0.234531 3.276984 -0.123500
17 C6 CM B 4.434822 -0.525287 1.944988 0.320000
18 H6 H4 E 4.450328 0.280846 1.226944 0.190000
19 C5 CM B 4.343212 -1.803676 1.520274 -0.740000
20 H5 HA E 4.291174 -2.014169 0.462316 0.280000
21 C4 CA B 4.319830 -2.824428 2.526674 1.040000
22 N4 N2 B 4.226588 -4.113038 2.170429 -1.050000
23 H41 H E 4.213907 -4.831230 2.880581 0.490000
24 H42 H E 4.169275 -4.366118 1.194777 0.490000
25 N3 NA B 4.390522 -2.522967 3.828979 -0.760000
26 H3 H E 4.378261 -3.256188 4.508751 0.440000
27 C2 C S 4.475763 -1.230819 4.236789 0.840000
28 O2 O E 4.540867 -0.935393 5.427913 -0.510000
29 C3' CT M 4.415606 3.377827 2.961306 0.202200
30 H3' H1 E 4.412072 3.941489 2.028369 0.061500
31 C2' CT B 5.230443 2.095696 2.779425 0.067000
32 H2'1 H1 E 5.668211 2.081313 1.781301 0.097200
33 O2' OH S 6.272982 2.049941 3.757136 -0.613900
34 HO'2 HO E 6.759278 1.235228 3.610987 0.418600
35 O3' OS M 5.029898 4.128649 3.998279 -0.524600
```

IMPROPER

```
C6 C2 N1 C1'
N1 N3 C2 O2
C2 C4 N3 H3
C4 H41 N4 H42
N1 C5 C6 H6
C6 C4 C5 H5
N3 C5 C4 N4
```

LOOP CLOSING EXPLICIT

```
C1' C2'
C2 N1
```

DONE

STOP

Příloha 2 Parametry pro protonovaný adenin.

```

RAP      XYZ  0
CHANGE   OMIT DU  BEG
0.0000
  1  DUMM  DU   M   0  -1  -2   0.00   0.00   0.00   0.0000
  2  DUMM  DU   M   1   0  -1   1.00   0.00   0.00   0.0000
  3  DUMM  DU   M   2   1   0   1.00   90.00   0.00   0.0000
  4  P      P    M   3   2   1   1.60  119.04  200.00  1.1662
  5  O1P    O2   E   4   3   2   1.48  109.61  150.00 -0.7760
  6  O2P    O2   E   4   3   2   1.48  109.58   20.00 -0.7760
  7  O5'    OS   M   4   3   2   1.60  101.43 -98.89 -0.4989
  8  C5'    CT   M   7   4   3   1.44  119.00 -39.22  0.0558
  9  H5'1   H1   E   8   7   4   1.09  109.50   60.00  0.0679
 10  H5'2   H1   E   8   7   4   1.09  109.50 -60.00  0.0679
 11  C4'    CT   M   8   7   4   1.52  110.00  180.00  0.1065
 12  H4'    H1   E  11   8   7   1.09  109.50 -200.00  0.1174
 13  O4'    OS   S  11   8   7   1.46  108.86 -86.31 -0.3548
 14  C1'    CT   B  13  11   8   1.42  110.04  105.60  0.1297
 15  H1'    H2   E  14  13  11   1.09  109.50 -240.00  0.2007
 16  N9     N*   S  14  13  11   1.52  109.59 -127.70 -0.0532
 17  C8     CK   B  16  14  13   1.37  131.20   81.59  0.1412
 18  H8     H5   E  17  16  14   1.08  120.00   0.00   0.2008
 19  N7     NB   S  17  16  14   1.30  113.93  177.00 -0.5330
 20  C5     CB   S  19  17  16   1.39  104.00   0.00   0.2613
 21  C6     CA   B  20  19  17   1.40  132.42  180.00  0.2748
 22  N6     N2   B  21  20  19   1.34  123.50   0.00 -0.7251
 23  H61    H    E  22  21  20   1.01  120.00  180.00  0.4282
 24  H62    H    E  22  21  20   1.01  120.00   0.00  0.4282
 25  N1     NA   B  21  20  19   1.34  117.43  180.00 -0.2604
 26  H1     H    E  25  21  20   1.00  119.46  180.00  0.3566
 27  C2     CQ   B  25  21  20   1.33  118.80   0.00  0.1964
 28  H2     H5   E  27  25  21   1.08  120.00  180.00  0.1889
 29  N3     NC   S  27  25  21   1.32  129.17   0.00 -0.4431
 30  C4     CB   E  29  27  25   1.35  110.80   0.00  0.3240
 31  C3'    CT   M  11   8   7   1.53  115.78 -329.11  0.2022
 32  H3'    H1   E  31  11   8   1.09  109.50   30.00  0.0615
 33  C2'    CT   B  31  11   8   1.53  102.80 -86.30  0.0670
 34  H2'1   H1   E  33  31  11   1.09  109.50  120.00  0.0972
 35  O2'    OH   S  33  31  11   1.43  109.50  240.00 -0.6139
 36  HO'2   HO   E  35  33  31   0.96  107.00  180.00  0.4186
 37  O3'    OS   M  31  11   8   1.42  116.52 -203.47 -0.5246

```

IMPROPER

