

Univerzita Palackého v Olomouci  
Přírodovědecká fakulta

Katedra Fyzikální chemie



Strukturní dynamika Twister ribozymu

Bakalářská práce

Autor:  
Studijní program:

Tereza Filipi  
B1407 Chemie

Studijní obor:  
Forma studia:  
Vedoucí práce:

Aplikovaná chemie  
Prezenční  
doc. Mgr. Pavel Banáš, Ph.D.

Olomouc 2016

# Bibliografická identifikace

<b>Jméno a příjmení autora</b>	Tereza Filipi
<b>Název práce</b>	Strukturní dynamika Twister Ribozymu
<b>Typ práce</b>	Bakalářská
<b>Pracoviště</b>	Katedra fyzikální chemie
<b>Vedoucí práce</b>	doc. Mgr. Pavel Banáš, PhD.
<b>Rok obhajoby</b>	2016
<b>Abstrakt</b>	<p>Cílem předložené bakalářské práce bylo studium strukturní dynamiky Twister ribozymu za použití metod výpočetní chemie. Studie dynamiky může přiblížit mechanismus RNA katalýzy této nedávno objevené třídy ribozymů. Jako výchozí metoda byla zvolena molekulová dynamika. Simulace nám poskytly všeobecný náhled na chování studovaných struktur. Na základě tohoto náhledu a naměřených hodnot RMSd, dihedrálních úhlů a B-faktoru byly analyzovány veškeré zkoumané struktury.</p>
<b>Klíčová slova</b>	Twister ribozym, molekulární dynamika, ribozym
<b>Počet stran</b>	49
<b>Jazyk</b>	Čeština

# Bibliographical identification

<b>Author's first name and surname</b>	Tereza Filipi
<b>Title</b>	The structural dynamics of Twister ribozyme
<b>Type of thesis</b>	Bachelor
<b>Department</b>	Department of Physical Chemistry
<b>Supervisor</b>	doc. Mgr. Pavel Banáš, PhD.
<b>The year of presentation</b>	2016
<b>Abstract</b>	<p>The aim of this bachelor thesis was study of structural dynamic of Twister ribozyme using computational chemistry. Study of dynamic can provide us a closer look at mechanism of RNA catalysis of this recently discovered class of ribozymes. We used molecular dynamics. Simulations gave us a general look at behavior of all studied structures. Based on this and other measured data (RMSd, dihedrals, B-factor) the structures were analyzed.</p>
<b>Keywords</b>	Twister ribozyme, molecular dynamics, ribozyme
<b>Number of pages</b>	49
<b>Language</b>	Czech

## **Poděkování**

Tímto bych chtěla velmi poděkovat doc. Mgr. Pavlu Banášovi, Ph.D. za veškerou pomoc a cenné rady, které byly velkým přínosem. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Petře Kührové, Ph.D. za vstřícný přístup, neuvěřitelnou trpělivost a ochotu při řešení veškerých problémů, po celou dobu vzniku této práce.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením doc. Mgr. Pavla Banáše, PhD. a výhradě s použitím svých vědomostí a citovaných zdrojů.

V Olomouci dne: .....

.....

Podpis

## Obsah

1	ÚVOD.....	6
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	7
2.1	RNA.....	7
2.1.1	Struktura RNA.....	7
2.1.2	Funkce RNA.....	9
2.2	Ribozym.....	11
2.2.1	Mechanismus fungování ribozymů.....	11
2.2.2	Typy ribozymů.....	13
2.3	Twister ribozym.....	14
2.3.1	Struktura.....	14
2.3.2	Aktivita.....	16
2.3.3	OJI.....	17
2.3.4	RGE.....	18
2.3.5	QJH.....	19
2.4	Počítačové simulace.....	21
2.4.1	Molekulární dynamika.....	21
2.4.2	Potenciální energie.....	22
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	24
3.1	Metody.....	24
3.2	Výsledky a diskuze.....	25
3.2.1	OJI.....	25
3.2.2	OJI_DU.....	28
3.2.3	RGE.....	31
3.2.4	RGE_DU.....	34
3.2.5	QJH.....	37
3.2.6	QJH_DU.....	40
4	ZÁVĚR.....	44
5	SUMMARY.....	46
6	BIBLIOGRAFIE.....	48

# 1 ÚVOD

RNA se řadí mezi biomakromolekuly, které jsou složeny nejčastěji z jednoho polynukleotidového vlákna. V současnosti je známo mnoho druhů RNA, jejichž funkce v buňce jsou odlišné. Od dob objevu RNA byl v oblasti studia jejich vlastností a mechanismů pomocí experimentálních i teoretických metod učiněn velký pokrok. Ribonukleové enzymy – ribozymy, ačkoliv jsou méně četné než proteinové enzymy, byly pravděpodobně prvními katalyzátory v živé hmotě. Ribozymy mají schopnost katalyzovat množství biochemických reakcí a také své vlastní štěpení. Příkladem takového ribozymu je Twister ribozym.

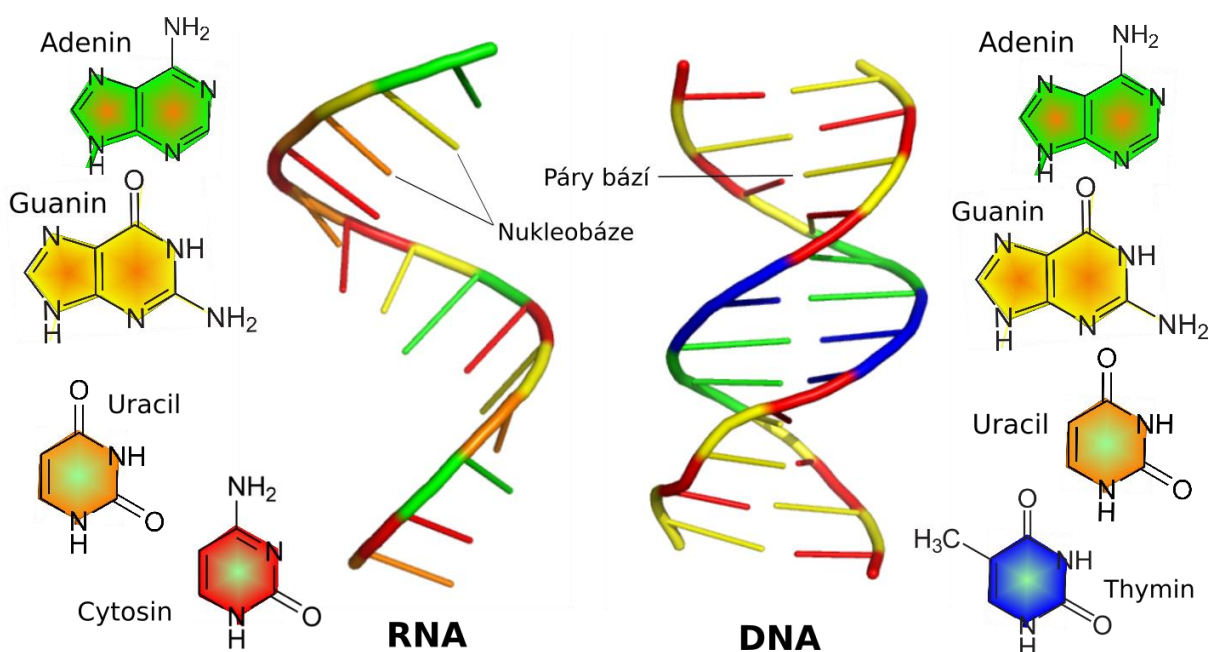
Twister ribozym je RNA molekula schopná katalyzovat své vlastní štěpení. Poprvé byl izolován z rýže, ale vyskytuje se i v jiných eukaryotických organismech a bakteriích. Jedná se o poměrně malou, ale komplexní strukturu, obecně tvořenou třemi stemy a dvěma pseudouzly, které mají důležitou strukturní roli. V centru těchto uzlů je nachází nejdůležitější část ribozymu – aktivní místo.

V současné době jsou ke studiu problémů na molekulové úrovni v různých oblastech od fyziky, biologie až po chemii hojně využívány výpočetní metody. Díky rychlému vývoji počítačové techniky lze studovat chování a stabilitu biomolekul na atomární úrovni na mikrosekundových časových škálách. Předložená bakalářská práce se zabývá studiem flexibility a stability Twister ribozymu pomocí nástrojů výpočetní chemie. V rámci práce je také diskutována kvalita různých krystalových struktur Twister ribozymu.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 RNA

Ribonukleová kyselina – RNA je makromolekula tvořena polynukleotidovým řetězcem obsahujícím čtyři opakující se báze: adenin, uracil, cytosin a guanin. (Obr. 1) Báze se kanonicky komplementárně párují vždy stejným způsobem – A-U a C-G, nicméně RNA hojně využívá i nekanonického párování, viz níže. Tyto báze se váží na cukernou jednotku ribózu. Řetězec je pak vytvořen spojením ribóz pomocí fosfátových skupin.



**Obrázek 1** Schéma porovnává strukturu jednořetězcové RNA (vlevo) a dvoušroubovici DNA (vpravo). Po stranách jsou zobrazeny jednotlivé báze, které tvoří danou strukturu. Ze schématu je patrné, že thymin je u RNA nahrazen uracilem.

Hlavním rozdílem mezi RNA a DNA molekulou je přítomnost hydroxylové skupiny. V DNA po Watson–Crick párování nezůstává žádný donor protonu, zatímco v RNA má donor i akceptory, což má za následek strukturní variabilitu této molekuly.

#### 2.1.1 Struktura RNA

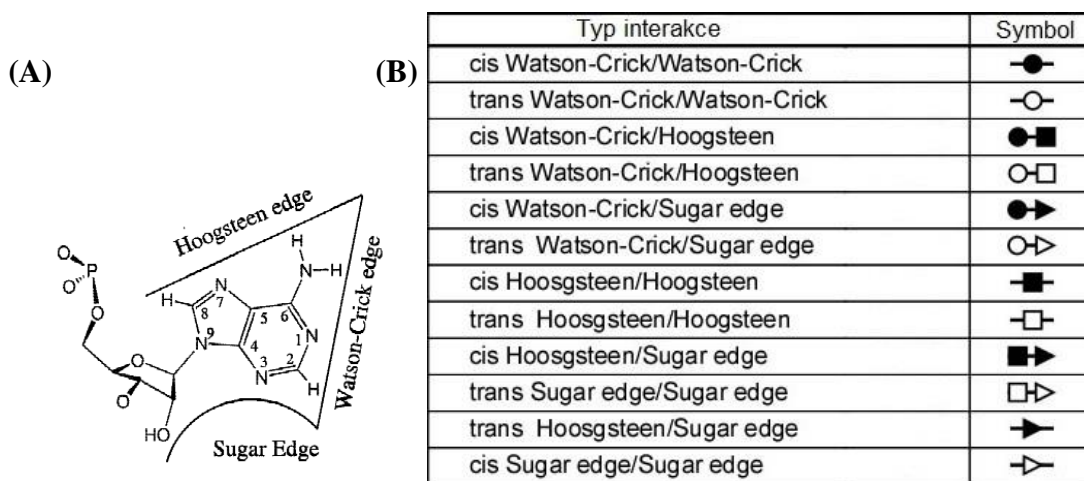
Základní stavební jednotkou RNA je nukleotid. Ten obsahuje nukleosid tvořený bází a cukernou jednotkou, které jsou spojeny N-glykosidovou vazbou k dusíku purinového nebo pyrimidinového kruhu. Je-li na nukleosid do polohy C5' navázána fosfátová skupina tato



jednotka se označuje jako nukleotid. Nukleotidy se pojí diesterovou vazbou v pozici 5' a 3' a vytváří tak polynukleotidové řetězce.

Primární struktura RNA je dána pořadím bází a vždy se zapisuje ve směru od 5' konce k 3' konci. Všem molekulám RNA lze přiřadit primární strukturu, která jednoznačně definuje jejich chemické složení. Pro funkci RNA je ale důležité i prostorové uspořádání, které je popsáno sekundární a terciární strukturou a které vede ke zvýšení stability molekuly a přizpůsobení vnějším podmínkám.[1]

Sekundární struktura odkazuje na interakce mezi páry bází, které jsou reprezentovány jako seznam bází, jež jsou spárovány v molekule nukleové kyseliny.[2] Báze mohou kromě kanonického párování interagovat i nekanonicky pomocí tří hran (edge), které u nich rozlišujeme. Hoogsteenovy (H) hrany, Watson-Crickovy (WC) a cukerné hrany (Sugar edge, SE, viz obr. 2) Báze spolu mohou interagovat pomocí různých kombinací hran, celkem může tedy vzniknout 12 různých typů nekanonických párů. Kromě interakcí je také zohledněna vzájemná orientace glykosidických vazeb bází v páru, čímž rozlišujeme konformace *trans* nebo *cis*. [3] Pro kombinace interagujících hran bylo zavedeno značení (Obr. 2).



**Obrázek 2** (A) Hrany báze, které mohou interagovat. (B) Tabulka symbolů používaných pro označení nekanonicky párovaných bází. Obrázky byly převzaty z článku [3] a upraveny.

V sekundární struktuře jsou zvláště patrné rozdíly mezi DNA a RNA. DNA se nejčastěji skládá ze dvou paralelních vláken a v přirozeném stavu zaujímá formu dvoušroubovice. V průběhu specifických pochodů metabolismu nukleových kyselin nebo v oblasti určitých sekvencí se mohou vyskytovat méně typické sekundární struktury DNA. Konkrétní strukturu

jak u DNA, tak u RNA ovlivňuje hlavně iontová síla daného prostředí. Sekundární struktura u molekul RNA nemá význam pouze termodynamický, ale také funkční. Znalost RNA struktury je stěžejní pro porozumění katalýzy nukleolytických enzymů. Molekula RNA musí zaujmout správnou sekundární strukturu, aby byla v katalyticky aktivní konformaci, ve které dochází ke štěpení. V katalyticky aktivní konformaci u ribozymů jsou residua okolo aktivního místa situována tak, že pomocí obecné acidobazické katalýzy může dojít k rozštěpení cukr-fosfátové kostry. V aktivním místě se v tomto případě akceptor protonu (obecná báze) vyskytuje v blízkosti 2'-OH skupiny ribózy a donor protonu (obecná kyselina) je u odstupujícího negativně nabitého O5' kyslíku v terminálním postavení vůči cyklizujícímu se fosfátu. Správná sekundární struktura tedy v aktivním místě umožňuje protonový transfer a má klíčový význam zvláště tam, kde jako obecná báze a kyselina vystupují nukleotidy řetězce, které v primární struktuře bývají spíše vzdálené od štěpného dinukleotidu aktivního místa. Toto je také případ nukleolytických ribozymů a tedy i Twister ribozymu.

Terciární struktura je definována jako prostorové uspořádání polynukleotidového řetězce. Ve většině případů tato struktura závisí na nekovalentních interakcích a často se zde jako stabilizační prvky uplatňují kationty kovů (zejména  $Mg^{2+}$  a  $Na^+$ ). Ty kompenzují negativně nabitě cukr-fosfátové kostry molekuly RNA tím, že tlumí elektrostatické repulzní síly mezi negativními náboji řetězců, které by jinak nedovolily vznik potřebné terciální struktury.

### **2.1.2 Funkce RNA**

Za jednu z hlavních funkcí RNA je považována transkripce (přepis) genetické informace z DNA a její translace (překlad) na příslušný protein. Tento proces je realizován přes různé druhy RNA z nich každá má svou funkci. Mimo jiné pak může ribonukleová kyselina plnit katalytickou (či autokatalytickou) funkci nebo sloužit k uložení vlastní genetické informace, jak je tomu u RNA virů.

Během transkripce vzniká v buněčném jádře mRNA (messenger RNA). Při tomto procesu slouží gen v DNA jako šablona pro párování bází a enzym RNA polymeráza katalyzuje tvorbu molekul pre-mRNA. Ty jsou na konečnou mRNA přeměněny během posttranskripční modifikace, která je souborem procesů probíhajících u eukaryot po přepisu DNA do RNA. Pre-mRNA prochází třemi úpravami a to přidáním 7-methylguanointrifosfátové čepičky na 5' konec, vytvořením poly (A) konce na 3' konci

a nakonec sestříhem (splicingem). Při splicingu dochází k odstranění intronů, zatímco exony zůstávají.[4]

Výsledná mRNA je jednovláknová kopie genu a slouží jako předpis pro tvorbu bílkovin. U eukaryotických i prokaryotických organismů dochází k translaci na ribozomech, ovšem u prokaryotických organismů se ribozom může k mRNA připojit, zatímco ta je stále teprve přepisována. V této situaci začíná translace na 5' konci, kdy 3' konec je stále připojen k DNA.[5]

Translace je přenos genetického kódu z mRNA do pořadí aminokyselin v polypeptidovém vlákně. Tomuto procesu dopomáhá tRNA (transfer RNA), která připojuje specifickou aminokyselinu do rostoucího polypeptidového řetězce, čímž dochází k překladu sekvence nukleotidů v nukleových kyselinách do sekvence aminokyselin v proteinech. Genetický kód je tripletový, tudíž každá trojice bází kóduje určitou aminokyselinu. Zvláštní význam má triplet AUG, který proteosyntézu zahajuje a triplety UAA, UAG a UGA, které ji naopak ukončují. Výsledné polypeptidové vlákno je v buňce dále upravováno a to buď na čistý protein, nebo častěji glykoprotein.[6]

Z hlediska proteosyntézy je nejdůležitější rRNA (ribosomal RNA). Je to nejčastěji zastoupená molekula RNA v buňce a má významnou stavební funkci, jelikož z velké části tvoří ribozom a také je zodpovědná za jeho katalytickou aktivitu, jelikož jak rozpoznání správné kodon-antikodonové interakce, tak spojování aminokyselin je výhradně zajišťováno rRNA molekulami a těchto procesů se přímo neúčastní žádný protein.[7]

Kromě rRNA a tRNA existuje v eukaryotických buňkách celá řada dalších tzv. nekódujících RNA. Tyto molekuly jsou často nápomocny při buněčných procesech. Souborně jsou tyto molekuly označovány jako malé regulační RNA (sRNAs) a u eukaryot se dále dělí na několik podkategorií. Společně tyto různé regulační RNA uplatňují své účinky např. prostřednictvím kombinace komplementárního párování bází nebo jejich vlastní enzymatickou aktivitou.[8] RNA s vlastní enzymatickou (specifickou, katalytickou) aktivitou jsou označovány jako ribozymy. Podle definice mohou tyto molekuly zahájit svou aktivitu bez pomoci dalších proteinových složek.[9]

## 2.2 Ribozym

Molekuly RNA stejně jako proteiny se skládají do stabilních terciálních struktur a někdy mají schopnost biologické katalýzy.[10] Ribozymy, tj. katalyticky aktivní RNA čili RNA enzymy byly objeveny v roce 1982 a Thomas R. Cech a Sidney Altman byli o sedm let později za tento objev odměněni Nobelovou cenou. Tuto katalytickou RNA lze nalézt při mnoha biologických procesech jako splicing (sestřih), translace nebo genová regulace[11]. Je to nekódující RNA, která katalyzuje chemické transformace s rychlostí blížíící se rychlosti proteinových enzymů. Ačkoliv je pravděpodobné, že ribozymů bylo během RNA éry světa hojné množství, v současných organismech je známa existence pouze deseti tříd.

