

U n i v e r z i t a P a l a c k é h o v O l o m o u c i

Fakulta přírodovědecká

Katedra fyzikální chemie



Strukturní dynamika RNasy H2

Bakalářská práce

Autor:

Petra Hubáčková

Školitel:

Mgr. Petra Kührová Ph.D.

Studijní program:

B 1407 Chemie

Studijní obor:

Aplikovaná chemie

Forma studia:

Prezenční

Olomouc 2016

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svoji bakalářskou práci napsala samostatně pod odborným vedením Mgr. Petry Kührové Ph.D. Veškeré literární prameny a zdroje, které jsem v této práci použila, jsou uvedeny v seznamu literatury.

V Olomouci dne

.....

Petra Hubáčková

Poděkování

Tím to bych ráda poděkovala vedoucí mé bakalářské práce Mgr. Petře Kührové Ph.D a doc. Mgr. Pavlu Banášovi Ph.D, za cenné připomínky a rady, ale také za čas, který mi věnovali při vypracování této práce. Také děkuji své rodině za podporu při studiu.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora:	Petra Hubáčková
Název práce:	Strukturní dynamika RNasy H2
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	Katedra fyzikální chemie
Vedoucí práce:	Mgr. Petra Kührová Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2016
Abstrakt:	Tato bakalářská práce se zabývá RNasou H2, která je zde v komplexu s RNA/DNA hybridem. V teoretické části je charakterizovaná struktura a aktivní místo enzymu. Také jsou zde popsány metody molekulární dynamiky a mechaniky. Praktická část je zaměřena na studium chování struktury v molekulární dynamice. Je zde pozorován vývoj systému v čase a jeho stabilita. Zkoumá se zde vliv mocností kladně nabitých iontů přítomných v aktivním místě. Tyto molekulárně dynamické simulace byly provedeny pomocí nástrojů, které jsou obsaženy v softwarovém balíku AMBER 12.
Klíčová slova:	RNasa H2, RNA/DNA hybrid, molekulárně dynamické simulace
Počet stran:	60
Jazyk:	Český

Bibliographic identification:

Author's first name and surname: Petra Hubáčková

Title: The structural dynamics of RNase H2

Type of thesis: Bachelor thesis

Department: Department of physical chemistry

Supervisor: Mgr. Petra Kůhrová Ph.D.

Year of presentation: 2016

Abstract: This bachelor thesis is focused on behavior of the RNase H2 in complex with RNA/DNA hybrid. The theoretical part deals with characterization of the studied structure and description of the active site of an enzyme. Moreover, there are also described methods of the molecular dynamics and mechanics. The practical part presents results of molecular-dynamics simulations of RNase H2 complex. Attention is concentrated on behavior the active site and the influence of the valence of positively charged ions presented in the active site. The molecular-dynamic simulations were conducted using the tools contained in the software pack AMBER 12.

Key words: RNase H2, RNA/DNA hybrid, molecular dynamics simulation

Number of pages: 60

Language: Czech

Obsah

1 ÚVOD	8
2 TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1 NUKLEOVÉ KYSELINY	9
2.1.1 <i>Struktura nukleových kyselin</i>	9
2.1.2 <i>Struktura DNA</i>	9
2.1.3 <i>Struktura RNA</i>	10
2.1.4 <i>RNA/DNA hybrid</i>	12
2.2 PROTEINY	12
2.2.1 <i>Struktury proteinů</i>	13
2.3 ENZYMY	15
2.3.1 <i>Názvosloví a klasifikace enzymů</i>	15
2.3.2 <i>Hydrolasy</i>	15
2.3.3 <i>RNasa H</i>	16
2.3.4 <i>RNasa H2</i>	17
2.4 POČÍTAČOVÉ SIMULACE	19
2.4.1 <i>Molekulová mechanika</i>	20
2.4.2 <i>Molekulární dynamika</i>	22
2.4.3 <i>Silové pole</i>	23
3 METODY	24
3.1 MOLEKULÁRNĚ DYNAMICKÉ SIMULACE	24
3.2 ANALÝZA MD TRAJEKTORIÍ	24
3.3 MĚŘENÉ HODNOTY.....	25
3.3.1 <i>RMSD</i>	25
3.3.2 <i>B-faktor</i>	25
3.3.3 <i>Sekundární struktura</i>	26
3.3.4 <i>Dihedrání úhly</i>	26
4 VÝSLEDKY	27
4.1 STABILITA SYSTÉMU	27
4.1.1 <i>Systém 2Mg_ff10_1</i>	27
4.1.2 <i>Systém 2Mg_ff10_2</i>	30
4.1.3 <i>Systém 2Mg_ff12</i>	33
4.1.4 <i>Systém 2Na_ff12_1</i>	35
4.1.5 <i>Systém 2Na_ff12_2</i>	38
4.1.6 <i>Systém 2Na_ff10</i>	41
4.1.7 <i>Systém Mg/Wat_ff10</i>	44
4.1.8 <i>Systém Na/Wat_ff10</i>	47
4.2 ZMĚNA KONFORMACE AKTIVNÍHO MÍSTA PŘI MINIMALIZACI A VYHŘÍVÁNÍ	49

5	ZÁVĚR	53
6	SUMMARY	55
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	57

1 Úvod

Metody molekulové dynamiky jsou moderní metody, které jsou v dnešní době hodně využívány. Staly se nepostradatelné nejen pro vědní obory, jako jsou chemie a fyzika. Představují také alternativu k experimentálním výzkumům. Hodně se využívají u výzkumu biomakromolekul.

Teoretická část je rozčleněna na několik oddílů. První se věnuje nukleovým kyselinám. Je zde popsána struktura DNA a RNA. Poté je zde zmíněna struktura RNA/DNA hybridu, ta je důležitá pro zkoumání strukturní dynamiky RNasy H2. Protože enzym RNasa H je jediný enzym, který štěpí RNA v RNA/DNA hybridu. Po obecných kapitolách o proteinech a enzimech se zde pojednává o samotné RNase H2. Teoretická část je zakončena kapitolou o počítačových simulacích, které byly k této práci využity.

Praktická část se zaměřuje na chování systému RNasy H2 v molekulové dynamice. Použitá krystalová struktura PDB ID: 3O3F se skládá z RNasy H2, z RNA/DNA hybridu a dvou Mg^{2+} iontů v aktivním místě. Cílem bakalářské práce bylo zaměřit se na strukturní dynamiku RNasy H2. Proto bylo spuštěno několik simulací, u kterých se sledoval vývoj systému v čase a jeho stabilita. Také byl zkoumán vliv mocností kladně nabitých iontů, jejich počet a poloha v aktivním místě, na strukturní dynamiku tohoto aktivního místa. Studovány byly Mg^{2+} a Na^+ ionty.

Molekulárně dynamické simulace probíhaly za využití programového balíku AMBER 12, který je vhodný pro simulace nukleových kyselin i proteinů.

2 Teoretická část

2.1 Nukleové kyseliny

Nukleové kyseliny rozdělujeme na dvě třídy, deoxyribonukleovou (DNA) a ribonukleovou (RNA) kyselinu. DNA uchovává genetickou informaci, zatím co RNA je důležitá při genové expresi a biosyntéze bílkovin [1].