```

C8  C4  N9  C1'
C6  H61 N6  H62
N7  N9  C8  H8
N1  N3  C2  H2
C5  N1  C6  N6
C6  C2  N1  H1

```

LOOP CLOSING EXPLICIT

```

C1'  C2'
C4   C5
C4   N9

```

DONE
STOP

Příloha 3 Parametry pro deoxy uracil.

```

DU5   XYZ   0
CHANGE OMIT DU   BEG
0.0000
 1  DUMM  DU   M       999.000    999.0    -999.0     .00000
 2  DUMM  DU   M       999.000   -999.0     999.0     .00000
 3  DUMM  DU   M      -999.000    999.0     999.0     .00000
 4  H5T   HO   M       1.866000    1.500000    0.000000    0.442200
 5  O5'   OH   M       1.958000    1.721000    0.930000   -0.631800
 6  C5'   CT   M       0.788000    2.111000    1.674000   -0.006900
 7  H5'1  H1   E       0.060000    1.301000    1.657000    0.075400
 8  H5'2  H1   E       0.351000    3.002000    1.223000    0.075400
 9  C4'   CT   M       1.166000    2.413000    3.115000    0.162900
10  H4'   H1   E       0.392000    3.030000    3.572000    0.117600
11  O4'   OS   S       1.142000    1.170000    3.880000   -0.369100
12  C1'   CT   B       2.468000    0.738000    4.147000    0.074800
13  H1'   H2   E       2.623000    0.685000    5.225000    0.180400
14  N1    N*   S       2.633000   -0.717000    3.703000    0.041800
15  C6    CM   B       2.876000   -1.079000    2.405000   -0.112600
16  H6    H4   E       2.959000   -0.321000    1.639000    0.218800
17  C5    CM   B       3.067000   -2.361000    2.065000   -0.363500
18  H5    HA   E       3.259000   -2.627000    1.025000    0.181100
19  C4    C    B       3.023000   -3.401000    3.060000    0.595200
20  O4    O    E       3.186000   -4.601000    2.843000   -0.576100
21  N3    NA   B       2.773000   -2.947000    4.339000   -0.354900
22  H3    H    E       2.731000   -3.698000    5.127000    0.315400
23  C2    C    S       2.573000   -1.635000    4.718000    0.468700
24  O2    O    E       2.357000   -1.330000    5.880000   -0.547700
25  C3'   CT   M       2.576000    2.967000    3.331000    0.071300
26  H3'   H1   E       2.882000    3.536000    2.453000    0.098500
27  C2'   CT   B       3.425000    1.699000    3.439000   -0.085400
28  H2'1  HC   E       4.178000    1.697000    2.651000    0.071800
29  H2'2  HC   E       3.917000    1.672000    4.411000    0.071800
30  O3'   OS   M       2.786000    3.721000    4.516000   -0.523200

```