### 2.2.1 Mechanismus fungování ribozymů

Představa, že by RNA mohla mít katalytické vlastnosti, byla zprvu překvapující, vzhledem k tomu, že postrádá rozmanitost funkčních skupin, které jsou typické pro proteinové enzymy. Kromě toho v RNA jsou jedinečné chemické skupiny umístěny z velké části na vnitřní straně duplexu, zatímco proteiny mají aminokyselinové postranní řetězce na vnější straně svých sekundárních struktur, tudíž v optimální poloze pro vznik terciálních kontaktů. Díky omezenému počtu bází, které jsou k dispozici pro terciální kontakty, vysoké hustotě negativních nábojů a flexibilitě fosfátové páteře bylo vytváření terciálních struktur u RNA považováno za velmi komplikované.

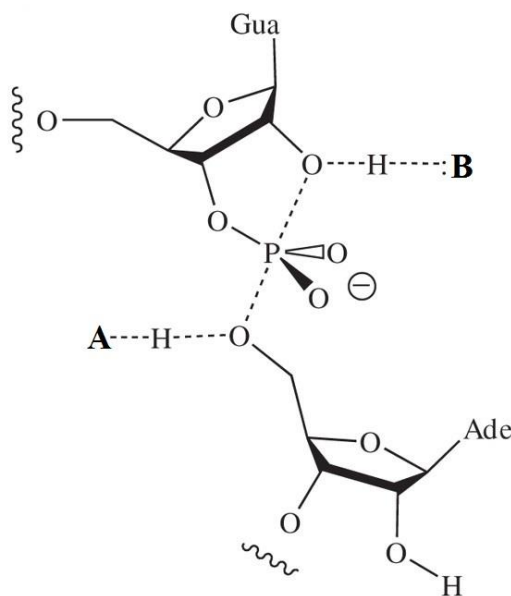
Struktura proteinů je založena na elektroneutrální páteři s vedlejšími řetězci, které obsahují např. karboxylové kyseliny, aminy, hydroxyly, thiolové skupiny nebo také postranní hydrofobní řetězce, které mohou být buď alifatické, nebo aromatické. RNA se oproti tomu skládá z nukleotidových bází, které jsou podobné chemické povahy, spojených elektricky nabitou ribózo-fosfátovou kostrou. Otázkou tedy zůstává, co způsobuje, že RNA může být katalyticky aktivní.

Jako polyelektrolyt může RNA tvořit specifická vazebná místa kovových iontů nebo kapsy, které mají vysokou obsazenost vázaných iontů. Kovové ionty mohou aktivovat nukleofily, stabilizovat velmi záporně nabitý přechodný stav během štěpení ribózofosfátové kostry nebo neutralizovat náboje koncových skupin. Nukleobáze také obsahují donory a akceptory vodíkové vazby a mohou být tudíž použity pro navázání substrátu nebo ke

stabilizaci tranzitního stavu. Mohou se také chovat jako obecné zásady nebo kyseliny ačkoliv hodnoty jejich  $pK_a$  na první pohled nejsou ideální pro tuto roli při neutrálním pH.

Skupina větších ribozymů (např. RNasa P, samo-štěpící introny) se štěpí pomocí externího nukleofilního ataku, přičemž dochází k využití většinou dvou iontů hydratovaného kovu, často  $Mg^{2+}$ . Jeden hydratovaný hořečnatý ion se koordinuje na útočící nukleofil, zatímco druhý na opouštějící skupinu. Produktem štěpení velkých ribozymů je RNA s volným 3'-hydroxylem a na druhém konci 5'-fosfátem. Řada intronů je automaticky vystřihována díky aktivitě ribozymů, která je iniciována buď atakem 2' hydroxylové skupiny nacházející se v intronu (u intronů skupiny II) [12] nebo molekulou guanosinu (introny skupiny I) [13].

Malé samo-štěpící neboli nukleolytické ribozymy umožňují místně specifické štěpení své ribózo-fosfátové páteře a také reverzní reakci, tedy ligaci této kostry. Tato reakce funguje podle  $S_N2$  mechanismu. Aktivovaná 2' hydroxylová skupina atakuje fosfátovou skupinu vedlejšího nukleotidu. Při této reakci se řetězec rozštěpí na dvě menší RNA, z nichž jedna nese 2',3'-cyklický fosfát a druhá 5'-hydroxyl. Tato reakce probíhá například při zpracování meziproductů replikace nebo při regulaci genové exprese.



**Obrázek 3** Schéma obecné acidobazické katalýzy pro nukleolytické ribozymy (zde Varkud Satelit ribozym - VS) kdy se při štěpení B chová jako obecná zásada, která deprotonuje nukleofil, zatímco A dodává proton opouštějící skupině a vystupuje tedy v roli obecné kyseliny. Při ligaci dochází k výměně rolí. Obrázek byl převzat z článku. [14]

Je velmi pravděpodobné, že VS a hairpin ribozym mají podobné mechanismy i přesto, že jejich obecná struktura je rozdílná. Aktivní místa obou ribozymů jsou vytvořena interakcí smyčka-smyčka (loop-loop) a v obou případech se aktivní guanin nachází na protilehlém vlákně vnitřní smyčky, která nese štěpný fosfát, zatímco aktivní adenin je zajištěn druhou smyčkou.[15]

Ribozym viru hepatitidy D na rozdíl od ostatních samo-štěpících ribozymů používá  $Mg^{2+}$  a na něj koordinovanou vodu jako obecné zásady k aktivaci nukleofilu popř. iontu samotného jako Lewisovy kyseliny stabilizující tranzitní stav a protonovaného cytosinu jako obecné kyseliny.[16], [17]. HDV ribozym je tedy typický příklad, kdy ribozym využívá místně vázaných iontů kovu. Většina zástupců skupiny nukleolytických ribozymů je však plně aktivní při vysokých koncentracích jednomocných kovových iontů [18], takže přímá účast vázaného kovového iontu jako Lewisovy kyseliny nebo jeho účast při obecné acido-bazické katalýze je málo pravděpodobná.

### 2.2.2 Typy ribozymů

Ribozymy se často dělí do dvou skupin. Do první skupiny patří velké ribozymy, jako jsou například introny skupiny I a II nebo ribonukleáza P (RNase P). Jsou velké několik set nukleotidů a strukturně komplexní. U těchto velkých ribozymů jsou nukleofil a štěpný fosfát umístěny v odlišných molekulách nebo jsou výrazně odděleny v sekvenci. Složitá topologie těchto RNA tedy vlastně slouží k orientaci nukleofilu a fosfátu tak, aby došlo k přesnému štěpení případně sestřihu.

RNase P katalyzuje tvorbu funkční RNA hydrolýzou pre-tRNA. Vyskytuje se v bakteriích, eukaryotech i v lidském organismu. Katalytická aktivita tohoto ribozymu je ovlivněna přítomností kovových iontů.  $Mg^{2+}$  jsou přímými účastníky katalýzy, přičemž se chovají jako Lewisova kyselina, tedy aktivují nukleofilní skupinu a neutralizují vznikající záporné náboje.

Menší ribozymy tvoří další hlavní skupinu katalytických RNA molekul. V přírodě se vyskytující zástupci této skupiny jsou např. ribozym viru hepatitidy D (HDV), Hammerhead, Hairpin, VS nebo ribozym glmS riboswitch. Velikost těchto molekul se většinou pohybuje od 50 do 150 nukleotidů. Jejich jedinou funkcí je vykonávat fosfodiesterovou samo-štěpící reakci.

Hammerhead, Hairpin a HDV ribozymy jsou součástí větší cirkulární RNA molekuly, která je pak replikována RNA-polymerázami hostitele. Produkt této replikace se dále štěpí vlivem účinků aktivity ribozymů na jednotlivé monomerní molekuly RNA, které mohou být poté opětovně díky aktivitě ribozymu spojovány do cirkulární podoby. Hammerhead ribozym nese svůj název podle své sekundární struktury, která má tvar kladiva. Podobně sekundární struktura Hairpin ribozymu připomíná vlásenky, odtud tedy „vlásenkový“ Hairpin ribozym.

Původně byly Hammerhead ribozymy objeveny v rostlinných patogenech, kde se účastnily procesů zpracování meziproductů replikace a později bylo zjištěno, že mají význam při regulaci genové exprese v bakteriích. Záhy však bylo jasné, že sekvence ribozymů jsou rozšířené ve velkém množství genomů, silně konzervované uvnitř buněk. Rodiny HDV ribozymu, tedy velmi podobné sekvence se stejnou funkcí a Hammerhead ribozymu byly objeveny v mnoha eukaryotických druzích včetně lidského organismu. Jejich umístění indikuje, že jsou aktivní *in vivo*.

## 2.3 Twister ribozym

Twister je relativně novým členem skupiny nukleolytických ribozymů. Tento název označuje asi 2 700 zástupců, rozšířených od bakterií přes houby a rostliny až k živočichům včetně hmyzu a ryb. Běžně se vyskytuje např. v bakteriální třídě *Clostridia*. Má podobný genetický kontext jako Hammerhead ribozym a tudíž se předpokládá, že by mohly být funkčně zaměnitelné. [19] Tento ribozym vykazuje aktivitu *in vivo* i *in vitro* s rychlostí štěpení srovnatelnou s rychlostmi ostatních nukleolytických ribozymů, tj. řádově jednotky  $\text{min}^{-1}$ . Díky rozdělení a aktivitě těchto nekódujících sekvencí, předpokládáme jejich roli v genetické regulaci. Twister ribozym dostal svůj název na základě podobnosti s egyptským hieroglyfem svinutého lana (anglicky twisted flax).

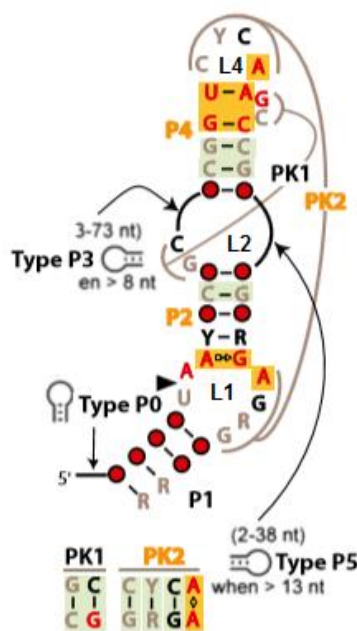
### 2.3.1 Struktura

Pro Twister ribozym byla po nalezení sekvence předpovězena 2D struktura. Twister má komplexní sekvenci, obecně složenou ze tří duplexů, které jsou spojeny interní smyčkou a zakončené smyčkou terminální (Obr. 4). Místo štěpení se nachází uvnitř smyčky L1, jeden nukleotid na 5' straně od P1 duplexu (Obr. 4). Struktura obsahuje celkem 10 nukleotidů s konzervací větší než 97%. Tyto nukleotidy jsou obsaženy v L4 a L1 (viz Obr. 4).[20]

U většiny těchto ribozymů existuje také přídatný stem-loop (duplex-smyčka) P3 mezi T2 a P4 a méně často se objevuje ještě další stem-loop P5 připojený k 3' straně L2.

Pro katalytickou aktivitu Twisteru je zásadní přítomnost dvou pseudouzlů v terciální struktuře molekuly, které tuto strukturu stabilizují. Fungují jako pilíře aktivního místa, protože tvoří část jeho stěn a pomáhají s umístěním nukleotidů důležitých pro katalýzu. Pseudouzlel 1 (na obr. 4 označen jako PK1) má podle předpokladů dva páry bází, zatímco pseudouzlel 2 (na obr. 4 označen jako PK2) má tři. (viz Obr. 4)

Osm vysoce konzervovaných nukleobází stabilizuje jádro ribozymu díky formaci jednoho Watson-Crickova a tří nekanonických párů bází. Vysoce konzervovaný adenin na 3' straně štěpného fosfátu je navázán ve velkém žlábkku sousedního pseudouzlu a silně konzervovaný guanin na 5' straně štěpného fosfátu směřuje svou Watson-Crickovu hranu směrem ke štípanému fosfátu. Biochemické experimenty podporují teorii o roli tohoto guaninu jako obecné báze nebo kyseliny v koordinované obecné acido-bazické katalýze. V případě Twister ribozymu se vyskytuje také určité množství hořčnatých iontů, jejichž koncentrace ovlivňuje reakční rychlost, ovšem pro katalytickou aktivitu nejsou tyto ionty nezbytné.



**Obrázek 4** Detailní model sekundární struktury založený na velkém množství Twister ribozymů znázorněných v P1 typu konfigurace, ve kterém řetězec RNA začíná a končí na spodní části P1 duplexu. Černá šipka značí místo štěpení. Šedé, černé a červené nukleotidy



(nt) značí konzervaci nukleotidů alespoň ze 75 %, 90 % a 97 %. Pozice, ve kterých jsou nukleotidy méně konzervované (<75 %), jsou označeny červenými kolečky. Zelený a oranžový podklad označuje předpokládané páry bází, podpořené přírodní kovariancí. Pseudouzly jsou pak označeny PK1 a PK2. Písmena R a Y značí purinovou nebo pyrimidinovou bázi.

### 2.3.2 Aktivita

Jako u ostatních nukleolytických ribozymů, i u Twisteru probíhá reakce podle  $S_N2$  mechanismu za vzniku 2'3'-cyklického fosfátu a 5'-OH. Aby byla katalýza účinná, musí dojít k aktivaci 2'-OH nukleofilu a stabilizaci (protonaci) odcházející skupiny. Mechanismus samoštěpení malých nukleolytických ribozymů nebyl dosud kompletně pochopen. V principu existují dva hlavní způsoby katalýzy fosforyl-transferové reakce. Použití obecné acido-bazické katalýzy nebo katalýzy kovovými ionty. RNA enzymy jsou na podobném principu rozděleny do dvou skupin. Samoštěpící introny a RNasa P se chovají se jako metaloenzymy a nukleolytické ribozymy jak se zdá používají obecnou acido-bazickou katalýzu. Co se týče druhé skupiny, detailní mechanismus katalýzy a zúčastněné funkční skupiny jsou zatím poměrně neprobádané. Všechny však používají jednu nebo více nukleobází a do těchto mechanismů jsou také u všech ribozymů kromě HDV zahrnuty guaniny. [21]

Twister ribozym vykazuje aktivitu *in vivo* i *in vitro*. Pro potvrzení aktivity *in vitro* byla vygenerována konstrukce biomolekul různých reprezentativních Twister ribozymů a sledováno štěpení „substrátu“ RNA v přítomnosti vhodného „enzymu“ RNA. Biomolekulární ribozymový komplex byl vytvořen tak, aby odpovídal Twister RNA z parazitických vos *Nasonia vitripennis*. Výsledná substrátová doména byla rychle štěpena pouze v přítomnosti enzymové domény a hořečnatých iontů. Reakce dala vzniknout 5' štěpnému produktu s koncovým 2'3'-cyklickým fosfátem a 3' štěpným produktem s 5'-OH skupinou. Díky *in vitro* aktivitě bylo prokázáno, že některé z konzervovaných nukleotidů jsou nutné pro schopnost samo štěpení tohoto ribozymu.

Produkty tohoto pokusného štěpení byly konzistentní s těmi, očekávanými ze štěpení pomocí vnitřního fosfoesterového přenosu díky ataku 2' kyslíku z U5 na sousední atom fosforu s následným odchodem 5' kyslíku z A6. Tento obecný mechanismus pro Twister katalýzu je identický s tím, který probíhá u členů zbylých pěti skupin samo štěpících ribozymů objevených dříve. [19] Ribozymy používající tento mechanismus nevykazovaly

žádné produkty, pokud nukleotid korespondující k U5 substrátu postrádal 2' kyslíkový nukleofil.

Existují čtyři hlavní katalytické postupy, které mohou být použity RNA enzymy při štěpení vnitřním fosfoesterovým přenosem. Je to orientování reaktivních atomů pro in-line nukleofilní atak ( $\alpha$ ), neutralizování negativního náboje na nemůstkovém kyslíku na štěpném fosfátu ( $\beta$ ), deprotonace 2' kyslíku nukleofilu ( $\gamma$ ), neutralizace vznikajícího negativního náboje na 5' kyslíku odcházející skupiny ( $\delta$ ). Twister ribozym musí využívat  $\alpha$  proces aby došlo k orientaci vznikajících a zanikajících vazeb pro nukleofilní in-line atak. Většina RNA-štěpících ribozymů a deoxyribozymů vytvořených přímou evolucí používá pouze kombinaci  $\alpha$  a  $\gamma$ . Avšak enzymy používající pouze tyto dvě strategie mají daleko nižší rychlost katalýzy. U Twisteru se tedy předpokládá, že využívá více možností, než jen  $\alpha$  a  $\gamma$  nebo že využívá jinou kombinaci dvou nebo více možných strategií pro dosažení tak vysoké katalytické rychlosti.