2.1.1 Struktura nukleových kyselin

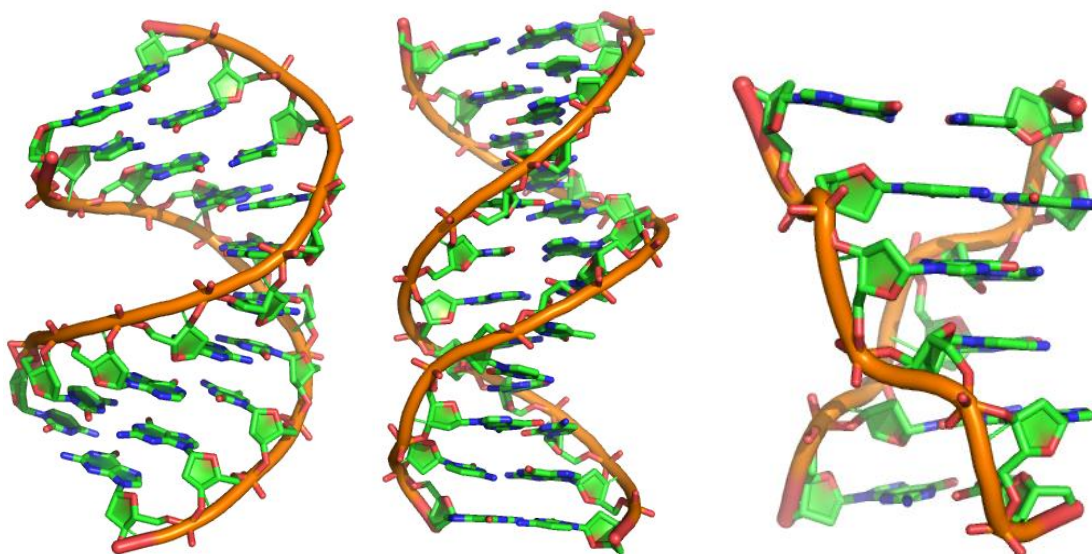
Nukleové kyseliny jsou makromolekuly, které jsou složeny z několika pravidelně se opakujících podjednotek tzv. nukleotidů. Nukleotid obsahuje tři složky. Fosfátovou skupinu, pětiuhlíkatý cukr a cyklické dusíkaté složky tzv. báze. Cukernou složkou je v DNA 2-deoxyribóza a v RNA ribóza. Součástí nukleové kyseliny jsou většinou čtyři báze, které dělíme podle uhlíkového cyklu na purinové a pyrimidinové. Purinovými jsou adenin a guanin, ty se vyskytují jak v RNA, tak i v DNA. U pyrimidinovýchází je to rozdílné. DNA obsahuje cytosin a thymin, kdežto RNA cytosin a uracil. Chemické složení RNA a DNA se od sebe liší velmi málo. Změna v cukerné složce, tj. v hydroxylové skupině v pozici 2 na ribóze, vede k velkým rozdílům ve struktuře a také v párováníází. Z těchto důvodů je DNA většinou dvoušroubovice, kdežto RNA se vyskytuje často jako jednovláknový polymer a vytváří složité 3D struktury. Tyto struktury RNA vznikají, protože OH skupina představuje proton, donor i akceptor, navíc schopný vytvářet vodíkové vazby [2].

2.1.2 Struktura DNA

V roce 1953 byl sestaven strukturní model DNA pány Watsonem a Crickem. Tento model potvrdil, že DNA kóduje genetickou informaci a replikuje se. DNA je pravotočivá dvouvláknová šroubovice, ve které se polynukleotidové řetězce otáčejí navzájem kolem sebe ve spirále. Tyto řetězce jsou složeny ze sekvence nukleotidů spojených navzájem fosfodiesterovými vazbami a ty propojují sousední deoxyribózové skupiny. Dvě polynukleotidová vlákna jsou držena pohromadě vodíkovými můstky mezi báze opačných vláken. Báze se nacházejí uvnitř šroubovice a cukr-fosfátová páteř vně. Důležité je zde specifické párováníází. Adenin s thyminem a guanin s cytosinem. V obou případech se purinová (větší bicyklická báze) páruje s pyrimidinovou (menší monocyklickouází). To vychází z možnosti tvorby vodíkových vazeb báze v jejich běžné konfiguraci. Pokud dojde ke splnění těchto pravidel párování, jsou tyto vlákna dvoušroubovice DNA

komplementární. Toto komplementární párování umožňuje párům bází, aby zaujmuly energeticky nejvýhodnější konformaci v rámci dvoušroubovice. Páry bází jsou od sebe vzdálené 0,34 nm a jedna otočka je tvořena 10 páry bází. Cukr-fosfátové páteře, nacházející se na komplementárních vláknech, jsou antiparalelní. To znamená, že polarita jednoho řetězce je opačná k polaritě řetězce druhého. [2][3]

Existuje několik helikálních struktur DNA, z nich nejvýznamnější jsou A-DNA, B-DNA a Z-DNA. Za normálních podmínek se v buňkách převážně nachází B-DNA, která má pravotočivou strukturu a na jednu otočku zde připadá 10 párů bází. Průměr dvoušroubovice jsou 2 nm. A-DNA je jako B-DNA pravotočivá, ale má širší a více plochý tvar. Jeden závit této struktury obsahuje 11 párů bází, které svírají s rovinou dvoušroubovice úhel 20 stupňů. Vytváří se zde poměrně velká axiální dutina. Průměr A-DNA je 2,3 nm. U A-DNA a B-DNA se struktura opakuje po každém páru. Poslední významnou strukturou je Z-DNA, která na rozdíl od zbylých dvou je levotočivá. Obsahuje 12 párů bází na otočku a její průměr je 1,8 nm. Struktura se zde opakuje po každých dvou párech [4].

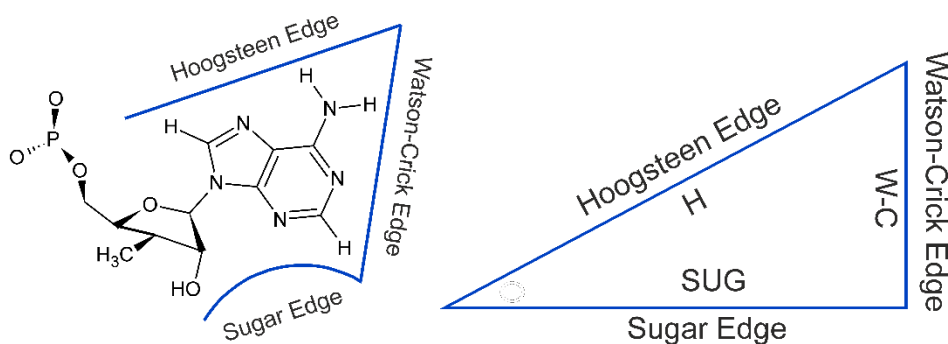


Obrázek 1: Helikální struktury DNA: A-DNA (PDB ID: 213D), B-DNA (PDB ID: 1BNA), Z-DNA (PDB ID: 2DCG)

2.1.3 Struktura RNA

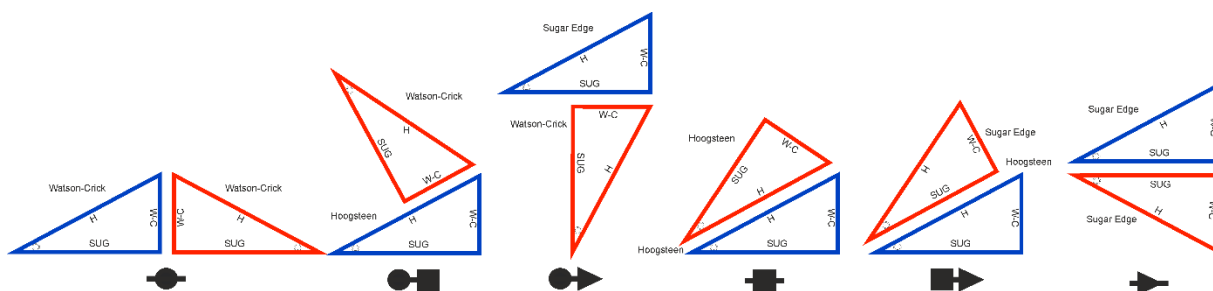
RNA je nejčastěji jednořetězcová molekula, která se může na základě párování bází sbalit do různých tvarů. U RNA se na základě Watson-Crickových principů komplementarity kanonicky páruje adenin s uracilem a guanin s cytosinem [3]. Kromě kanonického párování se v RNA strukturách se lze potkat i s nekanonickým párováním. Každá nukleová báze má tři

hrany představující pravoúhlý trojúhelník. Přepona představuje Hoogstenovu hranu (Hoogsteen edge) a odvěsny znázorňují Watson-Crickovu (Watson-Crick edge, WC) a hranu cukru (Sugar edge, SE). Klasifikace a nomenklatura dle párování těchto RNA bází zavedl Leontis a Westhof v roce 2001 [5]. Navíc tato klasifikace obsahuje vzájemné orientace glykosidických vazeb spojující báze páru s jejich cukernými složkami. Celkem můžeme hovořit o 12-ti rodinách s celkem 168 možnostmi párování.

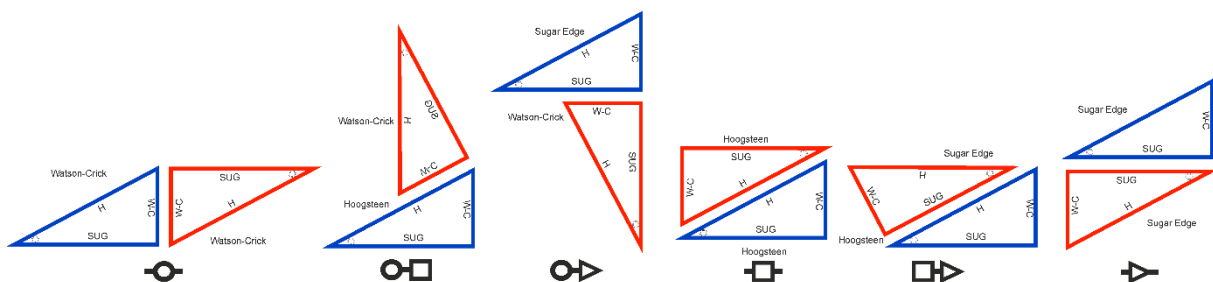


Obrázek 2: Znázornění hran nukleové báze RNA. V pravém obrázku znázorňuje nukleovou bázi trojúhelník.