```

LOOP
C1'  C2'
C2   N1

```

```

IMPROPER
  C2  C6  N1  C1'
  C5  H6  C6  N1
  C4  C6  C5  H5
  C5  N3  C4  O4
  C4  C2  N3  H3
  N1  N3  C2  O2

```

```

DONE
STOP

```


7. VYSVĚTLENÍ ZKRATEK

A	adenin
C	cytosin
G	guanin
U	uracil
RMSd	střední kvadratická odchylka
RDF	radiální distribuční funkce
DNA	deoxy ribonukleová kyselina
RNA	ribonukleová kyselina
mRNA	informační ribonukleová kyselina
tRNA	transférová ribonukleová kyselina
rRNA	ribozomální ribonukleová kyselina
P	pseudorotace
τ_m	maximální stupeň vrásnění
HDV	virus hepatitidy D
HBV	virus hepatitidy B
HDVr	ribozym hepatitidy D
HBsAg	povrchový antigen viru hepatitidy B
HDAg	antigen hepatitidy D
ORF	otevřený čtecí rámeček
Na ⁺	sodný kation
Mg ²⁺	hořečnatý kation
GA	obecná kyselina ("general acid")
GB	obecná báze ("general base")

8. POUŽITÁ LITERATURA

1. North, G., *Nobel prizes: chemistry. RNA's catalytic role.* Nature, 1989. **341**(6243): p. 556.
2. Waldrop, M.M., *Catalytic RNA wins chemistry Nobel.* Science, 1989. **246**(4928): p. 325.
3. Wieslander, L., *[The winners of the Nobel Prize in chemistry this year: the discovery that shows RNA functioning as an enzyme helps us to understand the creation and development of life].* Lakartidningen, 1989. **86**(49): p. 4353-6.
4. Cech, T.R., A.J. Zaug, and P.J. Grabowski, *Invitro Splicing of the Ribosomal-Rna Precursor of Tetrahymena - Involvement of a Guanosine Nucleotide in the Excision of the Intervening Sequence.* Cell, 1981. **27**(3): p. 487-496.
5. Watson, J. and F. Crick, *Molecular structure of nucleic acids-A structure of deoxyribose nucleic acid,* in NATURE. 1953. p. 737-738.
6. Holley, R., et al., *Structure of a ribonucleic acid.,* in Science. 1965. p. 1462-5.
7. Chen, J., et al., *A catalytic metal ion interacts with the cleavage site GU wobble in the HDV ribozyme.,* in Biochemistry. 2009. p. 1498-1507.
8. Chen, J.H., et al., *A 1.9 Å crystal structure of the HDV ribozyme precleavage suggests both Lewis acid and general acid mechanisms contribute to phosphodiester cleavage.* Biochemistry, 2010. **49**(31): p. 6508-18.
9. Cerrone-Szakal, A., N. Siegfried, and P. Bevilacqua, *Mechanistic Characterization of the HDV Genomic Ribozyme: Solvent Isotope Effects and Proton Inventories in the Absence of Divalent Metal Ions Support C75 as a General Acid,* in Journal of the American Chemical Society. 2008. p. 14504-14520.
10. Goodman, H.M. and A. Rich, *Formation of a DNA-soluble RNA hybrid and its relation to the origin, evolution, and degeneracy of soluble RNA.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1962. **48**: p. 2101-9.
11. Gilbert, W., *Origin of Life - the Rna World.* Nature, 1986. **319**(6055): p. 618-618.
12. Crick, F.H.C., *Origin of Genetic Code.* Journal of Molecular Biology, 1968. **38**(3): p. 367-&.
13. Visser, C.M. and R.M. Kellogg, *Biotin - Its Place in Evolution.* Journal of Molecular Evolution, 1978. **11**(2): p. 171-187.
14. Benner, S.A., A.D. Ellington, and A. Tauer, *Modern Metabolism as a Palimpsest of the Rna World.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1989. **86**(18): p. 7054-7058.
15. Kim, H.J., et al., *Synthesis of Carbohydrates in Mineral-Guided Prebiotic Cycles.* J Am Chem Soc, 2011.
16. Benner, S.A., *Understanding nucleic acids using synthetic chemistry.* Acc Chem Res, 2004. **37**(10): p. 784-97.
17. Joyce, G.F., *The antiquity of RNA-based evolution.* Nature, 2002. **418**(6894): p. 214-21.
18. Caspersson, T. and J. Schultz, *Ribonucleic acids in both nucleus and cytoplasm, and the function of the nucleolus.,* in Proc. N. A. S. 1940. p. 507-515.