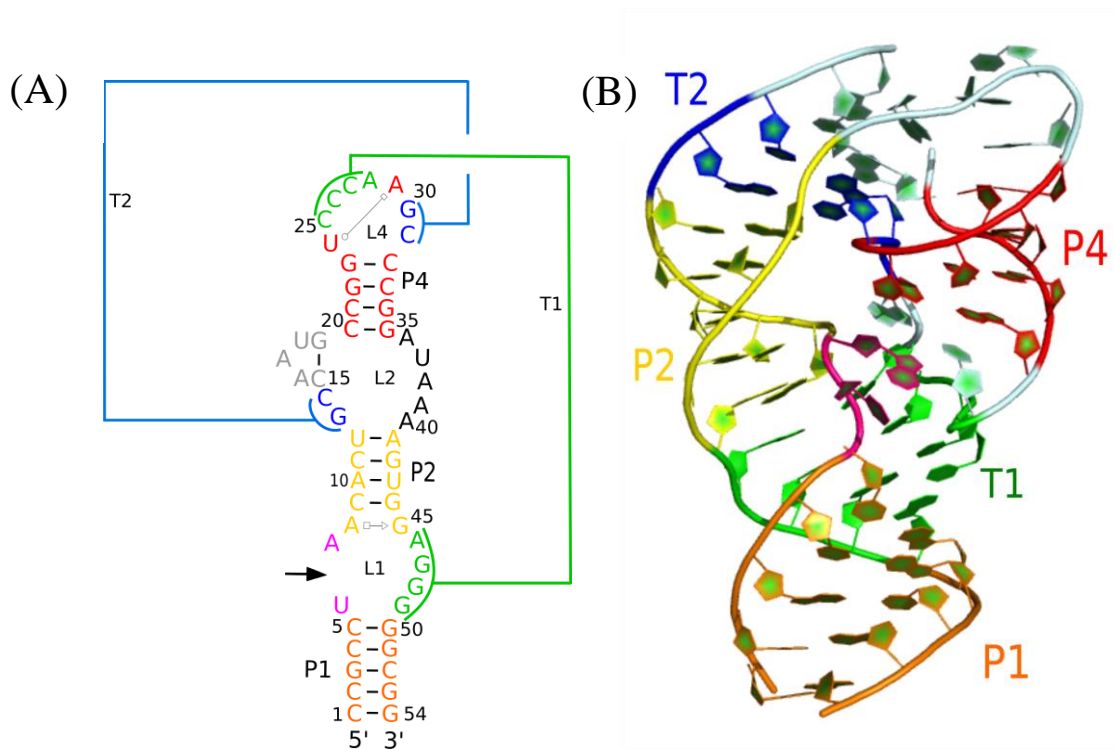
Experimentálně bylo zjištěno, že mutace vysoce konzervovaných nukleotidů snižuje aktivitu štěpení. Narušení interakcí párů bází individuálně v P1, P2, P4 a ve dvou pseudouzlech vyústí v redukci štěpení. Díky tomuto a dalším poznatkům bylo zjištěno, že uspořádání předpovězených duplexů je kritické pro ribozomální aktivitu, zatímco přesné sekvence těchto substruktur jsou v podstatě méně důležité.

### 2.3.3 4OJI

Struktura 4OJI (PDB ID: 4OJI) je poměrně konzistentní s navrhovanou sekundární strukturou. Terminální smyčka L4 se podílí na dvou terciárních interakcích opačné polarity s L1 a L2, kdy dochází ke generaci helixů T1 a T2 tak, aby finální struktura obsahovala dva pseudouzly (Obr. 5). Helixy P1, T1, P2 a T2 jsou koaxiálně spojeny, ačkoliv je hodnota twistu mezi helixy P1 a T1 vysoká. Páry bází formované mezi A28 a A46 (*trans* Watson-Crick) a A8 a G45 (*cis* Hoogsteen-sugar edge) jsou umístěny koaxiálně mezi T1 a P2.

Štěpný fosfát spojující dU6 a A7 a tedy aktivní místo ribozymu leží přímo v centru RNA struktury. Domodelovaný atom O2' na dU6 se odchyluje  $\sim 90^\circ$  z in-line orientace O2' nukleofilu, P a O5' opouštějící skupiny. Pro aktivitu by byla optimální přímá orientace těchto atomů s úhlem nad cca.  $140^\circ$ , tudíž tohle nemůže být aktivní geometrie. Struktura však pro toto poskytuje vysvětlení. dU6 v tomto ribozymu nevstupuje do žádné intramolekulární

interakce, ovšem jeho atom O4 přijímá vodíkovou vazbu od G23 N2 ze symetricky příbuzné molekuly ribozymu v krystalové mřížce. Vytlačení dU6 z centra ribozymu je v podstatě pozůstatek krystalizace anebo může být výsledkem použití deoxyribonukleotidu, aby se v experimentu předešlo štěpení.[21]



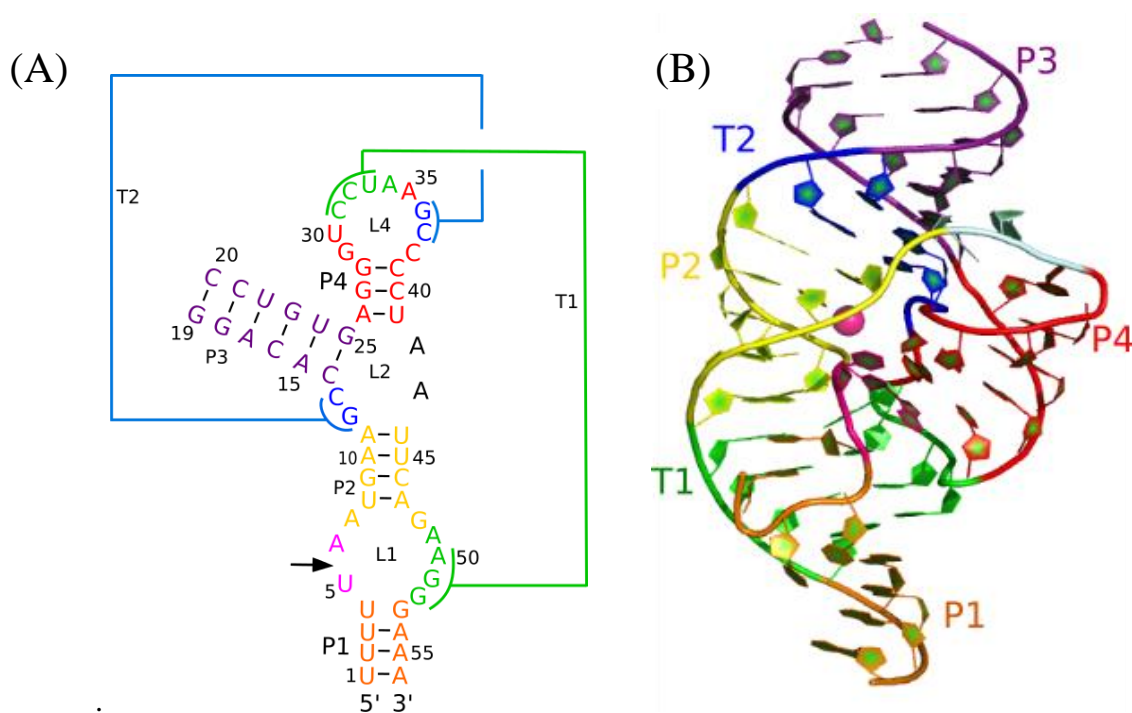
**Obrázek 5** (A) Stuktura OJI. Barevně jsou odlišeny stemy P1,P2, P4 a pseudouzly T1 a T2. Šipka označuje místo, kde dochází ke štěpení. (B) 3D struktura ribozymu barevně korespondující s obrázkem A. Růžově je v centru struktury vyznačeno aktivní místo. Tyrkysově zabarvené části značí místa, kde se příležitostně vyskytují stemy 3 a 5.

### 2.3.4 4RGE

Struktura 4RGE (PDB ID: 4RGE) byla vykrystalizována z uměle připravené RNA vytvořené spojením dvou chemicky syntetizovaných RNA vláken. [22] Kratší obsahuje 19 reziduí a obsahuje dU5 v U5-A6 místě štěpení. Delší vlákno je dlouhé 37 reziduí. Ve struktuře se vyskytují báze, které mají rozevřenou konformaci, můžeme ji pozorovat u A4-U5, U5-A6 (místo štěpení), A6-A7 a dalších. Pár bází U5-A6 má prodlouženou rozevřenou konformaci s hranami bází ukotvenými na každém konci vodíkovou vazbou k fosfátové páteři. Báze A6 je stabilizována díky patrové interakci s vysoce konzervovaným nekanonickým *trans* WCH U30-A35 párem bází, zatímco jeho 2'-OH skupina je pomocí vodíkové vazby připojena k N3 atomu vysoce konzervovaného A34 (Obr. 6). Báze a cukr vysoce konzervovaného A6 jsou

na místě udržovány pomocí patrových interakcí a vodíkových vazeb. U5, který není konzervovaný, naproti tomu nevykazuje žádné takovéto interakce. Geometrie cukru je C2'-endo pro A6 a C3'-endo pro U5.

V blízkosti místa štěpení se ve struktuře objevují hořčičnaté kationty, které pravděpodobně přispívají k jeho strukturální integritě. Báze C46 a A47 směřují k O2' z U5, A47 a G48 směřují k U5-A6 místu a U8 směrem k Mg<sup>2+</sup>. Pro tyto nukleosidy byl pozorován různý vliv mutací. Mutace báze č. 8 (viz Obr. 6) byly tolerované. Pokud došlo k mutaci bází č. 46 a 47, výsledkem bylo snížení katalytické aktivity a v případě báze č. 48 byla mutace fatální pro celou strukturu, což umocňuje roli G48 coby klíčového rezidua v katalytickém mechanismu Twister ribozymu. [22]



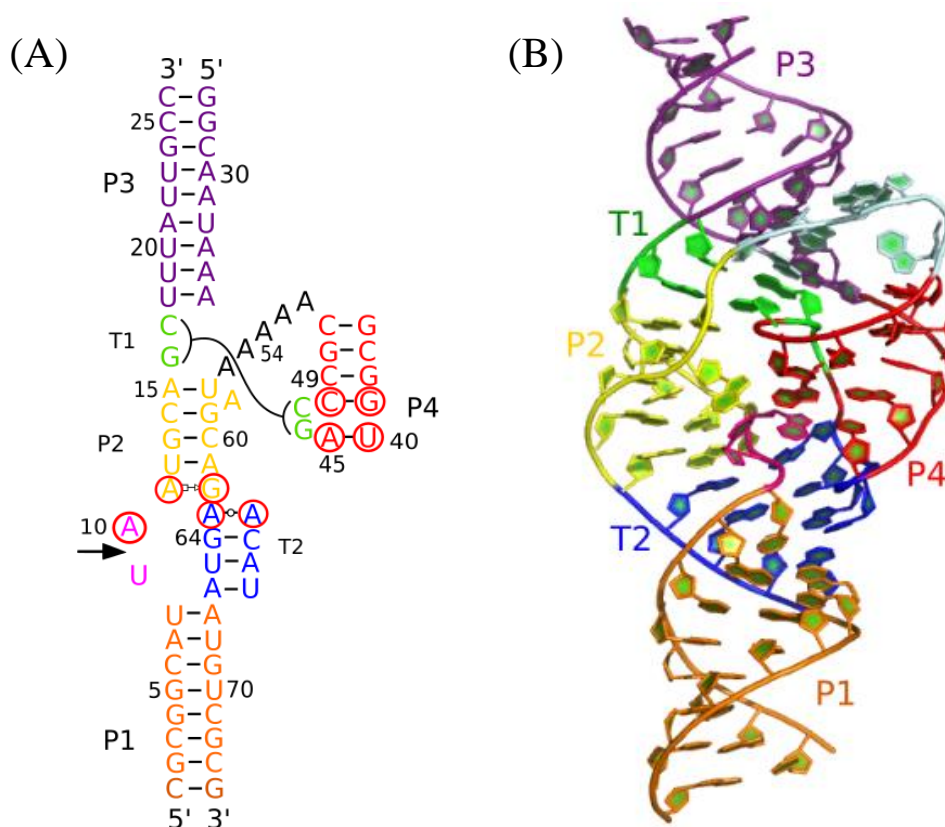
**Obrázek 6** (A) Struktura RGE. Barevně jsou odlišeny stemy P1,P2,P3,P4 a pseudouzly T1 a T2. Šipka označuje místo, kde dochází ke štěpení. (B) 3D struktura ribozymu barevně korespondující s obrázkem A. Ve středu struktury je Mg<sup>2+</sup> ion (ružová kulička), který se nachází v blízkosti aktivního místa.

### 2.3.5 4QJH

Struktura 4QJH (PDB ID: 4QJH) je tvořena P1, P2, P3 a P4 stemy, dvěma pseudouzly a sítí patrových interakcí. P1 duplex vytváří platformu aktivního místa a má proměnlivou délku. V této struktuře je P1 stem tvořen 8 páry bází a vytváří stabilní helix. Helix P2 je vklíněn

mezi aktivním místem a pseudouzlem 2 (PK2) na jedné straně, a pseudouzlem 1 (PK1) a pěti adenosiny, které nahrazují P5 duplex, na straně druhé. Jakékoliv odebrání nebo naopak přidání párů bází může výrazně narušit formaci aktivního místa. P4 stem je tvořen pěti vazebnými páry. Vysoce konzervované nukleotidy G39 a C48 tvoří kanonické WC vazebné páry, zatímco nukleotidy U40 a A45 tvoří nekanonický pár bází. Tato interakce je kritická, protože dva nukleotidy mezi A45 a C48 zakřivují a formují polovinu PK1.

Mezi P4 a PK2 se na fosfodiesterové páteři nachází velmi ostrý přechod z pozice U40 v P4 do U41 v PK2. Úhly mezi fosfáty nukleotidů U40, U41 a A42 jsou zhruba  $44^\circ$ . To má za následek, že P4 duplex a PK2 jsou na sebe téměř kolmé. Toto spojení je stabilizováno vodíkovou vazbou mezi nemůstkovým kyslíkem z U41 a 2'-OH skupinou z U8, předposledního nukleotidu na 5' řetězci před místem štěpení. Zůstává však nejasné, jestli je ona vodíková vazba důležitá pro umístění a stabilizaci 5' nukleotidu do aktivního místa nebo ne, z důvodu příliš mnoha vodíkových vazeb v této oblasti. [20]



**Obrázek 7** (A) Struktura 4QJH. Stemy struktury P1, P2, P3, P4 a rovněž pseudouzly T1 a T2 jsou barevně odlišeny. Šipka mezi rezidui 9 a 10 označuje aktivní místo. Červené kroužky označují silně konzervované báze. (B) 3D struktura barevně koresponduje se zobrazením A. Pět adenosinů nahrazujících P5 stem je zobrazeno tyrkysově.

## 2.4 Počítačové simulace

V dnešní době patří počítačové simulace mezi významnou metodu, díky které je možno porozumět struktuře a dynamice biomolekuly na atomární úrovni. Tyto znalosti jsou nutné pro pochopení toho, jak RNA molekuly nesou svou biologickou funkci. V této bakalářské práci je používaným nástrojem teoretické chemie molekulární dynamika (MD). Ta slouží k získání informací o dynamickém chování molekuly Twister ribozymu v čase, a to v prostředí explicitního solventu. K popisu systému obsahujícího větší množství částic, jako je například protein nebo nukleová kyselina se používají různé statistické soubory. Soubory dělíme podle fyzikálních podmínek, kdy hlavním kritériem je, zda je systém popisován klasickou nebo kvantovou mechanikou. Systémy, které jsou popisovány pomocí klasické mechaniky, bývají méně technicky náročné a z toho vyplývá možnost počítat mnohem větší systémy než je možné u výpočtů kvantové mechaniky, nicméně za cenu aproximativního charakteru klasické mechaniky pro popis molekul.[23]

### 2.4.1 Molekulární dynamika

Molekulární dynamika umožňuje zachytit vývoj systému částic v čase podle zákonů mechaniky, tou je zde myšlena mechanika klasická. Ačkoliv by bylo ideální použít výpočty kvantové chemie nehledě na velikost systému, tato možnost vzhledem k náročnosti výpočtu není možná. Užívá se zde tedy zákonů klasické Newtonovské fyziky (zákon síly, zákon setrvačnosti, zákon akce a reakce).

Zjednodušitelný popis pomocí klasické mechaniky je nicméně do jisté míry obhajitelný. Důležitým zjednodušením je Born-Oppenheimerova aproximace, která je založena na skutečnosti, že atomová jádra jsou mnohem těžší než elektrony. Elektrony mohou být tedy považovány za částice velmi rychle následující pohyb jader. V důsledku oddělení dynamiky elektronů od jader lze popis elektronů zahrnout do efektivního potenciálu, v němž se pohybují atomová jádra, pro která již lze vzhledem k jejich hmotnosti použít rovnice klasické mechaniky. V molekulové dynamice se tedy absolutně zanedbávají elektrony a je řešen pouze pohyb celých atomů reprezentovaných jako koule v jistém efektivním poli. Tyto částice nesou parciální náboj umístěný v jejich středu. Jejich poloměr je reprezentován Van der Waalsovým potencionálem působícím mezi atomy a získaným z experimentálních hodnot. Energie celého systému je funkcí souřadnic jednotlivých atomů (Rovnice 1)

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

### 2.4.2 Potenciální energie

Při využití metody MM/MD se potenciální energie vyjadřuje parametricky. V programovém balíčku AMBER, který je používán pro výpočet trajektorií jsou ne vazebné interakce vyjadřovány pomocí VdW a elektrostatických (Coulombických) interakcí, zatímco vazebné jsou vyjádřeny funkcí délky vazeb, vazebnými a torzními úhly. Celková potenciální energie je poté vyjádřena jako suma všech vazebných i ne vazebných příspěvků (Rovnice 2).

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

Vypočítat jednotlivé příspěvky lze poměrně jednoduše a ve většině případů se jedná o jednoduché funkce. Energie vazeb a vazebných úhlů lze spočítat dle rovnic (3). Jedná se o závislost na druhé mocnině odchylky z rovnovážné polohy.

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

$E_{vazba}$  značí vazebný příspěvek,  $E_{úhel}$  vyjadřuje úhlový příspěvek k potenciální energii,  $r$  značí vazebnou vzdálenost,  $\alpha$  je vazebný úhel,  $r_0$  a  $\alpha_0$  jsou hodnotami ideální vazebné vzdálenosti nebo úhlu získána experimentálně nebo z kvantově chemických metod. Konstanty  $K_r$  a  $K_\alpha$  jsou vyjádřením tuhosti vazby a úhlů získané rovněž z kvantově chemických výpočtů nebo experimentu. V molekulární dynamice nelze pozorovat disociaci vazeb vzhledem k tomu, že se jedná o kvadratické funkce.

Energie torzních úhlů je vyjádřena složitěji a je stanovena jako superpozice několika funkcí (Rovnice 4). Torzní úhel mezi atomy i-j-k-l si lze představit jako úhel, který je svírá dvěma rovinami, rovinou definovanou atomy i-j-k s rovinou definovanou atomy j-k-l.