Cis páry bází



Trans páry bází



Obrázek 3: 12 rodin párů bází. Kruhy značí Watson-Crickovu, čtverce Hoogstenovu hranu a trojúhelníky hranu cukru. Černé tvary patří cis párům bází a bílé trans párům bází.

RNA, tak jako DNA a proteiny, tvoří primární, sekundární, terciární a kvartérní struktura. Primární struktura je pořadí bází v polynukleotidovém řetězci. Směr zápisu je vždy od 5' konce ke 3' konci. Dále dochází k párování bází na základě tvorby vodíkových můstků,

to je označováno jako sekundární struktura. Terciární strukturu představuje prostorové uspořádání polynukleotidového řetězce. Tento řetězec je spojen van der Waalsovými interakcemi a vodíkovými vazbami [6]. Posledním stupněm organizace je kvartérní struktura, kde dochází k interakci RNA s dalšími molekulami RNA, DNA nebo proteinů [7]. Celkovým tvarem jsou potom 3D struktury, které jsou zodpovědné za funkci molekuly. Je známých několik motivů RNA, například tvar dvoušroubovice, vnitřní smyčka, vlásenka, junction, pseudouzlel, kissing loop a další.

RNA může zaujímat tvar dvoušroubovice. Na rozdíl od DNA, která je většinou v B-formě, tvoří RNA A-formu dvoušroubovice, která se liší tím, že je širší, má hlubší velký žlábek a méně hluboký malý žlábek. Další strukturou je vnitřní smyčka, kde se mezi spárovanými bázemi dvoušroubovice objeví v obou řetězcích naproti sobě báze, které jsou nespárované. RNA může vytvářet i vlásenkovou strukturu, kde na konci dvoušroubovice vlákno řetězce otočí a pokračuje jako druhý řetězec šroubovice. Důležitou strukturou je i junction, což je oblast nespárovaných nukleotidů, z nichž vychází tři nebo více dvoušroubovic. Strukturu pseudouzlu představuje spárování bází vlásenky s bázemi jiné oblasti RNA. Poslední zmíněnou strukturou RNA je kissing loop, což je spárování bází mezi dvěma vlásenkami [8].

2.1.4 RNA/DNA hybrid

RNA/DNA hybrid se vytváří během replikace a transkripce DNA. Existují tři typy tohoto hybridu. Prvním typem je jednoduchý RNA/DNA hybrid, kde je jedno vlákno RNA a další DNA. Druhý typ RNA-DNA/DNA hybridu je složen z dvoušroubovice DNA, kde jedno vlákno přechází v RNA tím, že nedochází ke kompletnímu odstranění RNA primeru z Okazakiho fragmentů. Posledním typem hybridu je DNA-RNA_{1-few}-DNA/DNA, ten se skládá z jednoho nebo několika ribonukleotidů vložených v dvoušroubovici DNA [9].

2.2 Proteiny

Proteiny jsou tvořeny řetězci více než 100 aminokyselin, které jsou spojeny kovalentními peptidovými vazbami. Nacházejí se ve tkáních všech živočichů a také způsobují jejich rozmanitost, tím že se aminokyseliny v proteinech vyskytují v proměnlivém počtu a pořadí. Z chemického hlediska jsou nejsložitější a také funkčně nejdůležitější molekuly, které jsou známy. Jsou složeny nejenom z uhlíku, vodíku, kyslíku a dusíku, ale velká část obsahuje síru

a některé i fosfor [10]. Vlastnosti jednotlivých aminokyselin se liší a to se odráží i na vlastnostech proteinů.

Protein se skládá z polypeptidové kostry a z postranních řetězců, který má každá aminokyselina jiný. Postranní řetězce nejsou součástí peptidové vazby. Polypeptidová kostra v bílkovině se může skládat téměř nekonečně mnoha způsoby, protože kovalentní vazba v polypeptidovém řetězci umožňuje volné otáčení atomů kolem vazby. Každý řetězec je stabilizován mnoha nekovalentními vazbami, tyto vazby jsou mezi atomy v kostře i mezi atomy v postranním řetězci. Slabé ne vazebné interakce jsou vodíkové vazby, iontové interakce, van der Waalsovy interakce a hydrofobní interakce. Tyto interakce jsou mnohonásobně slabší než kovalentní vazba. Stabilita určitého tvaru je závislá na síle mnoha nekovalentních vazeb. Protein se skládá do konformace, která je pro něj nejvýhodnější tím, že má nejnižší energii [3].

2.2.1 Struktury proteinů

Bílkovinnou strukturu charakterizuje primární, sekundární, terciární a kvartérní úroveň. Primární struktura představuje sekvenci aminokyselin. Aminokyseliny v sekvenci jsou mezi sebou vázány kovalentní vazbou [11]. Sekvence proteinů je stálá a má přesné chemické vlastnosti. Ty protein potřebuje ke své funkci. Záměna několika atomů v jedné aminokyselině, čili mutace jedné aminokyseliny na jinou, může zničit celou strukturu proteinu. To má za následek ztrátu funkce [3]. Oproti tomu zbylé tři úrovně charakterizují prostorové uspořádání a pro jejich formování hrají klíčovou roli slabé interakce [11].

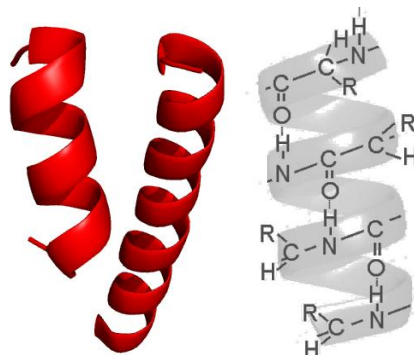
Sekundární struktura

Sekundární strukturu představují úseky peptidového řetězce s definovanou konformací, které jsou stabilizované vodíkovými můstky [1]. Sekundární struktury jsou rozděleny do několika tříd. Těmi jsou α -helix a další helixy, β -skládaný list, β -otočka (β -ohyb, těsná otočka) a nakonec β -výduť. Nejběžnějšími jsou α -helix a β -skládaný list [11].

α -helix (α -šroubovice)

Tato struktura byla předpovězena pány Linusem Pauligem a Robertem Coreym v roce 1951. Poprvé byla nalezena v keratinu a je nejčastější ze sekundárních struktur [3]. Keratin se vyskytuje v kůži, vlasech a v rozích. Peptidové řetězce jsou uspořádány do šroubovice, kde na každou otočku vychází 3,6 residuí a výška závitů je 0,54 μm . Šroubovice je

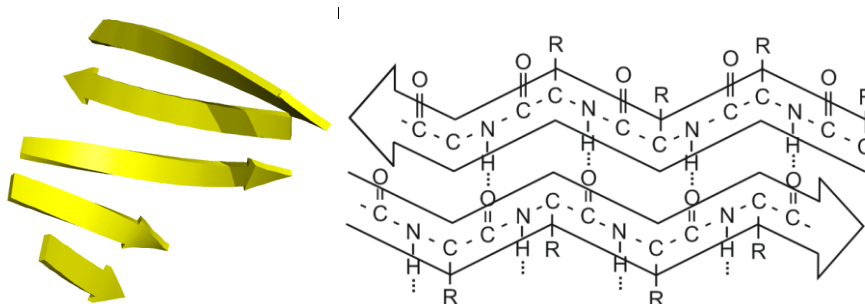
stabilizována vodíkovými můstky, které jsou téměř paralelní s osou šroubovice [1]. Tvoří se mezi každou čtvrtou peptidovou vazbou a spojují N-H jedné peptidové vazby a C=O skupinu jiné peptidové vazby [3].



Obrázek 4: α -šroubovice a uspořádání polypeptidové kostry v ní

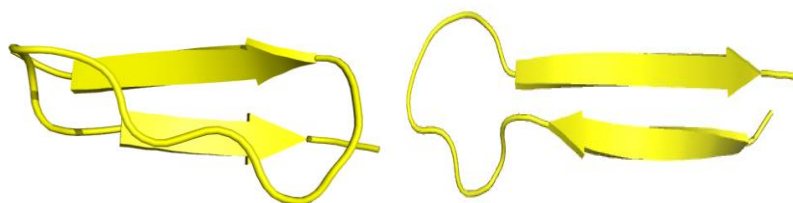
β -skládaný list

Navrhnut stejnými pány jako α -helix. β -skládaný list byl objeven v proteinu fibrinu. Ten je hlavní složkou hedvábí. U β -listu se spojují vodíkovými můstky dva sousední polypeptidové řetězce, které zůstávají téměř lineární [3].



Obrázek 5: β -skládaný list a uspořádání polypeptidové kostry v něm.