19. Gierer, A. and G. Schramm, *INFECTIVITY OF RIBONUCLEIC ACID FROM TOBACCO MOSAIC VIRUS,* in Nature. 1956. p. 702-703.
20. Georgiev, G.P. and V.L. Mant'Eva, *[Messenger and ribosomal ribonucleic acid in the chromosomal-nucleolar apparatus, methods of isolation and nucleotide structure].* Biokhimiia, 1962. **27**: p. 949-57.
21. Lang, N. and C.E. Sekeris, *Isolation from Rat Liver Cells of a Nuclear Rna Fraction Having Messenger Activity.* Life Sci, 1964. **3**: p. 161-7.
22. Sirlin, J.L., *Biology of RNA.* 1972, New York and London: Academic Press.

23. Zirbel, C.L., et al., *Classification and energetics of the base-phosphate interactions in RNA*. Nucleic Acids Res, 2009. **37**(15): p. 4898-918.
24. Altona, C. and M. Sundaralingam, *Conformational analysis of the sugar ring in nucleosides and nucleotides. A new description using the concept of pseudorotation*. J Am Chem Soc, 1972. **94**(23): p. 8205-12.
25. Rizzetto, M., et al., *Immunofluorescence detection of new antigen-antibody system (delta/anti-delta) associated to hepatitis B virus in liver and in serum of HBsAg carriers*. Gut, 1977. **18**(12): p. 997-1003.
26. Taylor, J.M., *Replication of human hepatitis delta virus: influence of studies on subviral plant pathogens*. Adv Virus Res, 1999. **54**: p. 45-60.
27. Chao, Y.C., et al., *Sequence conservation and divergence of hepatitis delta virus RNA*. Virology, 1990. **178**(2): p. 384-92.
28. Ferre-D'Amare, A.R., K. Zhou, and J.A. Doudna, *Crystal structure of a hepatitis delta virus ribozyme*. Nature, 1998. **395**(6702): p. 567-74.
29. Barrera, A., et al., *Mapping of the hepatitis B virus pre-S1 domain involved in receptor recognition*. J Virol, 2005. **79**(15): p. 9786-98.
30. Been, M. and G. Wickham, *Self-cleaving ribozymes of hepatitis delta virus RNA.*, in *Eur J Biochem*. 1997. p. 741-53.
31. Fedor, M.J., *Comparative Enzymology and Structural Biology of RNA Self-Cleavage*. Annual Review of Biophysics, 2009. **38**: p. 271-299.
32. Cech, T.R., *Evolution of biological catalysis: ribozyme to RNP enzyme*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2009. **74**: p. 11-6.
33. DeRose, V.J., *Metal ion binding to catalytic RNA molecules*. Curr Opin Struct Biol, 2003. **13**(3): p. 317-24.
34. Adams, P.L., et al., *Crystal structure of a group I intron splicing intermediate*. RNA, 2004. **10**(12): p. 1867-87.
35. Guo, F., A.R. Gooding, and T.R. Cech, *Structure of the Tetrahymena ribozyme: base triple sandwich and metal ion at the active site*. Mol Cell, 2004. **16**(3): p. 351-62.
36. Golden, B.L., H. Kim, and E. Chase, *Crystal structure of a phage Twort group I ribozyme-product complex*. Nat Struct Mol Biol, 2005. **12**(1): p. 82-9.
37. Bevilacqua, P.C. and R. Yajima, *Nucleobase catalysis in ribozyme mechanism*. Curr Opin Chem Biol, 2006. **10**(5): p. 455-64.
38. Branch, A.D. and H.D. Robertson, *A replication cycle for viroids and other small infectious RNA's*. Science, 1984. **223**(4635): p. 450-5.
39. Robertson, H.D., *Replication and evolution of viroid-like pathogens*. Curr Top Microbiol Immunol, 1992. **176**: p. 213-9.
40. Perrotta, A.T. and M.D. Been, *The self-cleaving domain from the genomic RNA of hepatitis delta virus: sequence requirements and the effects of denaturant*. Nucleic Acids Res, 1990. **18**(23): p. 6821-7.
41. Perrotta, A.T. and M.D. Been, *A pseudoknot-like structure required for efficient self-cleavage of hepatitis delta virus RNA*. Nature, 1991. **350**(6317): p. 434-6.