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

$E_{torze}$  znamená torzní příspěvek k potenciální energii,  $\phi_{n0}$  je fázový posun v n-té periodě a  $\phi$  je vazebná torze.  $E_n$  vyjadřuje výšku potenciální bariéry v n-té periodě přičemž  $n$  je perioda jedné harmonické složky.

Elektrostatické interakce jsou výsledkem vzájemného působení parciálních nábojů. Elektrostatickou energii, která je dalším příspěvkem k potenciální energii, lze vyjádřit Coulombovým zákonem, jako interakci dvou parciálních nábojů (Rovnice 5).

$$E_{Coulomb} = \sum_{i < j} \frac{q_i q_j}{4\pi \varepsilon_0 r_{ij}} \quad (5)$$

$E_{Coulomb}$  neboli energie elektrostatických sil má v čitateli součin parciálních nábojů atomů  $q_i q_j$  a ve jmenovateli pak permitivitu vakua  $\varepsilon_0$  a vzdálenost atomů  $r_{ij}$ .

Příspěvek Van der Waalsovy interakční energie popisuje Lennard-Jonesův potenciál (Rovnice 6)

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

Příčemž  $\varepsilon_{ij}$  je hloubka potenciálové jámy,  $r_{ij}$  vzdálenost dvou atomů a  $\sigma_{ij}$  značí vzdálenost atomů, při níž je potenciální energie nulová.[23]

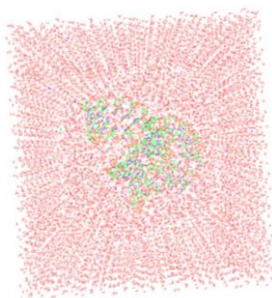


## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Metody

Počáteční struktury byly převzaty z krystalových struktur molekuly Twister ribozymu. Ty se nacházejí v PDB databázi (Protein Data Bank) pod kódy 4QJH (rozlišení 3,88 Å, rok 2014), 4RGE (rozlišení 2,89 Å, rok 2014) a 4OJI (2,30 Å, rok 2014). V této práci studované struktury 4OJI a 4RGE obsahovaly deoxyribózu v pozici 5' konce štípaného fosfátu, která inhibovala reakci, aby bylo možné vykrytalizovat model prekurzorového stavu. Později byly tyto struktury v některých simulacích upraveny tak, abychom pro porovnání získali rovněž struktury bez této mutace, čili s nativní ribózou. Naopak 4QJH neobsahovala deoxyribózu a tedy byla připravena i struktura, která tuto cukernou jednotku obsahuje (na pozici U9).

Všechny MD simulace byly provedeny za použití programového balíku AMBER 12.0 v silovém poli ff 99bsc0 $\chi$ OL3.[24][25][26] Twister ribozym byl zasolvován dvakrát, pomocí programu LeaP, nejdříve do oktahedrálního boxu a ten potom do kubického boxu s modelem vody SPC/E [27] aby byl simulační box co nejpodobnější krychli a vyloučily se tak intramolekulární interakce mezi periodickými kopiemi v simulaci. Vzdálenost mezi stěnou solvatačního obalu a nejbližším atomem solutu byla 12 Å. Náboj systému byl neutralizován přidáním  $K^+$  a  $Cl^-$  protiiontů na fyziologickou koncentraci 150 nM. Parametry iontů byly následující:  $K^+$  ( $r = 1.593$  Å,  $\epsilon = 0.4297$  kcal/mol [28]) a  $Cl^-$  ( $r = 2.711$  Å,  $\epsilon = 0.0127$  kcal/mol.[28]) Pro minimalizaci a termalizaci struktury a následnou produkci trajektorií byl použit modul Sander balíku AMBER 9.0. Trajektorie byly spuštěny za teploty 298,16 K na časové škále 1  $\mu$ s. Všechny simulace byly nejprve analyzovány z globálního hlediska, tj. byla zkoumána stabilita biomolekuly a to zda nedochází k velkým strukturním změnám. Tento prvotní náhled byl uskutečněn pomocí vizualizačních nástrojů PyMOL a VMD a pomocí výpočtu B-faktorů nástrojem Ptraj (součást programového balíku AMBER). V další kroku se analýzy zaměřily na zkoumání chování aktivního místa. Pomocí modulu Ptraj byly změřeny hodnoty RMSd (Root mean squared deviation) aktivního místa, dihedrální úhly reziduí v aktivním místě a také délky vodíkových vazeb u reziduí, která by se mohla účastnit štěpení. Grafy jednotlivých analýz byly vytvořeny programem Gnuplot.



*Obrázek 8 Dvoukrokově zasolvatovaná struktura OJI. Uvnitř kubického boxu je patrný oktahedrání.*

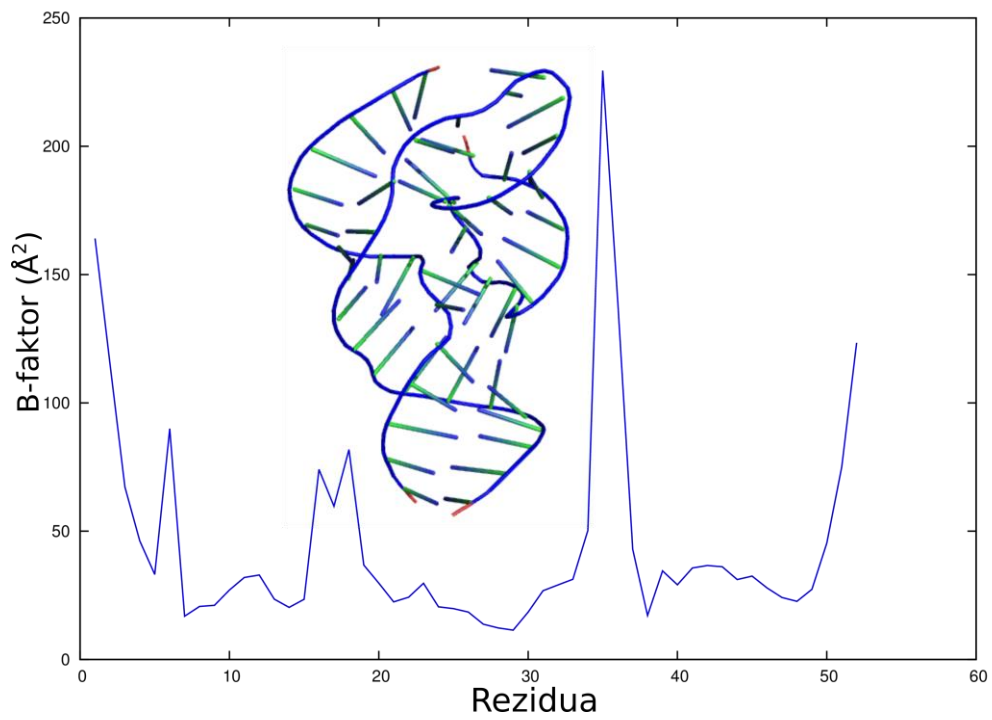
## 3.2 Výsledky a diskuze

### 3.2.1 4OJI

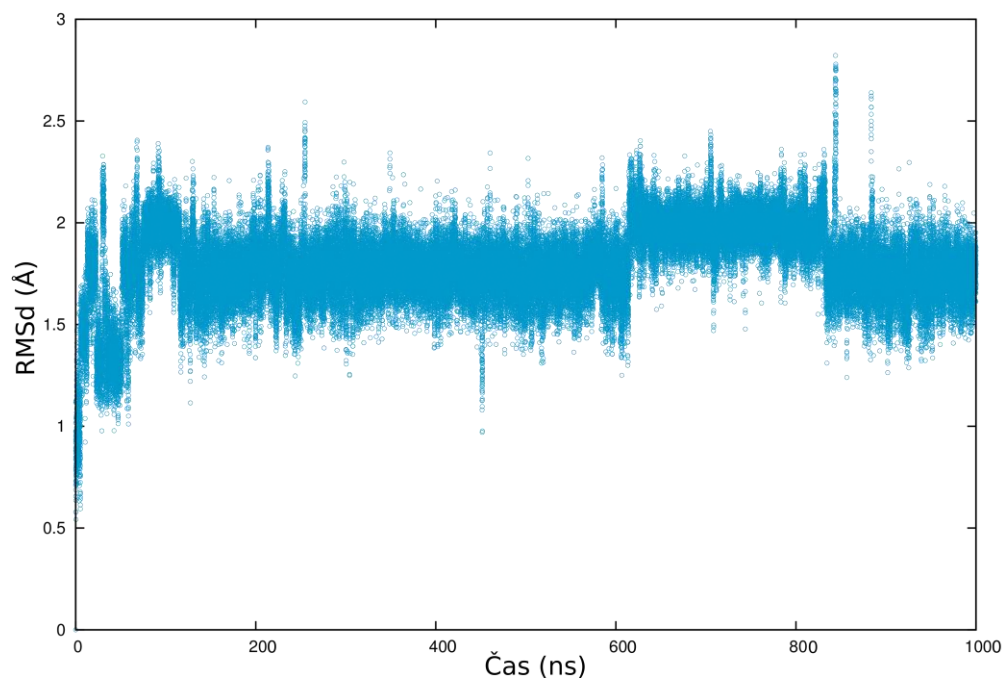
Struktura 4OJI je jedinou jednotkou v krystalové struktuře (PDB ID: 4OJI). Jediným problémem při přípravě startovní struktury je zdvojený fosfát rezidua A7. Jeden z fosfátů byl proto při úpravě struktury před simulací odstraněn. Ze struktury byla rovněž při úpravě zpětně zmutována deoxyribóza nukleotidu U6 na ribózu. Krystal OJI navíc obsahoval  $Mg^{2+}$  ionty, které však mají pouze strukturní význam. Jejich roli mohou v simulacích převzít monovalentní ionty, které jsou lépe popsány v nepolarizovaném silovém polu, a proto byly  $Mg^{2+}$  ionty odstraněny.

Struktura se během simulace ukázala jako nestabilní. V prvních 100 ns došlo ke strukturním změnám v T2 pseudouzlu a P1 stemu, které vedly až k aktivnímu místu a způsobily flipy dihedrálních úhlů páteře reziduí U6 a A7 a následně rozpad aktivního místa. Všechny tyto změny jsou dokumentovány dihedrálními úhly (Obr. 11 a 12) a zvýšenými hodnotami RMSd reziduí aktivního místa tj. U6 a A7 (Obr. 10).

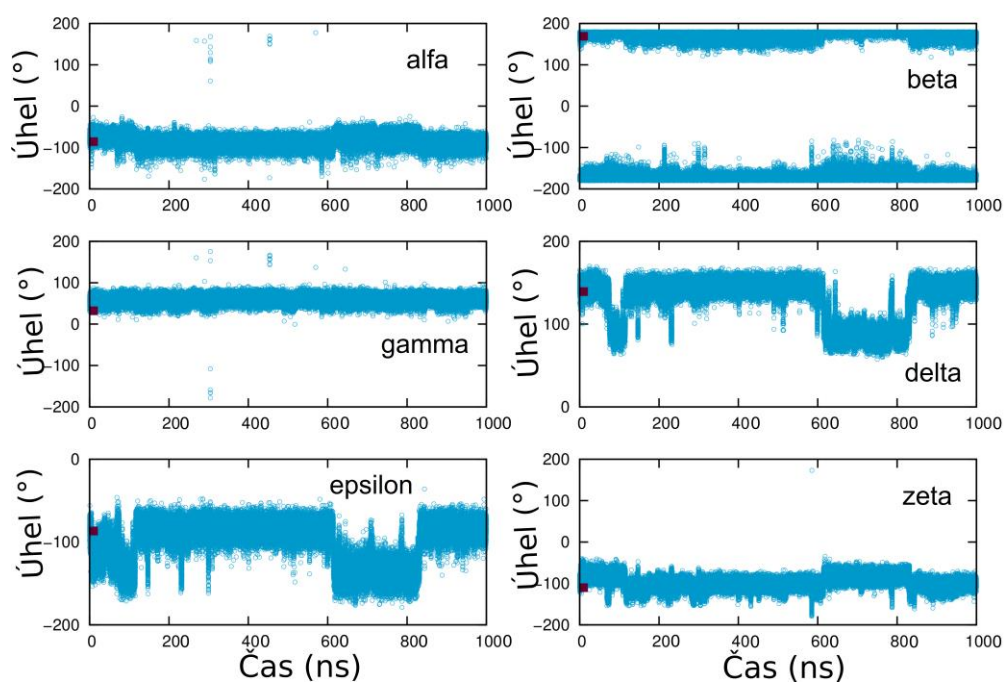
Míra stability/flexibility studované struktury byla hodnocena také pomocí B-faktorů jednotlivých reziduí (Obr. 9). Do grafu je vložen obrázek celé struktury obarvené podle B-faktoru (Obr. 9). Modrá barva značí nízkou mobilitu, zatímco červená vysokou. Velké hodnoty B-faktorů byly zaznamenány hlavně u koncových reziduí, která jsou velmi flexibilní. Větší hodnoty rovněž vykazuje reziduum U6, které je vytočeno do solventu a vyšší B-faktor byl tudíž očekáván. Další rezidua, která mají vyšší B-faktor (A16, G17 a U35) jsou terminální a ani u nich nejsou takovéto hodnoty překvapivé.



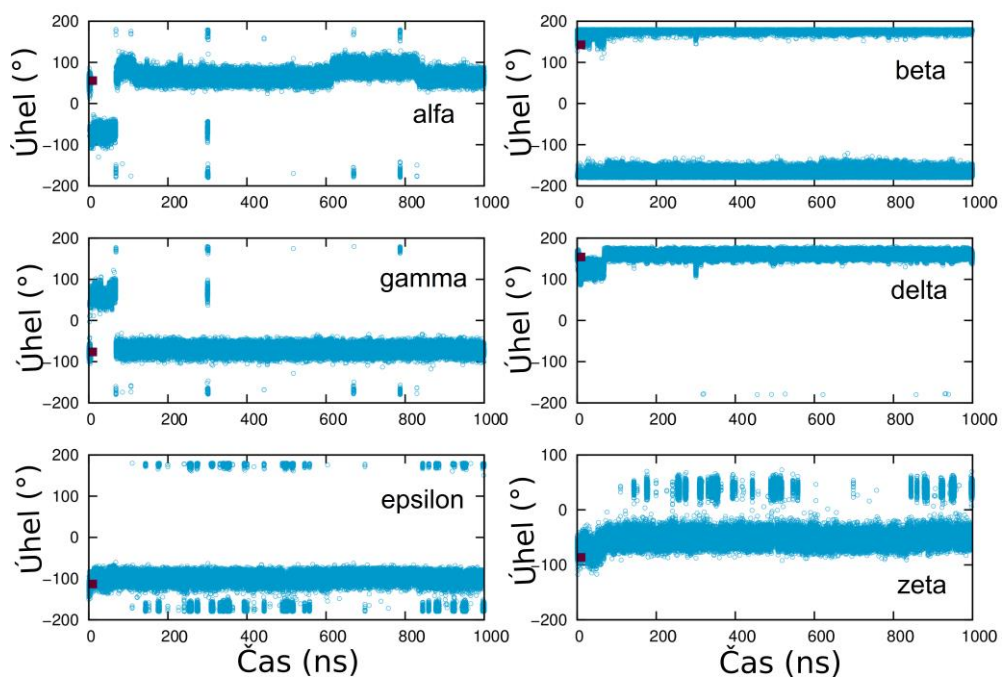
**Obrázek 9** B-faktor struktury 4OJI



**Obrázek 10** Vývoj hodnoty RMSd aktivního místa struktury 4OJI



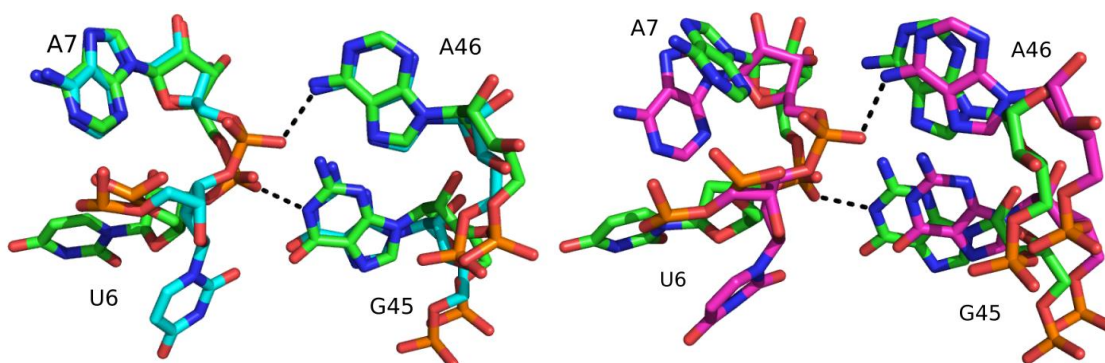
*Obrázek 11 Dihedrání úhly měřené na U6.*



*Obrázek 12 Dihedrání úhly měřené na A7.*

Pro strukturu 4OJI byla předpovězena dvě rezidua, která by mohla hrát roli v mechanismu štěpné reakce. První, G45, jehož atom N1 se na začátku simulace nacházel ve vzdálenosti

2,99 Å od fosfátu rezidua A7 a druhý, A46, jehož atom N6 se nacházel ve vzdálenosti 6,59 Å od tohoto fosfátu. Už během prvním 20 ns však došlo ke změnám v aktivním místě, které měly za následek markantní zkrácení vzdálenosti mezi N6:A46 fosfátem z A7 (vzdálenost je 2,86 Å, viz obr. 13). V čase okolo 40 ns se fosfát vlivem strukturních změn v P1 stemu opět přiblížil k G45 (3,04 Å), toto přiblížení bylo však pouze dočasné. V 70 ns došlo k trvalému oddálení fosfátu od rezidua G45. Ve zbylém čase simulace už nedošlo k výraznějším změnám této vzdálenosti a až do konce zůstal fosfát blíž k reziduu A44.