Jsou známy dvě konformace β -skládaného listu, paralelní a antiparalelní. Paralelní β -list je tvořen sousedními polypeptidovými řetězci se stejnou orientací a antiparalelními řetězci s opačnou orientací [1].



Obrázek 6: Vlevo paralelní β -list, vpravo antiparalelní β -list

Terciární a kvartérní struktura

Terciární úroveň je trojrozměrná konformace proteinů, která se skládá z elementů sekundární struktury a z neuspořádaných částí. Spousta proteinů se navzájem váže pomocí nekovalentních interakcí do komplexů, které reprezentují kvartérní strukturu [1].

2.3 Enzymy

Jsou to bílkoviny, jejichž schopností je katalýza chemických reakcí. Při ní dochází k usnadnění průběhu reakce. Některé reakce by ani bez katalyzátoru nemohly proběhnout, proto jsou enzymy nepostradatelné. Katalytické enzymy mohou být tvořeny jen peptidovými řetězci nebo obsahují i nebílkovinné součásti, které nazýváme kofaktory.

2.3.1 Názvosloví a klasifikace enzymů

Dříve byly enzymy nazývány podle jejich výskytu a celkové funkce na organismus. Vzhledem k tomu, že enzymů začalo značně přibývat, bylo nutné zavést systematické názvosloví. To označuje enzymy podle typu reakce, kterou katalyzují.

Existuje šest hlavních tříd enzymů. Ty jsou kódované číslem, před kterým jsou písmena EC. První číslo EC kódu představuje třídu, druhé podtřídu, třetí podpodtřídu a čtvrté pořadové číslo enzymu v podpodtřídě. Mezi hlavní třídy enzymů patří oxidoreduktasy (katalyzují oxidačně redukční procesy), transferasy (přenášejí skupiny z jedné sloučeniny na druhou), hydrolasy (katalyzují hydrolytické štěpení vazeb), lyasy (štěpení vazeb, ale jiným způsobem než hydrolýzou nebo oxidací), isomerasy (katalyzují změny na jedné molekule), ligasy (katalyzují sloučení dvou molekul za současného hydrolytického štěpení difosfátu v ATP) [12].

2.3.2 Hydrolasy

Katalyzují hydrolýzu štěpení různých vazeb. Patří sem řada enzymů trávicího traktu. Ke své aktivitě velmi často potřebují kovové ionty, ale reakce probíhají bez přítomnosti koenzymů. U hydrolas se podtřídy dělí podle toho, na jaký typ vazby daný enzym působí. Například enzymy štěpící glykosidy na disacharidy až monosacharidy jsou glykosidasy, nebo enzymy štěpící esterovou vazbu se nazývají esterázy, a do této podtřídy patří i RNasa H2. [12][13]

2.3.3 RNasa H

RNasa H je ribonukleotidová specifická endonukleáza. Je to jediný enzym, který štěpí RNA vlákno v RNA/DNA hybridech [14]. Hydrolyza RNA vlákna probíhá na vazbě O3'-P a vznikají 3'-hydroxylové a 5'-fosfátové koncové skupiny [15]. Existují dva typy tohoto enzymu RNasa H1 a H2. Liší se preferencí substrátu, uspořádáním v aktivním místě a biochemickými vlastnostmi. Typ 1 je neaktivnější na DNA/RNA hybridu, který obsahuje několik po sobě jdoucích nukleotidů. Tato RNasa není aktivní v DNA substrátu, který obsahuje jen jeden vložený ribonukleotid. Zatímco k aktivitě druhého typu stačí pouze jeden ribonukleotid vložený v dvoušroubovici DNA [14]. Díky schopnosti RNasy H2 štěpit jednoduché ribonukleotidy, může se tento enzym účastnit replikace a opravy DNA [9].

RNasa H byla nalezena ve všech třech tradičních kategoriích přírodních objektů, jako jsou archebakteria, prokaryota a eukaryota. Organismy obvykle obsahují oba známé typy enzymu, s výjimkou některých archaeí. RNasa H1 je nezbytnou součástí retrovirové reverzní transkriptázy [9]. U jednobuněčných organismů způsobuje mutace enzymu H1 zpomalení růstu, ale na rozdíl od savců nemá smrtící účinky. Myši umírají v průběhu embryogeneze v důsledku poruchy mitochondriální replikace DNA [15]. Mutace lidské RNasy H2 způsobuje Aicardi-Gutiéres syndrom (AGS). Příznaky jsou podobné jako při virové infekci získané v děloze. Tato porucha významně ovlivňuje nervovou soustavu [9].

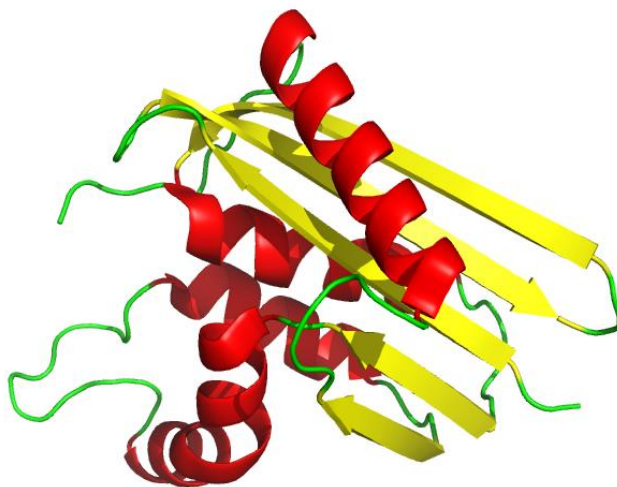
Eukaryotická RNasa H2 je složená ze tří podjednotek. H2A je katalytická a H2B a C jsou podpůrné podjednotky [9]. Všechny tyto podjednotky jsou důležité pro aktivitu enzymu. Pro nejlepší funkci je jejich optimální poměr 1:1:1 [14]. Mutace některé z těchto podjednotek může mít za následek AGS. Z toho plyne, že defekt RNasy H2 vede k nahromadění DNA/RNA hybridu, který aktivuje vrozenou imunitní odpověď [9].



Obrázek 7: Podjednotky eukaryotické RNasy H2: H2A, H2B a H2C (PDB ID: 3P5J)

Jednou z hlavních funkcí RNasy H je odstranění RNA primeru z Okazakiho fragmentů. Důležité je také to, že se účastní modulace iniciace replikace pomocí zpracování tzv. R-smyček a obnovování topologie DNA [16].

RNasa H patří do RISF (retroviral integrase superfamily). Enzymy, které se řadí do této skupiny, jsou si strukturně i mechanicky velmi podobné. Skládají se z katalytického jádra, kde je hlavní částí pět vláken β -skládaného listu. Tři z nich jsou antiparalelní a dvě vlákna paralelní. β -skládané listy jsou obklopené několika různě rozmístěnými α -šroubovicemi. Aktivní místo RISF enzymů, a tedy i RNasy H, je primárně složeno z kyseliny asparagové a glutamové. RNasa H má v aktivním místě absolutně konzervovaný motiv DED(D/E). První a třetí kyselina asparagová je u obou typů RNasy H i u ostatních RISF enzymů stejně uspořádaná. První aminokyselina je lokalizovaná uprostřed prvního vlákna v centrálním β -listu a třetí na konci čtvrtého vlákna. U druhé a čtvrté aminokyseliny tohle neplatí, protože se nachází v rozdílných částech katalytického jádra u RNasy H1 a H2. Aktivní místo RNasy H je negativně nabitě a váže dvojmocný kovový iont, který je nezbytný pro katalytickou aktivitu. Nejčastěji tímto iontem bývá Mg^{2+} a dále také Mn^{2+} [9].



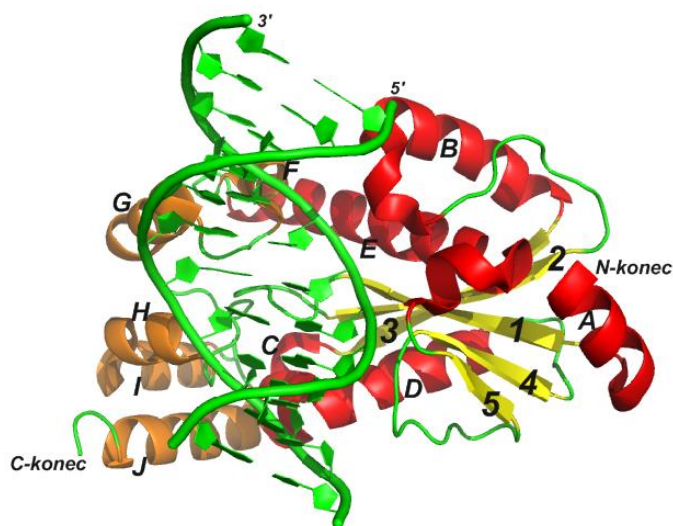
Obrázek 8: Sekundární struktura RNasy H (PDB ID: 3O3F)

2.3.4 RNasa H2

Struktura RNasy H2

RNasa H2 je složena ze dvou domén, N-koncové a C-koncové. N-koncová doména je tvořena katalytickým jádrem, kde je hlavním prvkem β -skládaný list. Tři z nich jsou dlouhá antiparalelní vlákna (Obrázek 9: 1, 2, 3) a dvě krátká paralelní vlákna (Obrázek 9: 4, 5).