42. Belinsky, M.G. and G. Dinter-Gottlieb, *Non-ribozyme sequences enhance self-cleavage of ribozymes derived from Hepatitis delta virus*. Nucleic Acids Res, 1991. **19**(3): p. 559-64.
43. Smith, J.B. and G. Dinter-Gottlieb, *Antigenomic Hepatitis delta virus ribozymes self-cleave in 18 M formamide*. Nucleic Acids Res, 1991. **19**(6): p. 1285-9.
44. Sponer, J., et al., *The effect of metal binding to the N7 site of purine nucleotides on their structure, energy, and involvement in base pairing*. Journal of Physical Chemistry B, 2000. **104**(31): p. 7535-7544.

45. Wadkins, T.S., et al., *A pH-sensitive RNA tertiary interaction affects self-cleavage activity of the HDV ribozymes in the absence of added divalent metal ion.* J Mol Biol, 2001. **305**(5): p. 1045-55.
46. Nakano, S. and P.C. Bevilacqua, *Proton inventory of the genomic HDV ribozyme in Mg(2+)-containing solutions.* J Am Chem Soc, 2001. **123**(45): p. 11333-4.
47. Tanner, N.K., et al., *A 3-Dimensional Model of Hepatitis-Delta Virus Ribozyme Based on Biochemical and Mutational Analyses.* Current Biology, 1994. **4**(6): p. 488-498.
48. Perrotta, A.T. and M.D. Been, *Core sequences and a cleavage site wobble pair required for HDV antigenomic ribozyme self-cleavage.* Nucleic Acids Res, 1996. **24**(7): p. 1314-21.
49. Nishikawa, F., H. Fauzi, and S. Nishikawa, *Detailed analysis of base preferences at the cleavage site of a trans-acting HDV ribozyme: a mutation that changes cleavage site specificity.* Nucleic Acids Res, 1997. **25**(8): p. 1605-10.
50. Jeong, S., et al., *Trans-acting hepatitis delta virus ribozyme: catalytic core and global structure are dependent on the 5' substrate sequence.* Biochemistry, 2003. **42**(25): p. 7727-40.
51. Nakano, S., D.M. Chadalavada, and P.C. Bevilacqua, *General acid-base catalysis in the mechanism of a hepatitis delta virus ribozyme.* Science, 2000. **287**(5457): p. 1493-1497.
52. Nakano, S., D.J. Proctor, and P.C. Bevilacqua, *Mechanistic characterization of the HDV genomic ribozyme: assessing the catalytic and structural contributions of divalent metal ions within a multichannel reaction mechanism.,* in *Biochemistry.* 2001. p. 12022-12038.
53. Perrotta, A.T., I. Shih, and M.D. Been, *Imidazole rescue of a cytosine mutation in a self-cleaving ribozyme.* Science, 1999. **286**(5437): p. 123-6.
54. Shih, I.H. and M.D. Been, *Catalytic strategies of the hepatitis delta virus ribozymes.* Annu Rev Biochem, 2002. **71**: p. 887-917.
55. Shih, I.H. and M.D. Been, *Ribozyme cleavage of a 2,5-phosphodiester linkage: mechanism and a restricted divalent metal-ion requirement.* RNA, 1999. **5**(9): p. 1140-8.
56. Ke, A.L., et al., *A conformational switch controls hepatitis delta virus ribozyme catalysis.* Nature, 2004. **429**(6988): p. 201-205.
57. Banas, P., et al., *Theoretical studies of RNA catalysis: hybrid QM/MM methods and their comparison with MD and QM.* Methods, 2009. **49**(2): p. 202-16.
58. Banas, P., et al., *General base catalysis for cleavage by the active-site cytosine of the hepatitis delta virus ribozyme: QM/MM calculations establish chemical feasibility.* Journal of Physical Chemistry B, 2008. **112**(35): p. 11177-11187.
59. Das, S.R. and J.A. Piccirilli, *General acid catalysis by the hepatitis delta virus ribozyme.* Nature Chemical Biology, 2005. **1**(1): p. 45-52.
60. Gong, B., et al., *Detection of innersphere interactions between magnesium hydrate and the phosphate backbone of the HDV ribozyme using Raman crystallography.* J Am Chem Soc, 2008. **130**(30): p. 9670-2.