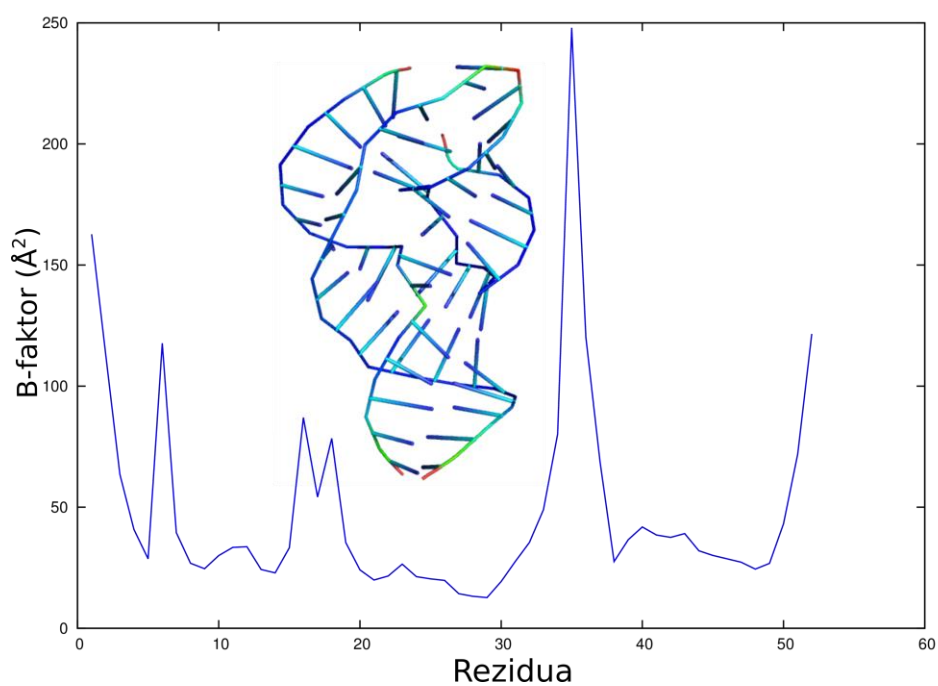
**Obrázek 13** Vlevo vidíme srovnání reziduí na prvním (zelená rezidua) a posledním (tyrkysová rezidua) snímku simulace. Čárkovaně jsou vyznačeny měřené vzdálenosti. Vpravo je porovnání prvního snímku a snímku z 20 ns (růžová rezidua), kdy dochází k přiblížení fosfátu k A46.

### 3.2.2 4OJI\_DU

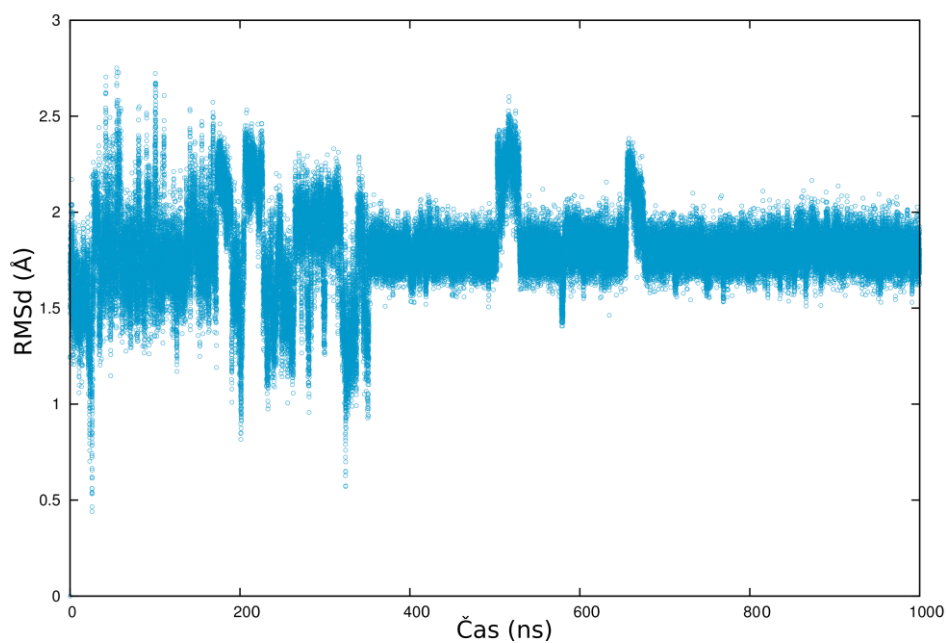
Struktura 4OJI\_DU vychází přímo z krystalu PDB ID:4OJI, tj. obsahuje i deoxy-mutaci na uracilu U6 inhibující reakci. Při přípravě této struktury bylo tedy postupováno stejně jako u OJI s jediným rozdílem, že byla ponechána deoxyribóza na DU6.

V průběhu simulace se tato struktura ukázala jako nestabilní. V prvních 230 ns došlo k přeskupení bází T2 pseudouzlu a P1 stemu. Tyto strukturní změny byly propagovány až k aktivnímu místu, kde vedly k flipům dihedralních úhlů páteře reziduí DU6 a A7 a následně vedly k rozpadu aktivního místa. Tyto změny jsou dokumentovány jak dihedralními úhly (Obr. 16 a 17), tak zvýšenými hodnotami RMSd DU6 a A7 reziduí (Obr. 15). Vysoké hodnoty B-faktorů jsou hlavně u koncových reziduí, kde dochází k velkému pohybu (na obrázku jsou zabarveny červeně). Vyšší hodnota B-faktoru byla rovněž zaznamenána u rezidua DU6. To je sice součástí aktivního místa, ale je vytočeno do solventu a tudíž vyšší

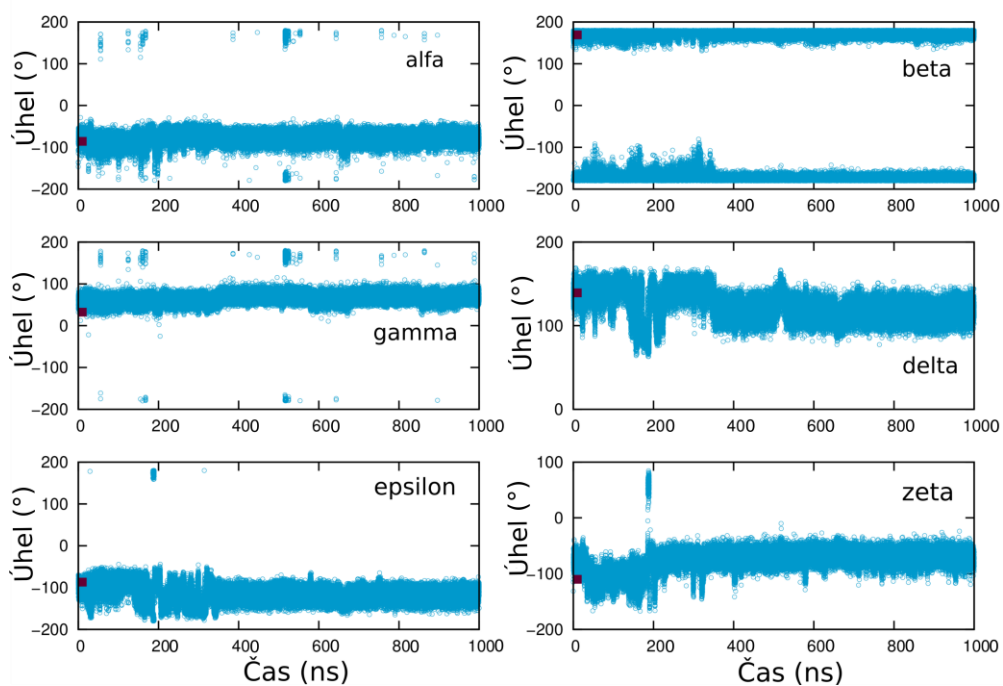
flexibilita v průběhu simulace není překvapivá. Ostatní rezidua, která mají vysoký B-faktor (A16, G17 a U35) jsou koncová a tudíž se u nich vyšší hodnoty B-faktoru předpokládají.



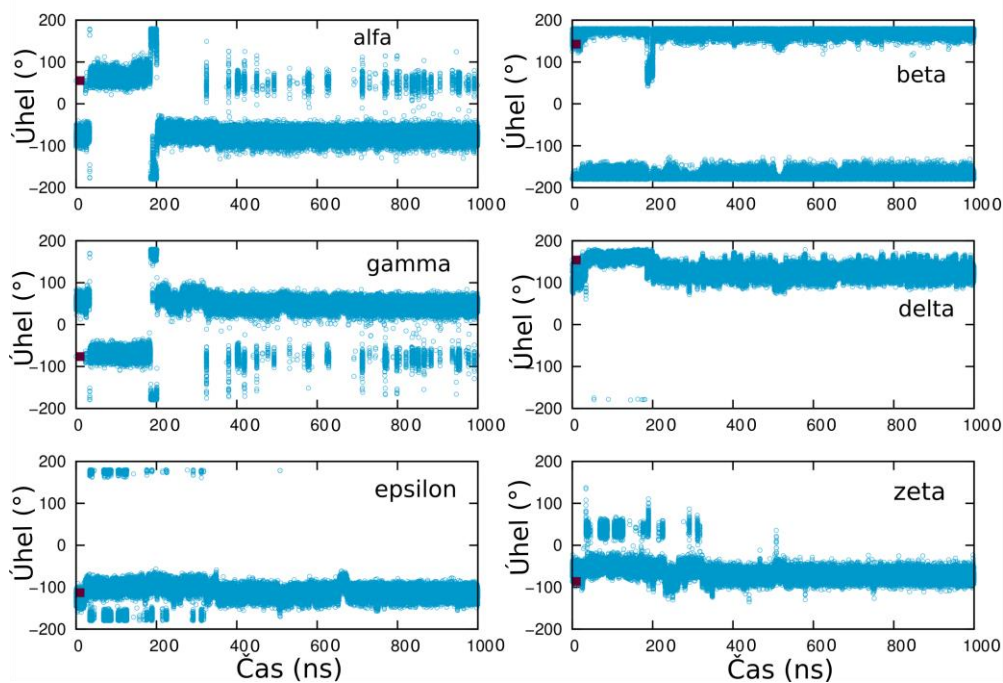
**Obrázek 14** B-faktor struktury 4OJI\_DU.



**Obrázek 15** Vývoj hodnoty RMSd aktivního místa struktury 4OJI\_DU.



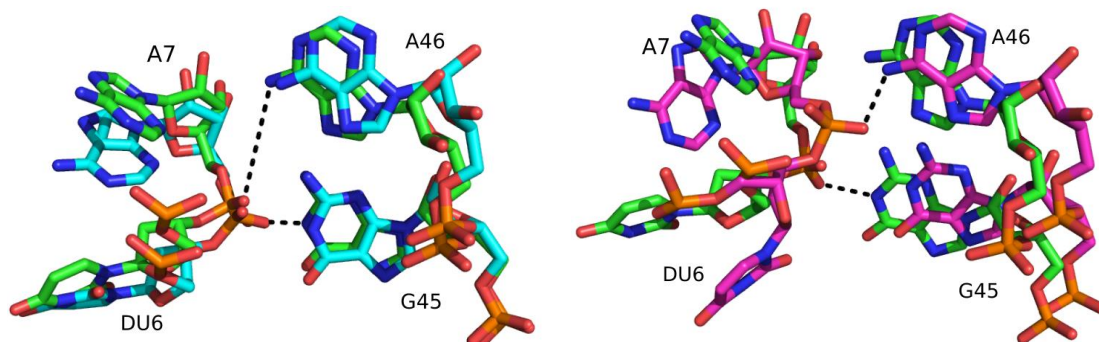
**Obrázek 16** Dihedrání úhly měřené na DU6.



**Obrázek 17** Dihedrání úhly měřené na A7.

Pro OJI\_DU byly na základě polohy nukleobází v aktivním místě předpovězena dvě rezidua, která by mohla být součástí mechanismu štěpné reakce.

Prvním z nich je G45 jehož atom N1 se na začátku simulace nacházel ve vzdálenosti 2,99 Å od fosfátu rezidua A7. Zhruba po 30 ns došlo ke změně konformace DU6 a rovněž ke změně vzdálenosti (4,11 Å). Při tomto přetočení se začal atom P z A7 přibližovat k A46. Počáteční vzdálenost atomu N6 od OP2 byla 6,59 Å, ale během 120 ns došlo ke zkrácení této vzdálenosti na 2,75 Å (viz Obr. 18). Kolem 190 ns došlo k otočení A7 do polohy velmi podobné té počáteční a tudíž byla vzdálenost mezi atomem P z A7 a A46 už příliš vysoká pro interakci. Poloha fosfátu se během simulace změnila ještě několikrát, ale nedošlo k výraznému přibližování nebo oddalování od A46 nebo G45. Od 500 ns už nedošlo téměř k žádným strukturním změnám v aktivním místě a vzdálenost P A7 a N1 G45 se ustálila okolo 3 Å. K výrazné změně polohy DU6 došlo vlivem natahování páteře, které bylo následkem porušení patrových interakcí.



**Obrázek 18** Vlevo vidíme srovnání reziduí na prvním (zelená rezidua) a posledním (tyrkysová rezidua) snímku simulace. Čárkovaně jsou vyznačeny měřené vzdálenosti. Vpravo je porovnání prvního snímku a snímku ze 120 ns (růžová rezidua), kdy dochází k přiblížení fosfátu k A46.

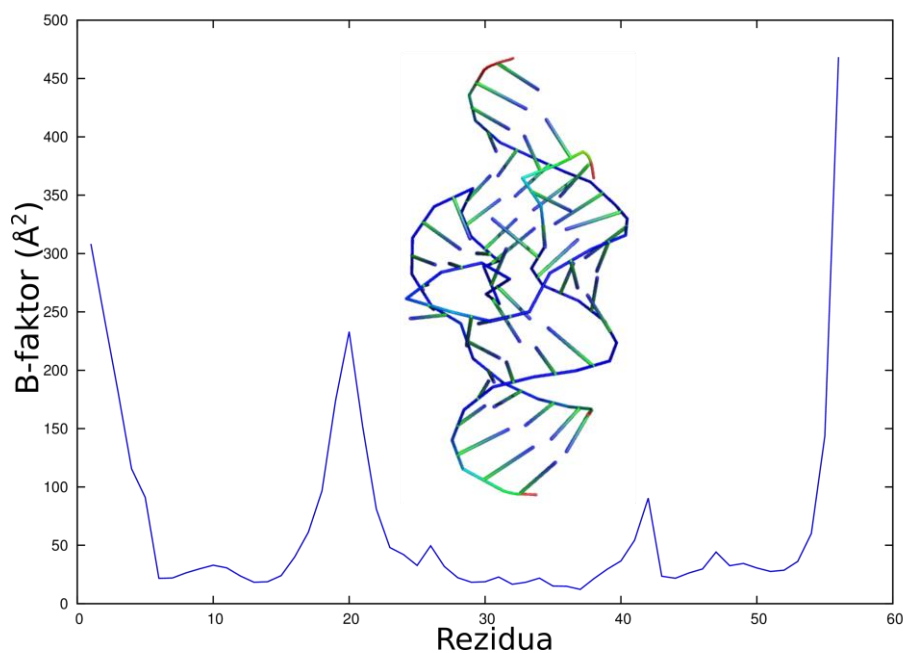
### 3.2.3 4RGE

Krystalová struktura 4RGE je složena ze tří jednotek (PDB ID: 4RGE). Dvě jednotky jsou k sobě velmi blízko, a proto byla pro simulaci zvolena jednotka třetí, ta je stabilizována skrz krystalové kontakty, pomocí koaxiálních stacků na obou koncích molekuly. Tento motiv neobsahoval žádné zdvojené fosfáty, pouze při úpravě zpětně zmutována deoxyribóza na U5 na ribózu.

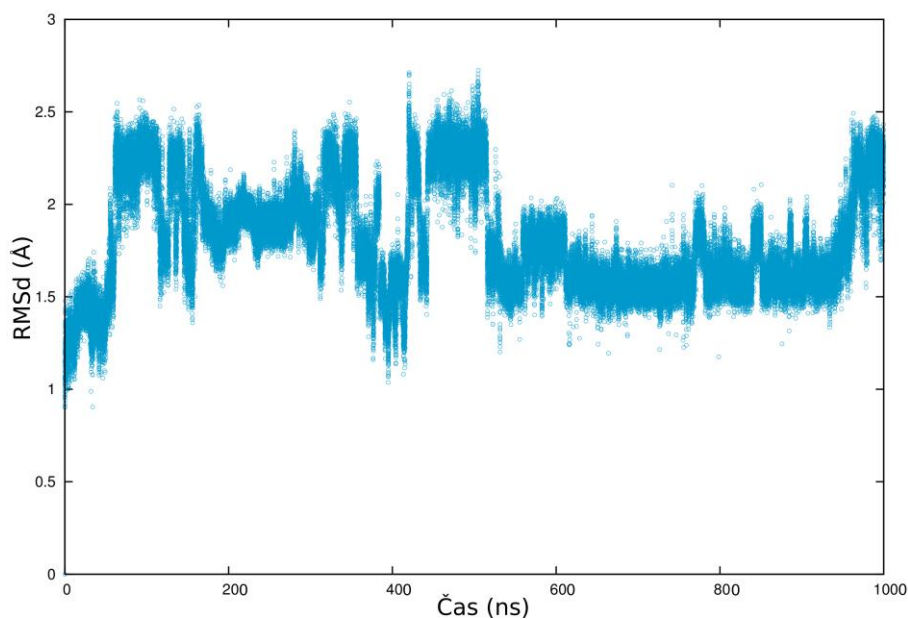
V průběhu simulace byla tato molekula nestabilní. V prvních 100 ns došlo ke změnám v uspořádání reziduí P1 a P3 stemu (tomu odpovídá zvýšený B-faktor těchto reziduí, viz Obr. 19). Strukturní změny vedly k flipům dihedrálních úhlů páteře U5 a A6 a následnému rozpadu



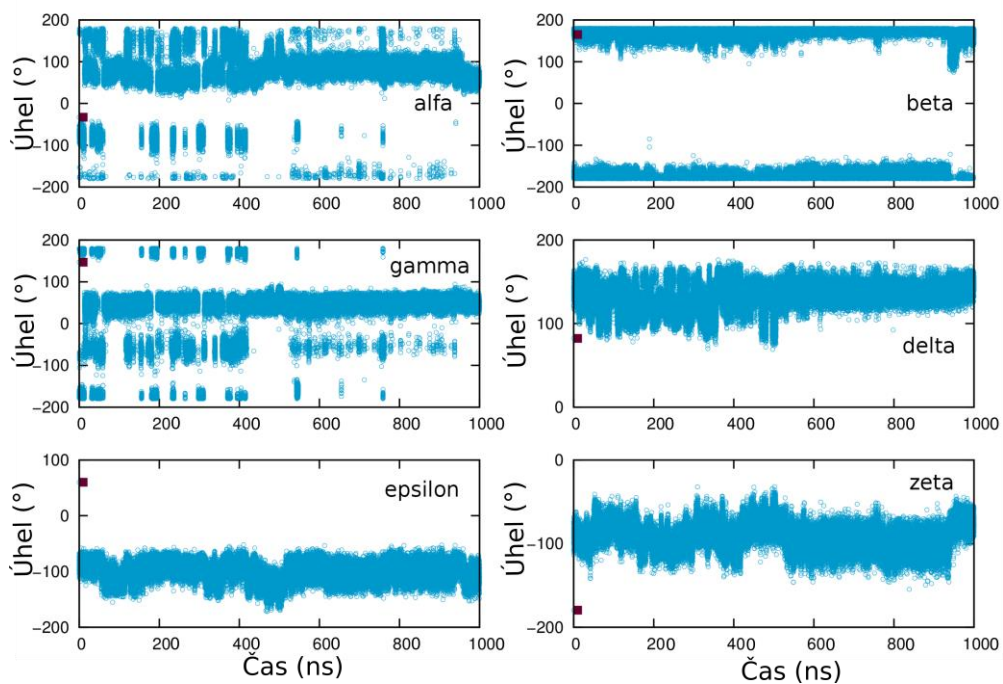
aktivního místa. Tyto změny jsou patrné jak z grafů dihedrálních úhlů (Obr. 21 a 22) tak ze zvýšených hodnot RMSd aktivního místa (Obr. 20). V grafu B-faktoru mají zvýšené hodnoty kromě terminálních reziduí také C20 a A42. C20 je součástí posledního páru bází P3 stemu (způsobuje rozpad aktivního místa). Reziduum A42 které má také vyšší hodnotu se nachází ve smyčce L2 (viz obr. 6).