Centrální β -skládaný list je obklopen dvěma šroubovicemi (Obrázek 9: C, D) z jedné strany a třemi (Obrázek 9: A, B, E) ze strany druhé. Na rozdíl od RNasy H a ostatních RISF enzymů, má RNasa H2 jednu nebo dvě šroubovice vložené mezi druhým a třetím antiparalelním vláknem β -skládaných listu. U Tm-RNasy H2 je vložen pouze jeden helix. Zatím co N-koncová doména je tvořena β -skládanými listy i α -šroubovicemi, C-koncová doména se skládá pouze z 5-šroubovic (Obrázek 9: F-J) [9].



Obrázek 9: Struktura Tm-RNasy H2 v komplexu s RNA/DNA hybridem (PDB ID: 3O3F)

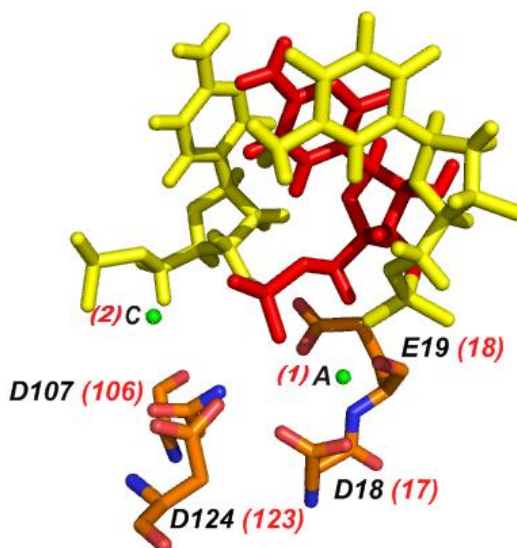
Aktivní místo RNasy H2

Aktivní místo Tm-RNasy H2 má absolutně konzervovaný motiv DEDD. Aminokyselinový postranní řetězec D18 a E19 je umístěn na konci prvního vlákna, D107 na C-konci čtvrtého vlákna a D124 na smyčce před šroubovicí E. Umístění aktivního místa v molekule je znázorněné na obrázku (Obrázek 10). Tyto čtyři aminokyseliny se společně s dvojmocnými kovovými ionty a atakujícími molekulami vody podílejí na štěpení vazby O3'-P.

Struktura obsahuje tři kovové ionty vázané v aktivním místě. Dva z nich jsou ve velmi podobné poloze jako u RNasy H1 a u ostatních RISF enzymů. Tyto ionty jsou označeny písmeny A, B a C. V mutantní struktuře Tm-RNasy H2 D107N kovový iont B chybí, což je způsobeno mutací aminokyseliny D107N. Proto ve všech strukturách zobrazených v této práci jsou pouze dva kovové ionty A (iont č. 1) a C (iont č. 2).

Koordinace iontu B je nepravidelná na rozdíl od iontu A. Iont B se nachází v blízkosti postranních řetězců aminokyselin D18, E19 a D107. Koordinace iontu A je oktahedrání

a poměrně pravidelná. Nachází se v blízkosti D18 a E19. Tento iont koordinuje i dvě molekuly vody. Jedna z nich je natočená tak, že může nukleofilně atakovat fosfát. Poslední iont C se nachází poblíž D107 a D124. V těchto konfiguracích ionty vytváří koordinační vazby s výše uvedenými aminokyselinami aktivního místa, s kyslíky na štěpené fosfátové spojce a s molekulami vody, které se rovněž podílí na štěpení [9].



Obrázek 10: Aktivní místo Tm-RNasy H2. Struktura DNA má žlutou barvu, RNA červenou a oranžové jsou aminokyseliny aktivního místa. Černá čísla residuí jsou z krystalografické struktury a červená čísla jsou čísla residuí z MD simulace.

2.4 Počítačové simulace

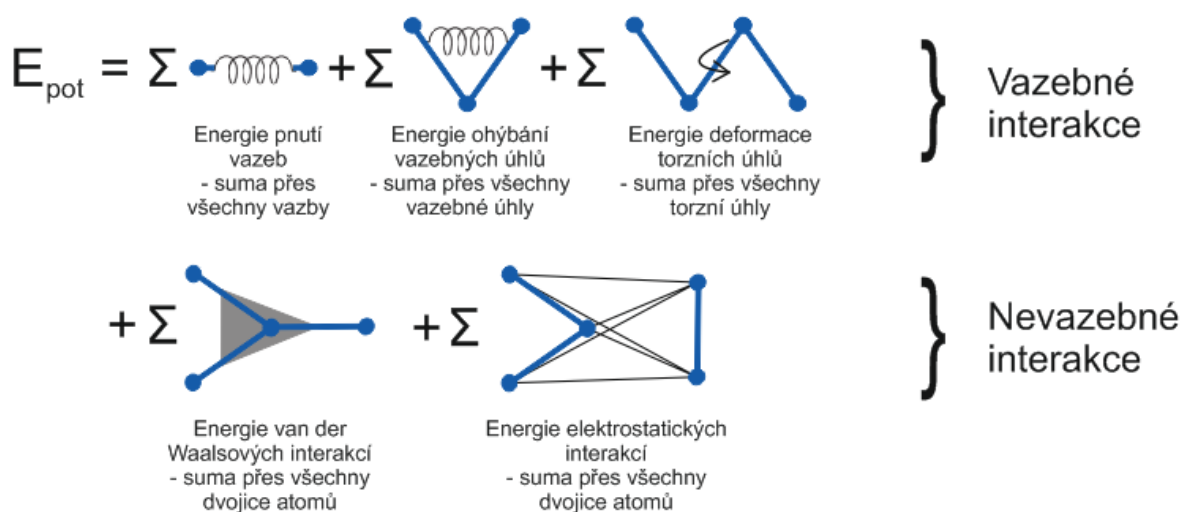
Počítačové simulace se v dnešní době staly nepostradatelnou součástí nejenom chemie, ale i fyziky a dalších vědních oborů. Pomocí nich se systém pozoruje na atomární úrovni. Simulace představují alternativu k experimentům. Jsou výhodné pro experimenty, které jsou z nějakého hlediska neproveditelné, ať už jsou nebezpečné nebo drahé. K popisu pohybu atomů a molekul se zde využívá klasická nebo kvantová mechanika. Klasická mechanika je výpočetně méně náročná, proto se používá pro rozsáhlejší systémy [17].

Pro počítačové simulace je velmi důležitý výběr vhodné metody, podle povahy systému, který studujeme. Nejpoužívanějšími metodami je kvantová mechanika QM, molekulová mechanika MM a molekulová dynamika MD.

2.4.1 Molekulová mechanika

Molekulová mechanika je založena na principech klasické fyziky. Ta popisuje molekuly jako soubor atomů, které využívají Newtonových zákonů [18]. Princip je na rozdíl od kvantové mechaniky založen na zanedbání pohybu elektronů a vliv na výpočet energie systému mají pouze jádra. Výpočty jsou mnohem jednodušší, méně výpočetně náročné a pomocí ní řešíme obsáhlejší simulace za krátký čas. Používá se u velkých systémů obsahujících více než sto atomů. Tato metoda má i své nevýhody, nelze provést výpočet vlastností závislých na distribuci elektronů v systému. MM je parametrickou metodou, kde přesnost parametrů definuje kvalitu výsledků [19].

V molekulové mechanice je model molekuly popisován pomocí kuliček, které reprezentují atomy a pružinek o různé tuhosti, ty znázorňují vazby [18]. Tím že dojde ke změně délky vazby, musí systém vynaložit energii. Touto metodou se vyhledává nejvýhodnější prostorové uspořádání, které má nejmenší možnou potenciální energii systému. Dochází k optimalizaci molekuly [20]. Interakce atomů jsou v molekulové mechanice vazebné a nevazebné [18].



Obrázek 11: Vazebné a nevazebné interakce [20]

Členy potenciální energie v molekulární mechanice

V molekulové mechanice se výpočet potenciální energie dá rozdělit na několik složek. K popisu těchto složek složí jednoduché mechanické modely.