61. Gong, B., et al., *Competition between Co(NH₃)₆³⁺ and inner sphere Mg²⁺ ions in the HDV ribozyme.* Biochemistry, 2009. **48**(50): p. 11961-70.
62. Chen, J.H., et al., *A catalytic metal ion interacts with the cleavage Site G.U wobble in the HDV ribozyme.* Biochemistry, 2009. **48**(7): p. 1498-507.
63. Nakano, S., A.L. Cerrone, and P.C. Bevilacqua, *Mechanistic characterization of the HDV genomic ribozyme: classifying the catalytic and structural metal ion sites within a multichannel reaction mechanism.* Biochemistry, 2003. **42**(10): p. 2982-94.
64. Krasovska, M.V., et al., *Cations and hydration in catalytic RNA: Molecular dynamics of the hepatitis delta virus ribozyme.* Biophysical Journal, 2006. **91**(2): p. 626-638.

65. Perrotta, A.T. and M.D. Been, *HDV ribozyme activity in monovalent cations*. *Biochemistry*, 2006. **45**(38): p. 11357-65.
66. Bostrom, M., et al., *Hofmeister effects in membrane biology: the role of ionic dispersion potentials*. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*, 2003. **68**(4 Pt 1): p. 041902.
67. Wadkins, T.S., et al., *A pH-sensitive RNA tertiary interaction affects self-cleavage activity of the HDV ribozymes in the absence of added divalent metal ion*. *J Mol Biol*, 2001. **305**(5): p. 1045-55.
68. Counsell, D., *Workshop--Predicting the structure of biological molecules*. *Comp Funct Genomics*, 2004. **5**(6-7): p. 480-90.
69. Sklenar, V., et al., *N.m.r. and c.d. studies of the DNA fragments d(TATATATA) and d(TATATA) in solution*. *Int J Biol Macromol*, 1989. **11**(5): p. 273-7.
70. Lavery, R. and H. Sklenar, *Defining the structure of irregular nucleic acids: conventions and principles*. *J Biomol Struct Dyn*, 1989. **6**(4): p. 655-67.
71. Babcock, M.S., E.P. Pednault, and W.K. Olson, *Nucleic acid structure analysis. Mathematics for local Cartesian and helical structure parameters that are truly comparable between structures*. *J Mol Biol*, 1994. **237**(1): p. 125-56.
72. Lu, X.J., M.A. El Hassan, and C.A. Hunter, *Structure and conformation of helical nucleic acids: analysis program (SCHNAaP)*. *J Mol Biol*, 1997. **273**(3): p. 668-80.
73. Lu, X.J. and W.K. Olson, *3DNA: a software package for the analysis, rebuilding and visualization of three-dimensional nucleic acid structures*. *Nucleic Acids Res*, 2003. **31**(17): p. 5108-21.
74. Case, D.A., et al., *AMBER 8*. 2004, University of California: San Francisco.
75. Banáš, P., *Diplomová práce, in Molekulární dynamika haloalkan dehalogenáz*. 2004, Přírodovědecká knihovna: Olomouc.
76. Kollman, P.A., et al., *Modeling complex molecular interactions involving proteins and DNA*. *Ann N Y Acad Sci*, 1986. **482**: p. 234-44.
77. Weiner, P.K., et al., *Electrostatic potential molecular surfaces*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1982. **79**(12): p. 3754-8.
78. Jorgensen, W.L., et al., *Comparison of simple potential functions for simulating liquid water.*, in *J. Chem. Phys.* **79**. 1983. p. 926-935.
79. Ewald, P.P., *The calculation of optical and electrostatic grid potential*. *Annalen Der Physik*, 1921. **64**(3): p. 253-287.
80. Cornell, W.D., 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**: p. 5179-5197.
81. Foloppe, N. and A.D. MacKerell, *All-atom empirical force field for nucleic acids: I. Parameter optimization based on small molecule and condensed phase macromolecular target data*. *Journal of Computational Chemistry*, 2000. **21**(2): p. 86-104.