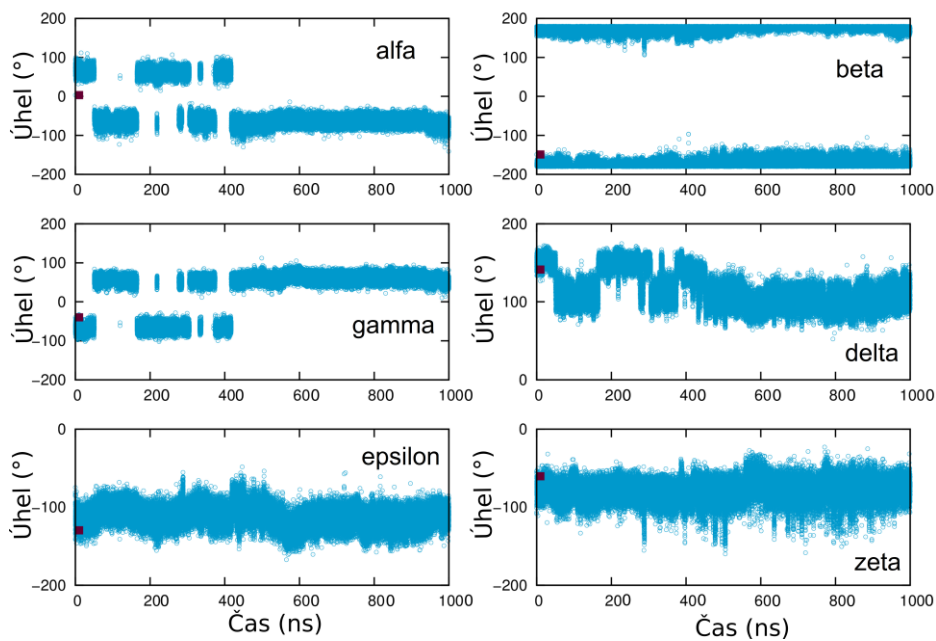
**Obrázek 19** B-faktor struktury 4RGE.



**Obrázek 20** Hodnoty RMSd aktivního místa struktura 4RGE



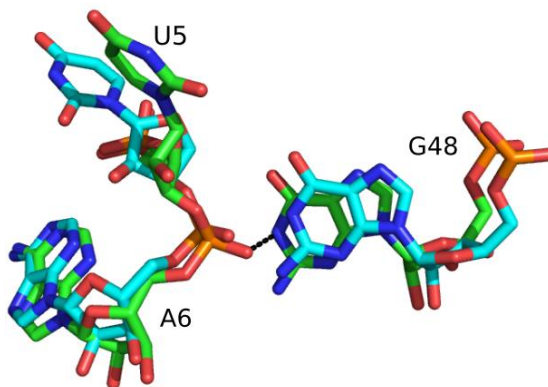
**Obrázek 21** Dihedrání úhly měřené na U5



**Obrázek 22** Dihedrání úhly měřené na A6

Pro RGE předpověděl Patel et al. Na základě analýzy aktivního místa [22], že nukleotidem, který by se mohl podílet na štěpné reakci je G48 (G48 je analogickým ke guaninu G45 u

struktury 4OJI). Navzdory nestabilitě a změnám konformace v aktivním místě se vzdálenost atomu OP2 z A6 od atomu N1 rezidua G48 v průběhu simulace výrazně nezměnila (na začátku 2,57 Å, na konci 3,14 Å). Největší vliv na pohyb aktivního místa měla páteř, která pohybuje U5. Největší změny byly zaznamenány na začátku (100 a 400 ns) a později kolem 600 ns, kdy došlo k rozpadu původních a vzniku nových patrových interakcí v P1 stemu. Od této chvíle až do konce simulace byla struktura stabilní.

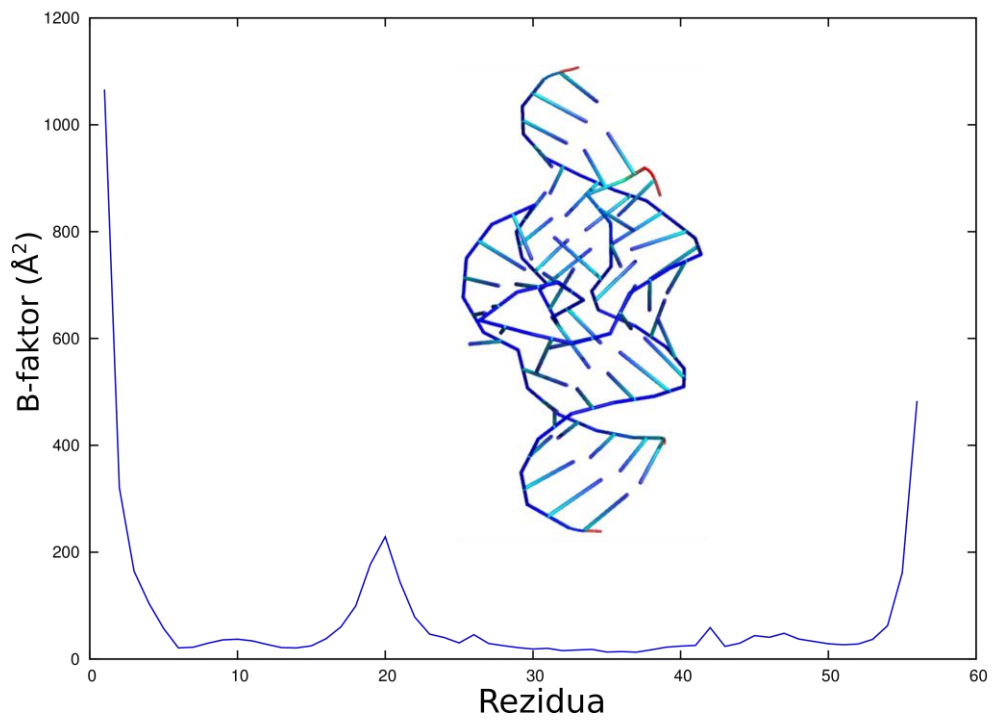


**Obrázek 23** Porovnání poloh nukleotidů aktivního místa na prvním (zelená rezidua) a posledním snímku (tyrkysová rezidua) simulace struktury 4RGE. Čárkovaně je vyznačena měřená vzdálenost.

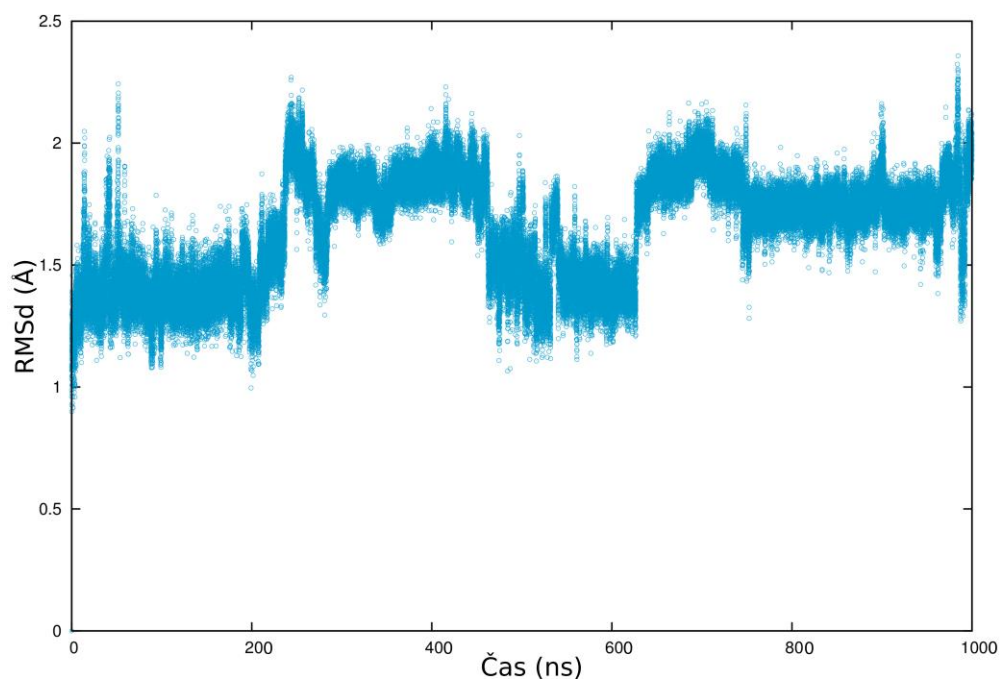
### 3.2.4 4RGE\_DU

Struktura 4RGE\_DU vychází přímo z krystalu PDB ID:4RGE, tj. obsahuje i deoxy-mutaci inhibující reakci. Při přípravě této struktury bylo postupováno stejně jako u RGE s jediným rozdílem, že byla ponechána deoxyribóza na DU5.

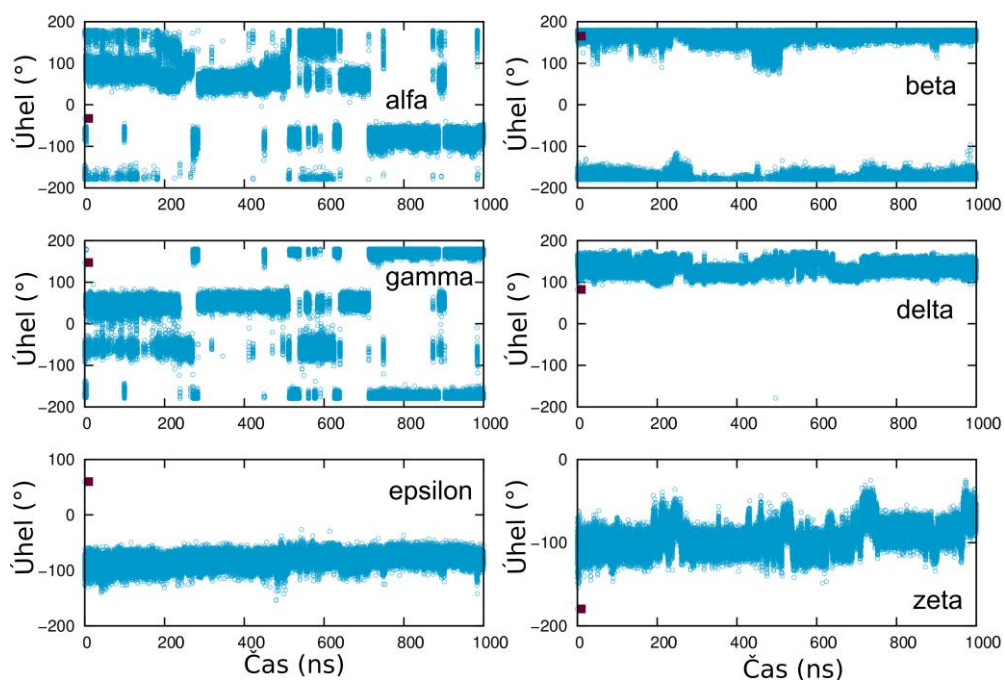
Z grafu B-faktorů demonstrováných také pomocí obarvení struktury je patrné, že RGE\_DU se v průběhu simulace ukázala jako stabilní. Kromě terminálních reziduí zde prakticky nedošlo k žádné výraznější flexibilitě. Aktivní místo (DU5, A6) bylo také stabilní (velmi tmavá barva v Obr. 24). Hodnoty RMSd aktivního místa tohoto systému jsou oproti hodnotám ostatních studovaných systémů nižší. Mezi 200 a 400 ns dochází ke zvýšení hodnoty (Obr. 25), které je výsledkem změn seskupení bází na koncových částech struktury (P1 a P3 stemy). Nukleotidy se však ustálily a od 800 ns do konce simulace zůstala struktura opět stabilní. Pro bližší pohled na flexibilitu nukleotidů tvořících aktivní místo jsou přiloženy grafy torzních úhlů na páteři nukleotidů aktivního místa (Obr. 26 a 27)



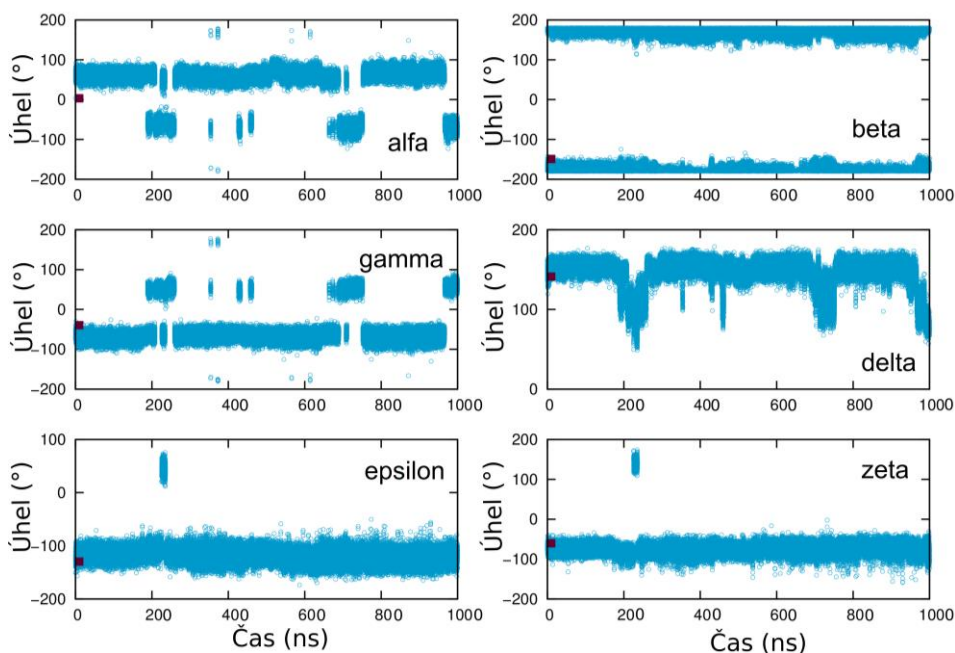
*Obrázek 24 B-faktor struktury 4RGE\_DU*



*Obrázek 25 Vývoj hodnoty RMSd aktivního místa struktury 4RGE\_DU*



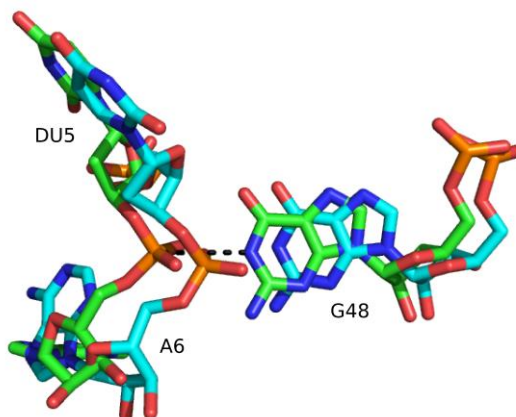
**Obrázek 26** Dihedrání úhly měřené na reziduu DU5



**Obrázek 27** Dihedrání úhly měřené na reziduu A6

V průběhu simulace byla stabilita aktivního místa a G48 větší než u RGE. Počáteční vzdálenost atomu N1 z G48 k nejbližšímu atomu kyslíku fosfátu byla 2,57 Å a s mírnými odchylkami byla udržována celou dobu simulace. Ačkoliv na obou koncích struktury (P1 a P3 stem) byla flexibilita velmi vysoká, aktivní místo bylo ovlivněno pouze mírně. U DU5 došlo

k mírnému vytáčení během simulace vlivem pohybu cukr-fosfátové páteře, ale reziduum A6 bylo po celou dobu simulace stabilní. Pohyb páteře je velmi dobře dokumentován chováním dihedrálních úhlů (Obr. 26 a 27).