Vazebné interakce

Jednou z vazebných interakcí je kovalentní vazba, jejíž energie závisí na délce vazby. K jejímu popisu se využívá harmonický oscilátor. Výpočet potenciální energie vyjadřuje tento vztah

$$V_{bonds}(r_{ij}) = \frac{1}{2} k_{ij}^b (r_{ij} - b_{ij})^2 \quad (1)$$

r_{ij} představuje aktuální vzdálenost jader, b_{ij} ideální vzdálenost jader a k_{ij} silovou konstantu vazby, která je odvozena z Hookova zákona.

Popis pomocí harmonického oscilátoru se užívá i u příspěvku energie vazebných úhlů

$$V_{angles}(\theta_{ijk}) = \frac{1}{2} k_{ijk}^\theta (\theta_{ijk} - \theta_{ijk}^0)^2 \quad (2)$$

θ_{ijk} představuje aktuální vazebný úhel jader, θ_{ijk}^0 rovnovážný vazebný úhel jader a k_{ijk}^θ silovou konstantu vazebného úhlu.

Úhly, které udržují rovinné molekuly planárními, se nazývají nepravé dihedrální. Platí pro ně:

$$V_{id}(\xi_{ijkl}) = \frac{1}{2} k_\xi (\xi_{ijkl} - \xi_{ijkl}^0)^2 \quad (3)$$

ξ_{ijkl} představuje aktuální velikost nepravého dihedrálního úhlu, k_ξ silovou konstantu úhlu a ξ_{ijkl}^0 ideální vzdálenost nepravého dihedrálního úhlu.

Energie deformace pravého dihedrálního úhlu, což je poslední člen vazebných interakcí, popisuje tento vztah

$$V_d(\phi_{ijkl}) = \sum_n k_n (1 + \cos(n\phi - \phi_{s,n})) \quad (4)$$

ϕ představuje aktuální velikost dihedrálního úhlu, ϕ_s fázové posunutí, k_n amplitudu příslušné harmonické složky potenciálu a n je periodičita dané harmonické složky.

Nevazebné interakce

Nevazebnými interakcemi jsou síly, kterými na sebe působí vzdálenější atomy. Některé interakce jsou mezi molekulami a další v rámci molekuly. Atomy musí být vzdálené nejméně tři vazby od sebe nebo nejsou spojené vůbec.

První ne vazebnou interakcí je elektrostatická. Tato interakce využívá Coulombův zákon

$$V_c(r_{ij}) = \frac{1}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r} \frac{q_i q_j}{r_{ij}} \quad (5)$$

r_{ij} představuje vzdálenost mezi atomy, ϵ_0 permitivitu vakua, ϵ_r relativní permitivitu vakua, q_i a q_j což jsou náboje atomů.

Van der Waalsovské interakce, představují další ne vazebné interakce. Posuzují se pomocí Lennard-Jonesova potenciálu. Tento potenciál popisuje vztah energii van der Waalsovské interakce vzdálenosti dvou atomů.

$$V_{JL} = 4\epsilon_{ij} \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \quad (6)$$

ϵ_{ij} představuje maximální energii přitažlivých sil, σ_{ij} kolizní průměr, což je vzdálenost jader, při nichž je interakční energie mezi atomy rovna nule, r_{ij} jsou vzdálenosti atomů. První člen rovnice vyjadřuje repulzi. K ní dochází při přiblížení atomů. Druhým členem rovnice je člen disperzní, který popisuje přitažlivost atomů v důsledku Londových disperzních sil.

Výše uvedené členy jsou základní v molekulové mechanice. Ve výpočtu se můžou upravovat a také zavádět nové specifické členy. Členy a jejich parametry pro jednotlivé atomy vytváří silové pole [21].

2.4.2 Molekulární dynamika

Simulační metody určují makroskopické vlastnosti daného systému pomocí mikroskopického modelu. Mezi tyto metody se řadí Monte Carlo a molekulová dynamika.

Monte Carlo je metoda, která náhodně prohledává konfigurační prostor v systému. Výsledkem jsou statistické vlastnosti zkoumaného celku.

Molekulová dynamika je deterministická metoda, která na rozdíl od Monte Carla popisuje statistické i dynamické vlastnosti systému [18]. Je založena na Newtonových pohybových rovnicích

$$\vec{f}_i = m_i \vec{a}_i = m_i \frac{d^2 \vec{r}_i}{dt^2} \quad (7)$$

kde f_i je síla působící na částice, m_i hmotnost, a_i zrychlení částic, r představuje polohový vektor a t čas.

V molekulové dynamice většinou dochází k překonávání energetické bariéry mezi konformačními stavy molekuly a může se tak hledat lokální i globální energetické minimum. Výsledek představuje trajektorie, která popisuje změnu polohy a rychlosti částic v systému v závislosti na čase. Dále také informuje o struktuře a dynamických vlastnostech celého systému. Získané trajektorie se po té analyzují vhodnými nástroji, jako například balíčkem AMBER [22].

2.4.3 Silové pole

Kvalitu molekulárně dynamických simulací kriticky ovlivňuje výběr silového pole, které poskytuje parametry pro funkci potenciální energie systému. Silové pole také popisuje parametry vazeb, vazebných úhlů, pravých a nepravých dihedrálních úhlů. Kromě nich také zahrnují parametry nevazebných interakcí. Tyto údaje jsou základní pro charakteristiku silového pole. Mimo ně je zde i seznam atomových typů. Ten obsahuje informace o interakcích atomových typů s rozdílnými vazebnými partnery. Při kombinaci všech popsanych parametrů vzniká model, který popisuje jednoduché molekuly nebo i složité systémy, jako jsou proteiny či nukleové kyseliny [23].

Dnes mezi nejpoužívanější modely pro simulace patří silová pole AMBER [22], CHARMM [24], GROMACS [21], OPLS [25] a další.

3 Metody

V této kapitole je popsána příprava systému a nastavení MD simulací. Kromě toho je zde přibliženo zpracování výsledků z analýzy krystalu a MD simulací. Výchozí souřadnice struktury pro tuto práci byly získány z PDB proteinové databáze pod kódem 3O3F. Struktura byla vyřešena v roce 2010 pomocí RTG strukturní analýzy s rozlišením 2 Å. Krystalová struktura se skládá z enzymu RNasy H2 (222 aminokyseliny), z RNA/DNA hybridu (12 residuí DNA v prvním řetězci RNA/DNA hybridu a v druhém řetězci 11 residuí DNA a 1 residuum RNA) a dvou Mg^{2+} iontů v aktivním místě. Pro zjištění vlivu iontů v aktivním místě na stabilitu systému, byly simulace puštěny s různými počty iontů v aktivním místě. Také byl zkoumán vliv mocenství kladně nabitých iontů přítomných v aktivním místě tj. rozdíl v chování Mg^{2+} a Na^+ .

3.1 Molekulárně dynamické simulace

Výpočty probíhaly pomocí molekulárně dynamických simulací za využití programového balíku AMBER 12 a silových polí *ff10* a *ff12SB* [26]. Struktura byla v simulacích dána do pravoúhlého boxu, popřípadě do oktahedráního boxu a byla solvatována explicitním vodním modelem SPC/E [27]. Z důvodů neutralizace záporného náboje a nastavení iontové síly uvnitř boxu, byly přidány sodné a chloridové ionty ve fyziologické koncentraci 0,15 mol/l. Ionty byly umístěny nástrojem LEaP a jejich parametry byly následující: Na^+ ($r = 1.2120$ Å, $\epsilon = 0.3526$ kcal/mol [28]) a Cl^- ($r = 2.711$ Å, $\epsilon = 0.0127$ kcal/mol [28]). Takto připravená molekula byla výchozím bodem molekulové dynamiky a studia dalších parametrů. Struktura byla minimalizována a vyhřívána v několika krocích. Poté byla spuštěna samotná dynamika na časové škále 1 μs za teploty 298,16 K.

3.2 Analýza MD trajektorií

Všechny uskutečněné simulace jsou shrnuty v tabulce č. 1. Simulace byly analyzovány nástrojem *ptraj*, který je součástí programového balíku AMBER. Tímto nástrojem se ze zkoumané struktury odstranily molekuly vody a ionty, kromě iontů přítomných v aktivním místě. Dále byly pomocí něj vypočítány RMSd (Root Mean Square deviation) odchylky, B-faktory, vývoj sekundárních struktur proteinů, vzdálenosti atomů a dihedrální úhly páteře RNA/DNA v blízkosti aktivního místa. K zobrazování molekuly byl použit program PyMOL

a k vizualizacím trajektorií program VMD. Také byl využit program Gnuplot k vytvoření grafů. Obrázky byly zhotoveny programem Corel Draw X7.