82. Reblova, K., et al., *Structure, dynamics, and elasticity of free 16S rRNA helix 44 studied by molecular dynamics simulations*. *Biopolymers*, 2006. **82**(5): p. 504-520.
83. Reblova, K., et al., *Molecular dynamics simulations of RNA kissing-loop motifs reveal structural dynamics and formation of cation-binding pockets*. *Nucleic Acids Research*, 2003. **31**(23): p. 6942-6952.
84. Krasovska, M.V., et al., *Structural dynamics of precursor and product of the RNA enzyme from the hepatitis delta virus as revealed by molecular dynamics simulations*. *Journal of Molecular Biology*, 2005. **351**(4): p. 731-748.
85. Smith, D.E. and L.X. Dang, *Computer-Simulations of NaCl Association in Polarizable Water*. *Journal of Chemical Physics*, 1994. **100**(5): p. 3757-3766.

86. Levitt, M., et al., *Calibration and testing of a water model for simulation of the molecular dynamics of proteins and nucleic acids in solution*. Journal of Physical Chemistry B, 1997. **101**(25): p. 5051-5061.
87. Feller, S.E. and R.W. Pastor, *On simulating lipid bilayers with an applied surface tension: periodic boundary conditions and undulations*. Biophys J, 1996. **71**(3): p. 1350-5.
88. Florova, P., et al., *Explicit Water Models Affect the Specific Solvation and Dynamics of Unfolded Peptides While the Conformational Behavior and Flexibility of Folded Peptides Remain Intact*. Journal of Chemical Theory and Computation, 2010. **6**(11): p. 3569-3579.
89. Martick, M. and W.G. Scott, *Tertiary contacts distant from the active site prime a ribozyme for catalysis*. Cell, 2006. **126**(2): p. 309-20.
90. Ke, A., et al., *A conformational switch controls hepatitis delta virus ribozyme catalysis*. Nature, 2004. **429**(6988): p. 201-5.
91. Case, D.A., et al., *AMBER 9.0*. 2006, San Francisco: University of California.
92. Wang, J.M., P. Cieplak, and P.A. Kollman, *How well does a restrained electrostatic potential (RESP) model perform in calculating conformational energies of organic and biological molecules?*, in *J. Comput. Chem.* 21. 2000. p. 1049-1074.
93. Cheatham, T.E., P. Cieplak, and P.A. Kollman, *A modified version of the Cornell et al. force field with improved sugar pucker phases and helical repeat.*, in *J. Biomol. Struct. Dyn.* 16. 1999. p. 845-862.
94. Perez, A., et al., *Refinement of the AMBER force field for nucleic acids: Improving the description of alpha/gamma conformers*. Biophysical Journal, 2007. **92**(11): p. 3817-3829.
95. Banas, P., et al., *Performance of Molecular Mechanics Force Fields for RNA Simulations: Stability of UUCG and GNRA Hairpins*. Journal of Chemical Theory and Computation, 2010. **6**(12): p. 3836-3849.
96. DeLano, W.L., *The PyMOL Molecular Graphics System*. 2002.
97. Humphrey, W., A. Dalke, and K. Schulten, *VMD: Visual molecular dynamics.*, in *J. Mol. Graph.* 14. 1996. p. 33-38.
98. Spirko, V. and P. Hobza, *Theoretical investigations into the blue-shifting hydrogen bond in benzene complexes*. Chemphyschem, 2006. **7**(3): p. 640-3.
99. Gong, B., et al., *Direct measurement of a pK(a) near neutrality for the catalytic cytosine in the genomic HDV ribozyme using Raman crystallography*. Journal of the American Chemical Society, 2007. **129**(43): p. 13335-13342.
100. Ke, A., et al., *Structural roles of monovalent cations in the HDV ribozyme*. Structure, 2007. **15**(3): p. 281-7.
101. Cerrone-Szakal, A.L., et al., *Mechanistic characterization of the HDV genomic ribozyme: the cleavage site base pair plays a structural role in facilitating catalysis*. RNA, 2008. **14**(9): p. 1746-60.