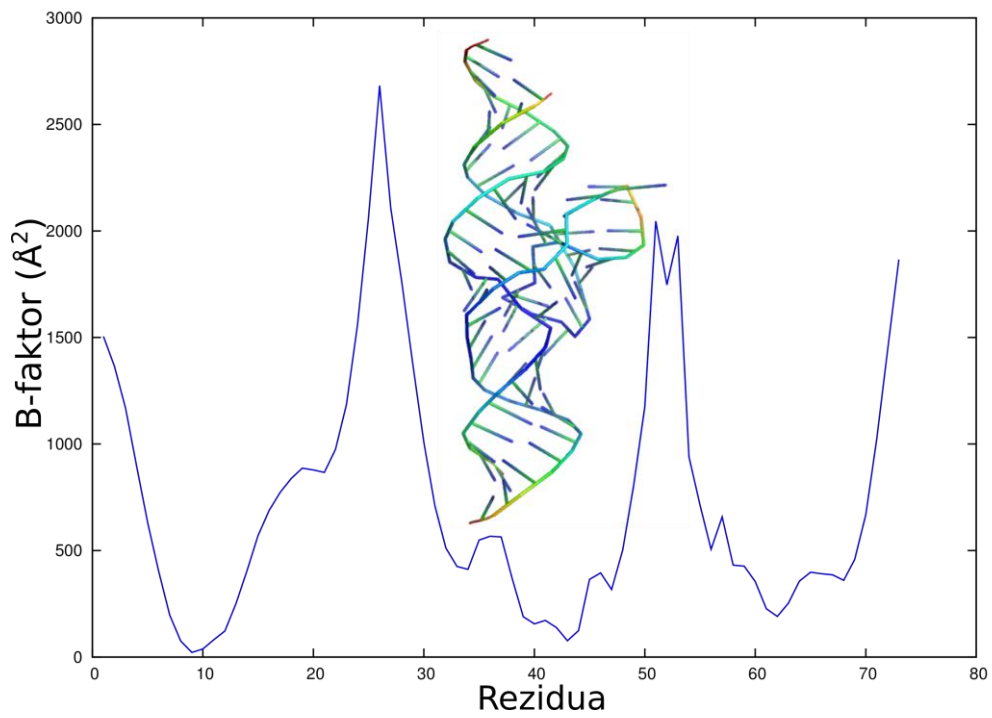


**Obrázek 28** Porovnání formací nukleotidů v aktivním místě na prvním (zelená rezidua) a posledním (tyrkysová rezidua) snímku simulace u struktury 4RGE\_DU. Čárkovaně je vyznačena měřená vzdálenost.

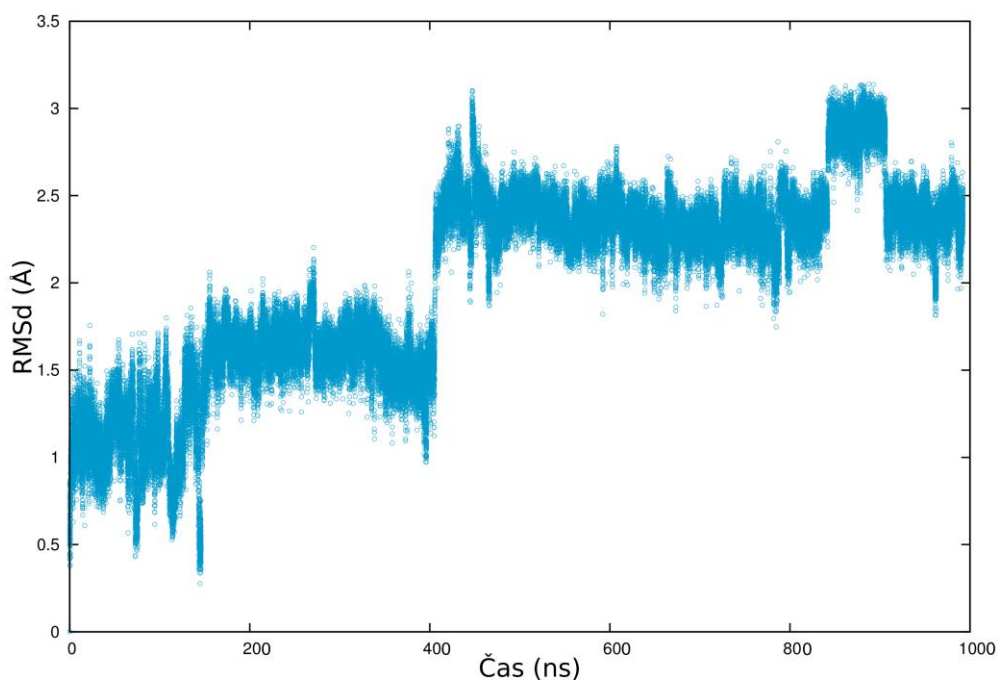
### 3.2.5 4QJH

Struktura 4QJH vychází přímo z krystalu PDB ID: 4QJH. V krystalové struktuře tohoto motivu se vyskytují stejně jako u RGE 3 podjednotky. Dvě z těchto jednotek mezi sebou mají krystalové kontakty vlivem velmi malých vzdáleností a to přímo v aktivním místě. Ani jedna z nich tudíž nebyla považována za vhodnou pro simulaci. Třetí jednotka (v krystalu tvořena řetězci E a F) vytváří patrové interakce s konci jednotky předchozí, ale tyto krystalové kontakty se nachází ve velké vzdálenosti od aktivního místa a nijak ho tudíž neovlivňují, proto byla použita tato podjednotka.

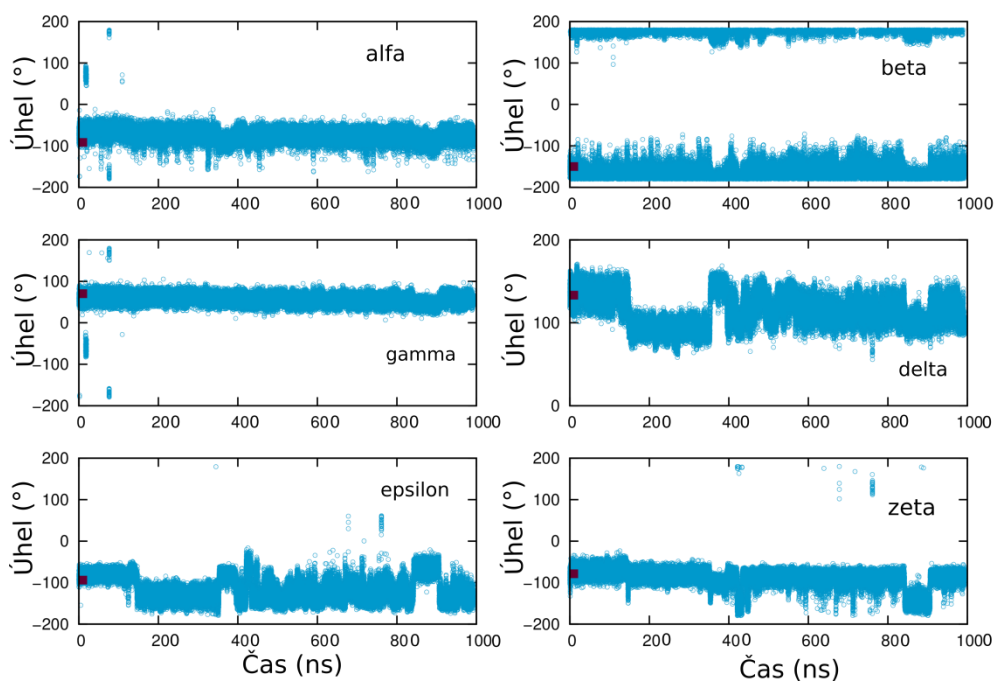
Během simulace vykazovala struktura 4QJH nestabilitu. U stemů P1 a P3 došlo v prvních 140 ns k přeskupení bází a tyto změny byly propagovány až k aktivnímu místu, kde došlo k flipům dihedrálních úhlů páteře reziduí U9 a A10 a následně i k rozpadu aktivního místa. Tyto změny jsou patrné z grafů dihedrálních úhlů (Obr. 31 a 32) a také z grafu hodnoty RMSd aktivního místa (Obr. 30). B-faktor u této struktury dosahuje všeobecně větších hodnot než u struktur předchozích. Rezidua 52 a 53 vykazují vyšší hodnoty protože jsou součástí smyčky (viz obr. 7B). Reziduum 25 vykazující nejvyšší hodnotu faktoru se nachází na konci P3 stemu a vysoká flexibilita byla očekávána. Ačkoliv je P1 stem dlouhý (8 párů bází), jeho flexibilita silně ovlivnila aktivní místo.



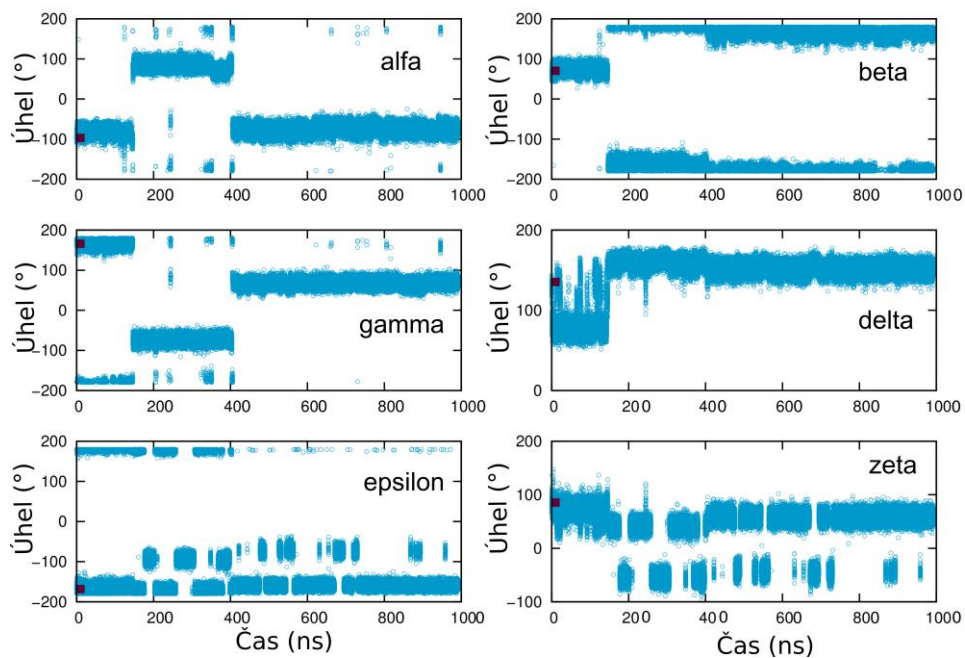
**Obrázek 29** B-faktor struktury 4QJH.



**Obrázek 30** Vývoj hodnoty RMSd aktivního místa u struktury 4QJH



**Obrázek 31** Dihedrání úhly naměřené pro reziduum U9

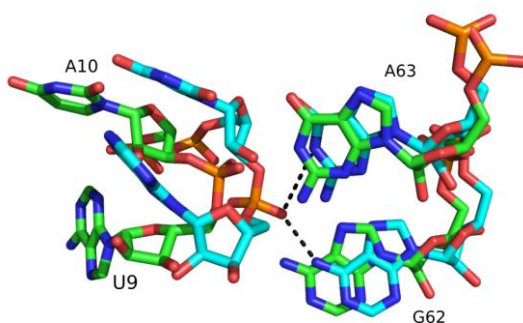


**Obrázek 32** Dihedrání úhly naměřené pro reziduum A10

Z analýz trajektorií byly předpovězeny dva nukleotidy, které by mohly mít podíl na mechanismu reakce, G62 a A63 (G62 je analogický k G48 struktury 4RGE a tedy i G45 u



4QJI). Tato rezidua se obě na začátku struktury nacházela v blízkosti atomu OP1 rezidua U10. Atom N1 rezidua G62 byl vzdálen od fosfátu 3,11 Å a vzdálenost atomu N6 rezidua A63 k fosfátu byla 5,18 Å. V průběhu simulace došlo ke změnám těchto vzdáleností. V prvních 100 ns se fosfát přibližoval ke guaninu, ale v čase 140 ns došlo vlivem natažení obou konců struktury (P1 a P3 stem) k výrazné změně orientace fosfátu a odklonění od guaninu. Rovněž došlo ke zkrácení vzdálenosti mezi fosfátem a adeninem. Od poloviny simulace už byl fosfát přikloněn spíše k A63. Nukleotidy aktivního místa spolu zhruba od 800 ns vytvořily patrovou interakci (viz obr. 31) a dále zůstaly stabilní. Během simulace nebyla zaznamenána žádná reaktivní konformace.



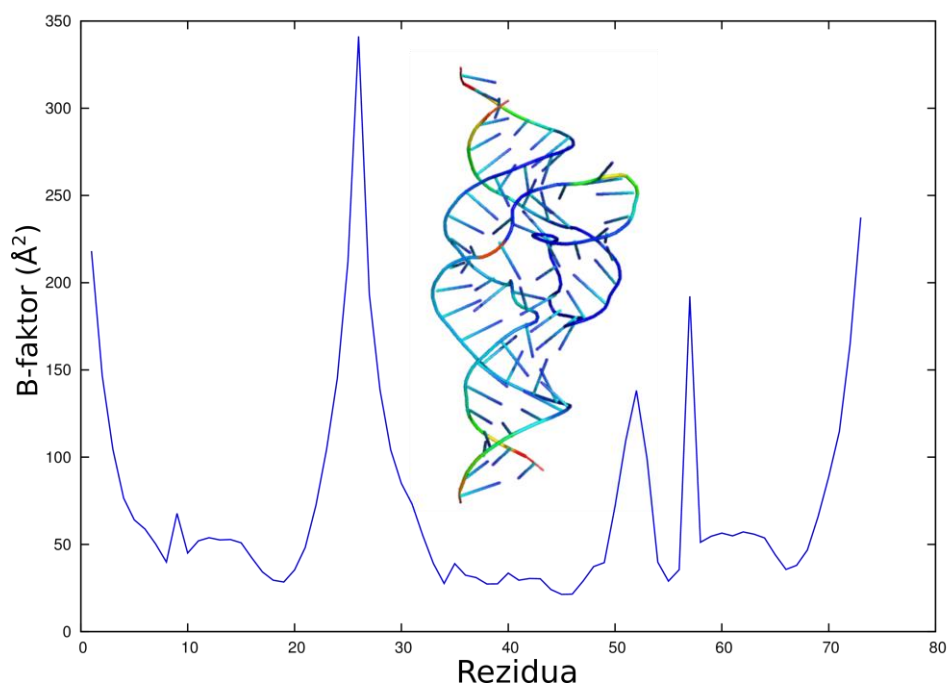
**Obrázek 33** Porovnání formací nukleotidů v aktivním místě na prvním (zelená rezidua) a posledním (tyrkysová rezidua) snímku simulace u struktury 4QJH. Čárkovaně jsou vyznačeny měřené vzdálenosti.

### 3.2.6 4QJH\_DU

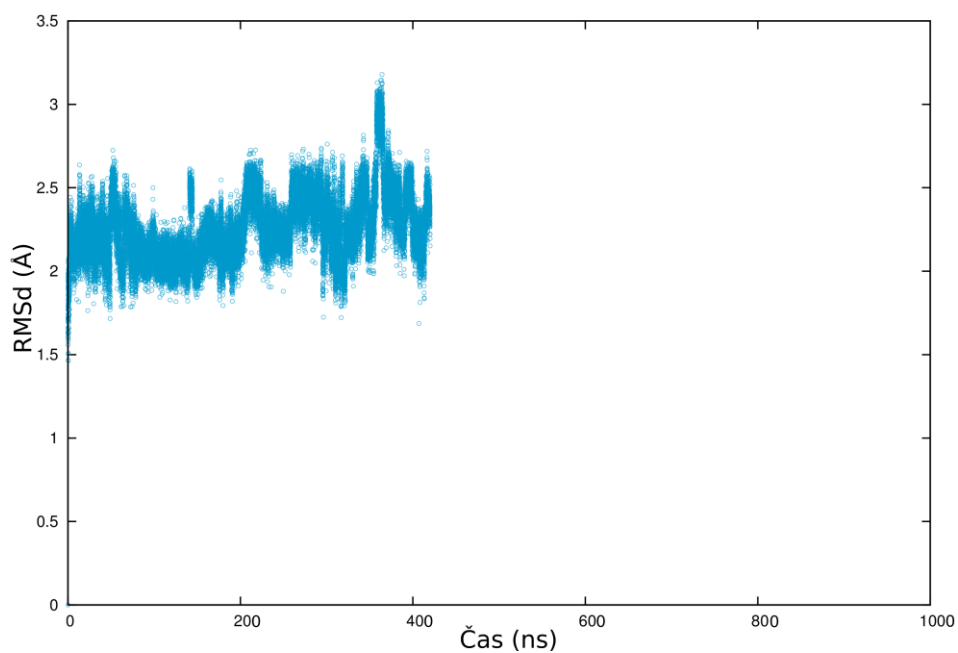
Struktura 4QJH\_DU vychází přímo z krystalu PDB ID: 4QJH. Při přípravě této struktury bylo postupováno obdobně jako u 4QJH. Jediným rozdílem bylo zmutování ribózy na U9 na deoxyribózu [20]. Průběh simulace této struktury byl pozastaven ve 430 ns. Tento čas je však dostačující pro kvalitní analýzu chování jak aktivního místa, tak struktury jako celku.

Struktura nebyla během simulace stabilní. V prvním 50 ns došlo k přeskupení bází T2 pseudouzlu a P4 stemu. Tyto strukturní změny postupovaly až k aktivnímu místu, kde vedly k flipům dihedralních úhlů páteře zejména u rezidua DU9 a následně k rozpadu aktivního místa. Tyto změny jsou patrné z grafů dihedralních úhlů (Obr. 36 a 37), tak zvýšenými hodnotami RMSd DU9 a A10 (Obr. 35). Ačkoliv 4QJH\_DU vychází ze stejné struktury jako 4QJH, hodnoty B-faktorů nejsou zdaleka tak vysoké. Zvýšené hodnoty B-faktorů se však objevují u stejných reziduí. Rezidua 52 a 53 jsou součástí smyčky (Obr. 7B) a reziduum 25

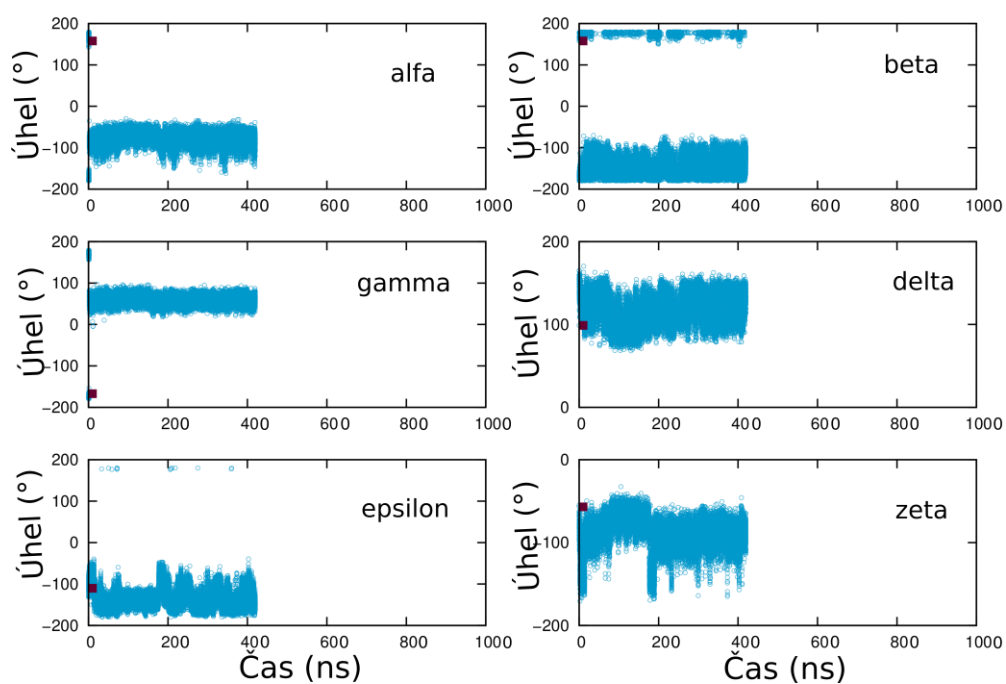
se nachází na konci P3 stemu a reziduum 58 je vytočeno do solventu, tudíž ani zde není vysoká flexibilita překvapující.