Tabulka 1: Přehled provedených simulací

Číslo simulace	Označení simulace	Iont (y) přítomný/é v aktivním místě	Počet iontů přítomných v aktivním místě	Silové pole	Čas simulace
1	2Mg_ff10_1	Mg ²⁺	2	ff10	1 μs
2	2Mg_ff10_2	Mg ²⁺	2	ff10	1 μs
3	2Mg_ff12	Mg ²⁺	2	ff12sb	1 μs
4	2Na_ff12_1	Na ⁺	2	ff12sb	1 μs
5	2Na_ff12_2	Na ⁺	2	ff12sb	1 μs
6	2Na_ff10	Na ⁺	2	ff10	1 μs
7	Mg/Wat_ff10	Mg ²⁺	1	ff10	1 μs
8	Na/ Wat_ff10	Na ⁺	1	ff10	1 μs

3.3 Měřené hodnoty

V této práci byly v simulacích měřeny hodnoty RMSd odchylky aktivního místa molekuly a celé biomolekuly. Dalšími hodnotami byly dihedralní úhly a vzdálenosti atomů u residuí hlavně v aktivním místě. Tyto údaje byly zobrazeny pomocí grafů. Také se hodnotil B-faktory aminokyselin v proteinu, které byly zpracovány do grafu a znázorněny ve struktuře.

3.3.1 RMSD

RMSd je střední kvadratická odchylka. Definuje se, jako střední kvadratická vzdálenost dvou atomů molekul nebo intramolekulární střední kvadratická vzdálenost atomů v molekule. Je-li RMSD počítáno od počáteční struktury, může sloužit k identifikaci nalezení času konformační změny.

$$RMSD_{(u \in U, v \in V)} = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N |w_i - v_i|^2} \quad (8)$$

N představuje počet atomů, w_i jsou polohové vektory atomů srovnávané molekuly a v_i polohové vektory týchž atomů v počátečním snímku trajektorie [22].

3.3.2 B-faktor

B-faktor (teplotní B-faktor) je definován následujícím vztahem:

$$B = 8\pi^2 \langle u^2 \rangle \quad (9)$$

Kde $\langle u^2 \rangle$ je střední kvadratické posunutí od průměrné polohy. B-faktor se udává v \AA^2 a označuje míru fluktuace vibračního pohybu různých částí struktury. Atomy s nízkým B-faktorem, patří k části struktury, která je rigidní a dobře uspořádaná. Zatímco ty s vysokým B-faktorem jsou umístěny ve flexibilní části struktury [29]. Hodnoty B-faktorů byly zobrazeny jak v grafu, tak přímo na struktuře, kdy jednotlivá rezidua byly obarveny podle hodnoty B-faktoru jejich těžiště.

3.3.3 Sekundární struktura

Stanovovala se sekundární struktura proteinu v průběhu simulace. Graf znázorňuje změny sekundární struktury za čas. Ta byla rozlišena pomocí Φ a Ψ torzí. Popisované třídy sekundární struktury jsou: α -helix, paralelní β -list, anti-paralelní β -list, 3_{10} helix, π -helix a otáčka (turn) [22].

3.3.4 Dihedrální úhly

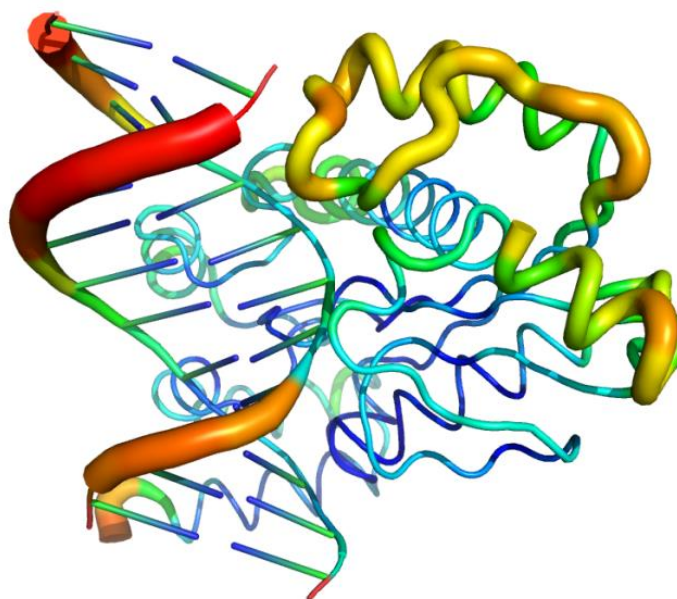
Dihedrální neboli torzní úhel je úhel mezi dvěma rovinami. Je charakterizován čtyřmi body. První rovina je definována prvním až třetím bodem a druhá rovina druhým až čtvrtým bodem. U nukleových kyselin jsou popisovány úhly alfa (α), beta (β), gama (γ), delta (δ), epsilon (ϵ) a zeta (ζ). Úhel alfa představují atomy $O3' - P - O5' - C5'$, beta $P - O5' - C5' - C4'$, gama $O5' - C5' - C4' - C3'$, gama $C5' - C4' - C3' - O3'$, epsilon $C4' - C3' - O3' - P$ a zeta $C3' - O3' - P - O5'$ (Obrázek 17) [30].

4 Výsledky

V této práci bylo provedeno celkem osm simulací, jak je rozepsáno v Tabulce č. 1. U tří simulací byly přítomny dva hořečnaté ionty v aktivním místě a u dalších tří byly hořečnaté ionty vyměněny za dva sodné ionty. Některé simulace byly pro kontrolu puštěny dvakrát (viz Tabulka č. 1). Dále byly analyzovány dvě simulace, kde u jedné byl do aktivního místa umístěn pouze jeden hořečnatý iont a u druhé pouze jeden sodný iont, přičemž pozice druhého iontu přítomného v krystalové struktuře v aktivním místě byla ve startovní struktuře obsazena molekulou vody.

4.1 Stabilita systému

Stabilita molekuly se stanovovala pomocí B-faktoru, sekundárních elementů a RMSd odchylky v každém bodě trajektorie. U všech simulací bylo vypočítáno RMSd celé molekuly a RMSd aktivního místa proteinu a jeho okolí. Byly zde zahrnuty residua 17, 18, 106, 123, 162, 239, 240 a 241 (viz. Obrázek 10.)

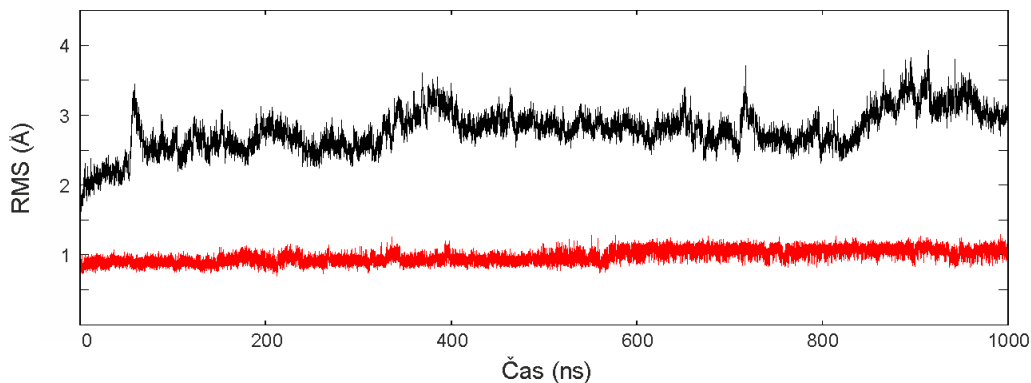


Obrázek 12: Na obrázku je znázorněna původní krystalografická struktura 3O3F obarvená dle hodnot B-faktoru jednotlivých residuí, pro porovnání se simulacemi.

4.1.1 Systém 2Mg_ff10_1

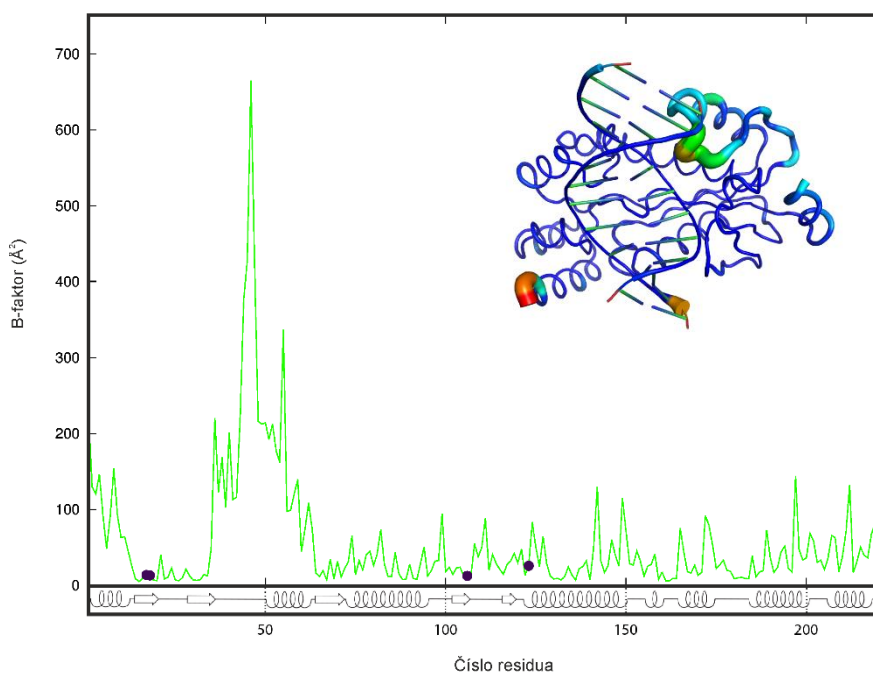
Systém 2Mg_ff10_1 má v aktivním místě přítomny dva Mg^{2+} ionty a byl spuštěn v silovém poli *ff10*. Silové pole *ff10* obsahuje pro proteiny pole *ff99SB* [31] a pro RNA/DNA molekuly pole *parmsc0* [32] a χ_{OL3} [33][34]. Průběh RMSd ukázal, že daný systém není

v průběhu simulace stabilní. Z grafu RMSd odchylky (Graf 1) celé struktury je vidět v čase 58 ns vychýlení, které se opakuje v rozmezí 350–370 ns, v 730 ns a ke konci simulace v 870 ns. Tyto výchylky dosahují 3,5 Å.