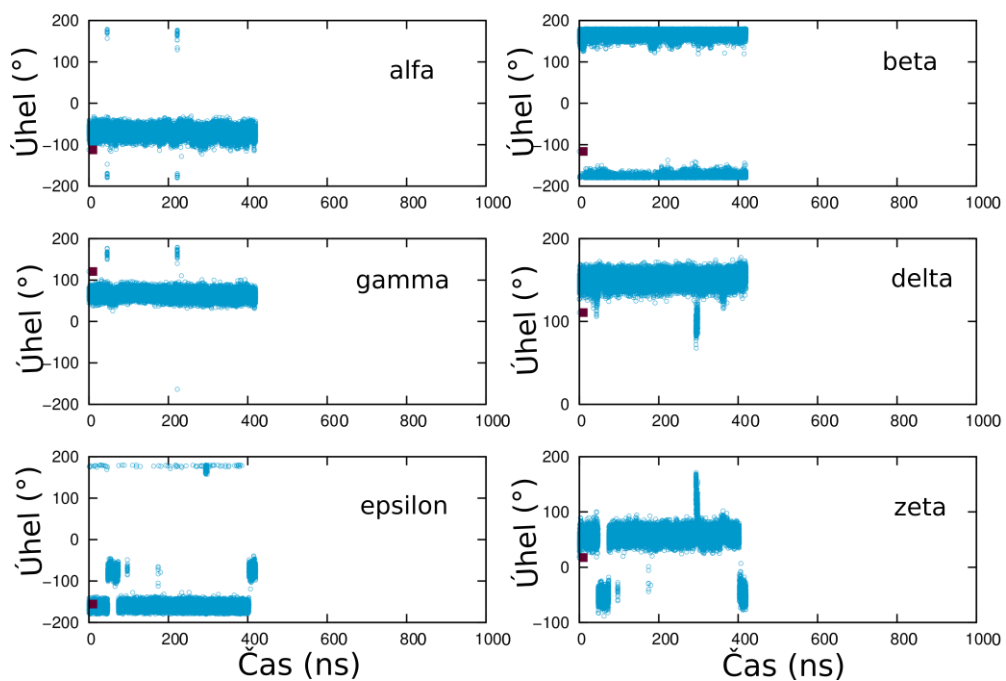
**Obrázek 34** B-faktor struktury 4QJH\_DU.



**Obrázek 35** Vývoj hodnoty RMSd aktivního místa v čase u struktury 4QJH\_DU.

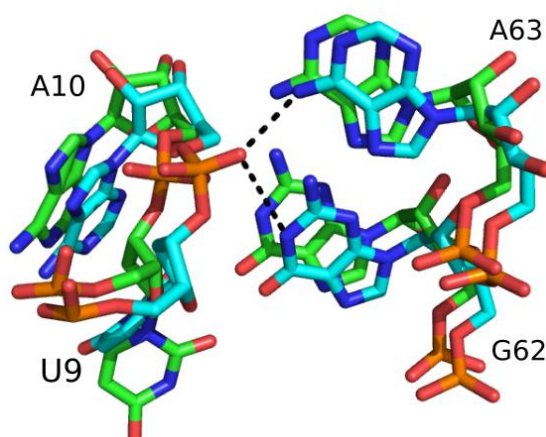


**Obrázek 36** Dihedrální úhly měřené na DU9



**Obrázek 37** Dihedrální úhly měřené na A10.

Pro strukturu 4QJH\_DU byly na základě analýz trajektorií a polohy aktivního místa předpovězeny dva nukleotidy, které by se mohly účastnit mechanismu štěpné reakce. Prvním je G62 jehož atom N1 byl od atomu OP1 rezidua A7 na počátku simulace vzdálen 6,35 Å. Druhým je A63, který byl od téhož atomu vzdálen 3,14 Å. Během prvních 50 ns, kdy došlo k rozpadu aktivního místa, se zároveň tyto vzdálenosti měnily. Došlo ke zkrácení vzdálenosti mezi atomem OP1 rezidua A7 a guaninem (ve 40 ns je to 3,96 Å) a zároveň došlo k malému přiblížení rezidua A63 k fosfátu (ve 40 ns je to 2,99 Å). Vzdálenosti byly od 40 ns udržovány až do konce. Kromě změn ve stemech ovlivňujících rozpad aktivního místa došlo také ke změnám ve stemech P1 a P3. Docházelo u nich k mírným změnám patrových interakcí po celou dobu trvání simulace. Nukleotidy aktivního místa (DU9 a A10) spolu v průběhu simulace (cca. 50 ns) vytvořily patrovou interakci a do konce simulace ji udržovaly.



**Obrázek 38** Porovnání formací nukleotidů v aktivním místě na prvním (zelená rezidua) a posledním (tyrkysová rezidua) snímku simulace u struktury 4QJH\_DU. Čárkovaně jsou vyznačeny měřené vzdálenosti.

## 4 ZÁVĚR

V této práci byla studována strukturní dynamika Twister ribozymu pomocí metod výpočetní chemie, přesněji molekulárně dynamických simulací, které ukazují vývoj struktury v čase. Zkoumány byly struktury PDB ID: 4OJI, 4QJH, 4RGE. Každá dvakrát, přičemž se lišily cukrem na nukleotidu aktivního místa – deoxyribóza pro reprodukci strukturní dynamiky inhibovaného ribozymu tak, jak je v krystalové struktuře a ribózy pro popis plně aktivního ribozymu.

Ze šesti spuštěných simulací lze pouze jednu považovat za stabilní, a to simulace RGE\_DU. U zbylých pěti struktur došlo k rychlému rozpadu aktivního místa vlivem přeskupení bází stemů v blízkosti aktivního místa (konkrétně stemu P1 a ve většině simulací i stemu P3), porušení patrových interakcí v těchto stemech nebo vysoké flexibility stemů jako celku. Struktura RGE má P1 stem tvořen pouze 2 páry bází, přičemž nukleotidy, které by mohly tvořit třetí pár tohoto stemu jsou v krystalové struktuře rozpárovány a účastní se krystalových kontaktů. Celý stem P1 je rovněž stabilizován krystalovými kontakty. Ve volné dynamice je však tento stem výrazně labilní a rozpadá se, což zapříčiňuje rozpad aktivního místa. Krystalová struktura PDB ID 4QJD (v této práci nesimulovaná pro rozpadlý P1 stem již v krystalové struktuře) navíc ukazuje, že ani čtyři páry bází nejsou dostatečné ke stabilizaci P1 stemu. Tudiž P1 stem ve struktuře RGE o dvou párech bází je dodatečně stabilizován krystalovými kontakty, jak bylo potvrzeno našimi simulacemi. Struktury OJI a OJI\_DU mají stem P1 tvořen 5 páry bází a toto párování je v simulacích stabilní, čili pět párů bází je dostatečná délka pro stabilizaci P1 stemu. Nicméně i v tomto případě flexibilita P1 stemu jako celku měla vliv na rozpad aktivního místa. Struktury 4QJH a 4QJH\_DU mají P1 stem tvořený 8 páry bází a v souladu s výše ymíněnými simulacemi je párování v tomto stemu stabilní. Opět ale zvýšená flexibilita tohoto stemu má za následek nestabilitu aktivního v simulaci QJH. U simulace RGE\_DU, kde byl P1 stem rovněž po celou dobu simulace flexibilní, nebyla zřejmě jeho flexibilita tak vysoká, aby způsobila rozpad aktivního místa. Dynamika a délka P1 stemu tedy silně ovlivňuje stabilitu aktivního místa Twister ribozymu a kromě struktur 4RGE\_DU a 4QJH\_DU přispěla zvýšená flexibilita P1 stemu k rozpadu aktivního místa všech zbylých studovaných struktur

Žádná ze studovaných struktur se během simulace nedostala do konformace vhodné pro štěpnou reakci, tedy konformace která by měla dostatečně velký in-line-attack úhel, tj. úhel U-1(O2')...A1(P)-A1(O5') nad cca 140°. Tento jev je zapříčiněn tím, že se tato RNA nachází v inaktivní konformaci s U-1 vytlačeným z aktivního místa a tudíž nekompatibilním pro in-line atak štěpného fosfátu. [29] Struktury by tedy musely projít konformační změnou, aby se aktivní místo dostalo do vhodné konformace. Standardní molekulárně dynamické simulace nicméně nejsou schopny tuto konformaci na časové škále mikrosekund najít.

## 5 SUMMARY

The structural dynamics of Twister ribozyme was studied in this thesis using computational chemistry. Specifically MD simulations showing movement of the structure in time. We studied three structures PDB ID: 4OJI, 4QJH, 4RGE. Every structure was simulated twice with the different sugar at nucleobase of the active site – deoxyribose was used for reproduction of structural dynamics of inhibited ribozyme as presented in the crystal structure and ribose for description of fully active ribozyme, respectively.

Only one structure 4RGE\_DU showed stable out of six simulationes. At those remainig five the active site fall apart quickly owing to reshuffle of nucleobases close to the active site (concretely P1 stem and in the most cases P3 stem) breach of stacking or high flexibility of the whole stem. The P1 stem of the 4RGE structure is consisted of two base pairs, while nucleotides that could form a third pair of this stem are unpaired and participate on the crystal contac. The whole P1 stem is also stabilized by crystal contacts. This stem is distinctly lable and falls apart which causes the disintegration of the active site. Crystal structure PDB ID 4QJD (not simulated in tis thesis owing to the ruined P1 stem already in the crystal structure) shows that not even four base pairs are enough for stabilization of P1 stem. Thus P1 stem in the 4RGE structure is additionally stabilized by crystal contacts as confirmed by our simulationes. The P1 stem of structures OJI and OJI\_DU is consisted of five nucleobases pairs, and this pairing is stable in our simulationes thus five base pairs are enough to stabilize the P1 stem. However even in this case the flexibility of the whole P1 stem influenced the disintegration of the active site. P1 stem of QJH and QJH\_DU structures is eight nucleobases pair long and in accordance with the simulationes mentioned above the pairing in this stem is stable. Also in this case higher flexibility of this stem caused the breakup of the active site in simulation QJH. At RGE\_DU simulation, where the P1 stem was also flexible, the flexibility was not big enough to cause the breakup of the active site. Thus dynamics and length of the P1 stem strongly influence the stability of the active site of Twister ribozyme and except for structures RGE\_DU and QJH\_DU the flexibility of this stem contributes to the desintegration of the active site at four remaining structures.

None of studied structures get into the conformation suitable for the reaction during simulations i.e. conformation when the in-line-attack angle is large enough which means

higher than  $140^\circ$ . This phenomenon is caused by fact that this RNA molecule is in inactive conformation with U-1 extruded from the active site and thus incompatible for the in-line attack to scissile phosphate.[29] Structures would have to undergo conformational changes to active site get into the right position. Standard MD simulations are not able to find this conformation on the  $\mu\text{s}$  time scale.



## 6 BIBLIOGRAFIE

- [1] L. J. Sirlin, *Biology of RNA*. New York: Academic Press, 1973.
- [2] R. M. Dirks, M. Lin, E. Winfree, and N. a. Pierce, “Paradigms for computational nucleic acid design,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 32, no. 4, pp. 1392–1403, 2004.
- [3] N. B. Leontis and E. Westhof, “Geometric nomenclature and classification of RNA base pairs.,” *RNA*, vol. 7, pp. 499–512, 2001.
- [4] and L. S. Jeremy M Berg, John L Tymoczko, *Biochemistry*, 5th. ed. New York: WH Freeman & Co., 2002.
- [5] S. Clancy and W. Brown, “Translation : DNA to mRNA to Protein,” *Nat. Educ.*, vol. 1, p. 101, 2008.
- [6] A. jr. Šípek, “Genetika - Biologie; Váš zdroj informací o genetice a biologii.” [Online]. Available: <http://www.genetika-biologie.cz>. [Accessed: 14-Nov-2015].
- [7] T. R. Cech, “Structural biology. The ribosome is a ribozyme.,” *Science*, vol. 289, pp. 878–9, 2000.
- [8] S. Clancy, “RNA Functions | Learn Science at Scitable,” *Nat. Educ.*, 2008.
- [9] A. Serganov and D. J. Patel, “Ribozymes, riboswitches and beyond: regulation of gene expression without proteins.,” *Nat. Rev. Genet.*, vol. 8, pp. 776–790, 2007.
- [10] M. J. Fedor, “Comparative enzymology and structural biology of RNA self-cleavage.,” *Annu. Rev. Biophys.*, vol. 38, pp. 271–299, 2009.
- [11] T. R. Cech, “Evolution of biological catalysis: Ribozyme to RNP enzyme,” in *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 2009, vol. 74, pp. 11–16.
- [12] C. H.-L. Peebles C. L., Perlman P. S., Mecklenburg K. L., Petrillo M. L., Tabor J. H., Jarrell K. A., “A self-splicing RNA excises an intron lariat.,” *Cell*, vol. 44, pp. 213–223, 1986.
- [13] T. R. Cech, a J. Zaug, and P. J. Grabowski, “In vitro splicing of the ribosomal RNA precursor of Tetrahymena: involvement of a guanosine nucleotide in the excision of the intervening sequence.,” *Cell*, vol. 27. pp. 487–96, 1981.
- [14] D. M. J. Lilley, “Mechanisms of RNA catalysis,” *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, vol. 366, pp. 2910–2917, 2011.
- [15] T. J. Wilson, N.-S. Li, J. Lu, J. K. Frederiksen, J. a Piccirilli, and D. M. J. Lilley, “Nucleobase-mediated general acid-base catalysis in the Varkud satellite ribozyme.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 107, no. 26, pp. 11751–11756, 2010.
- [16] J. H. Chen, R. Yajima, D. M. Chadalavada, E. Chase, P. C. Bevilacqua, and B. L. Golden, “A 1.9 ?? crystal structure of the HDV ribozyme precleavage suggests both lewis acid and general acid mechanisms contribute to phosphodiester cleavage,” *Biochemistry*, vol. 49, pp. 6508–6518, 2010.
- [17] S. Nakano, D. M. Chadalavada, and P. C. Bevilacqua, “General acid-base catalysis in the mechanism of a hepatitis delta virus ribozyme.,” *Science*, vol. 287, pp. 1493–1497, 2000.
- [18] J. B. Murray, a a Seyhan, N. G. Walter, J. M. Burke, and W. G. Scott, “The

- hammerhead, hairpin and VS ribozymes are catalytically proficient in monovalent cations alone.," *Chem. Biol.*, vol. 5, pp. 587–595, 1998.
- [19] A. Roth, Z. Weinberg, A. G. Y. Chen, P. B. Kim, T. D. Ames, and R. R. Breaker, "A widespread self-cleaving ribozyme class is revealed by bioinformatics.," *Nat. Chem. Biol.*, vol. 10, no. 1, pp. 56–60, 2014.
- [20] D. Eiler, J. Wang, and T. A. Steitz, "Structural basis for the fast self-cleavage reaction catalyzed by the twister ribozyme.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 111, no. 36, pp. 13028–33, 2014.
- [21] Y. Liu, T. J. Wilson, S. a McPhee, and D. M. J. Lilley, "Crystal structure and mechanistic investigation of the twister ribozyme.," *Nat. Chem. Biol.*, vol. 7, no. July, pp. 1–7, 2014.
- [22] A. Ren, M. Košutić, K. R. Rajashankar, M. Frener, T. Santner, E. Westhof, R. Micura, and D. J. Patel, "In-line alignment and Mg<sup>2+</sup> coordination at the cleavage site of the env22 twister ribozyme.," *Nat. Commun.*, vol. 5, p. 5534, 2014.
- [23] K. M. Nezbeda Ivo, Kolafa Jiří, *Úvod do počítačových simulací*. Praha: Karolinum, 1998.
- [24] W. D. Cornell, P. Cieplak, C. I. Bayly, I. R. Gould, K. M. Merz, D. M. Ferguson, D. C. Spellmeyer, T. Fox, J. W. Caldwell, and P. A. Kollman, "A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids, and organic molecules," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 117, no. 19, pp. 5179–5197, 1995.
- [25] M. Zgarbova, M. Otyepka, J. Sponer, A. Mladek, P. Banas, T. E. C. III, and P. Jurecka, "Refinement of the Cornell et al. nucleic acid force field based on reference quantum chemical calculations of torsion profiles of the glycosidic torsion," *J. Chem. Theory Comput.*, vol. 7, pp. 2886–2902, 2011.
- [26] A. Pérez, I. Marchán, D. Svozil, J. Sponer, T. E. Cheatham, C. A. Loughton, and M. Orozco, "Refinement of the AMBER force field for nucleic acids: improving the description of alpha/gamma conformers.," *Biophys. J.*, vol. 92, no. 11, pp. 3817–29, 2007.
- [27] W. L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J. D. Madura, R. W. Impey, and M. L. Klein, "Comparison of simple potential functions for simulating liquid water," *J. Chem. Phys.*, vol. 79, no. 2, p. 926, Jul. 1983.
- [28] I. S. Joung and T. E. Cheatham, "Determination of alkali and halide monovalent ion parameters for use in explicitly solvated biomolecular simulations," *J. Phys. Chem. B*, vol. 112, no. 30, pp. 9020–9041, 2008.
- [29] C. S. Gaines and D. M. York, "Ribozyme Catalysis with a Twist: Active State of the Twister Ribozyme in Solution Predicted from Molecular Simulation," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 17, no. 1, p. jacs.5b12061, 2016.