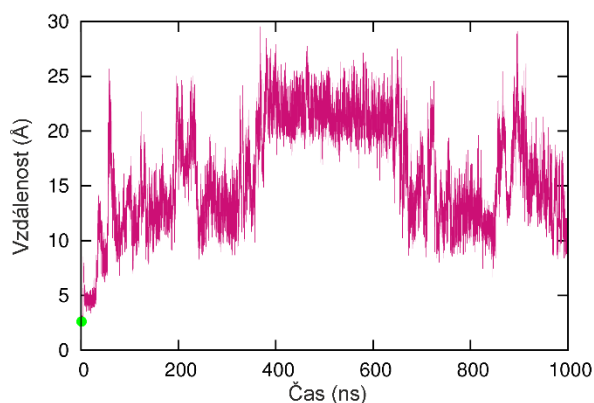


Graf 1: Grafické znázornění RMS odchylek v čase pro simulaci 2Mg_ff10_1. Červený graf značí RMS odchylku v aktivním místě a jeho okolí a černý graf RMS odchylku celé struktury.

Důvod těchto vychýlení je velmi dobře patrný z B-faktorů (Graf 2). V oblasti residuí 36-59 se molekula rozpadá a dochází zde k velké fluktuaci. Vysoké hodnoty B-faktoru byly také zaznamenány i na C-konci proteinového řetězce, ale v těchto místech jsou vysoké hodnoty očekávatelné díky vyšší flexibilitě koncových residuí. Nejvyšší B-faktor, kromě residua na C-konci, má lysin 46 (700 \AA^2). Ten je na začátku simulace umístěn blízko aktivního místa. Lys46 je součástí smyčky, která se v průběhu simulace oddaluje od aktivního místa a přibližuje se k okraji struktury a k α -šroubovici. Tato šroubovice není stabilní a v průběhu simulace dochází k jejímu rozpadu. Pohyb Lys46 byl dokumentován i měřením vzdálenosti od aktivního místa (Graf 3). Tato vzdálenost byla měřena od kyslíku (O2P) fosfátové skupiny residua C240 k dusíku (NZ) postranního řetězce Lys46 a dosahuje hodnot až 30 \AA .



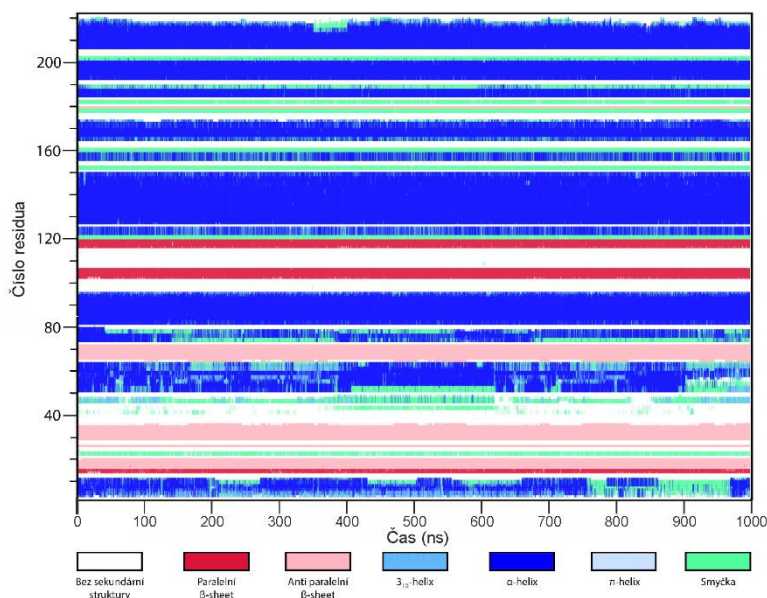
Graf 2: Grafické znázornění B-faktoru u residuí v simulaci 2Mg_ff10_1. Zelená čára značí B-faktor celého systému a fialové tečky residua v aktivním místě (D17, E18, D106 a D123).



Graf 3: Graf simulace 2Mg_ff10_1. Zelené kolečko označuje vzdálenost mezi lysinem 46 a kyslíkem fosfátové skupiny residua 240 na začátku simulace.

Globální chování systému 2Mg_ff10_1 dokumentuje graf sekundární struktury. U residuí aktivního místa se sekundární struktura příliš nemění. D17 a E18 jsou v průběhu celé simulaci součástí antiparalelního β -skládaného listu a D106 paralelního β -skládaného listu. U residua D123 dochází ke změnám. Po dobu simulace je nejčastěji ve struktuře α -šroubovice, ale vyskytuje se i v 3_{10} -šroubovici a ve smyčce. Viditelná nestabilita sekundárních elementů je na začátku (1-10 residuum) a na konci (217-222) proteinové struktury. Dále není struktura příliš stabilní mezi residui 36-63, kde v rozmezí 36-44 se střídají oblasti s otkou a oblasti

bez sekundární struktury a od 45 k nim přibývají ještě 3_{10} -šroubovice a α -šroubovice. Tato nestabilita byla už vidět i v grafu B-faktoru, kde v těchto místech docházelo k velkým fluktuacím. V simulaci je vidět nepravidelnost sekundární struktury i v oblasti residuí 73-78. Různorodá sekundární struktura je viditelná v oblasti residuí 156-158, kde se střídají α -šroubovice, 3_{10} -šroubovice a smyčka.



Graf 4: Graf sekundární struktury proteinu v simulaci 2Mg_ff10_1.

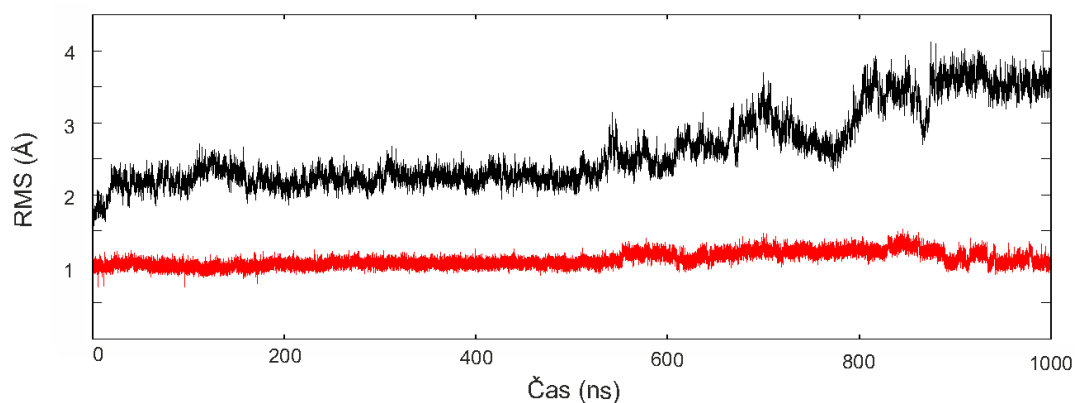
V průběhu MD simulace systému 2Mg_ff10_1, iont č. 1 (označení iontů aktivního místa viz Obrázek 10) téměř nezměnil své místo, ale iont č. 2 se přiblížil k residuu Asp123. Původní vzdálenost iontu Mg^{2+} od kyslíku (O2D) postranního řetězce Asp123 byla 3,5 Å po ukončení této simulace se zmenšila na 2 Å. Dále už nebyly zaznamenány žádné významné pohyby.

Systém 2Mg_ff10_1 není na časové škále 1 μ s stabilní. V průběhu simulace dochází k přeskupení residuí v blízkosti aktivního místa a tím k ovlivnění celé struktury aktivního místa.

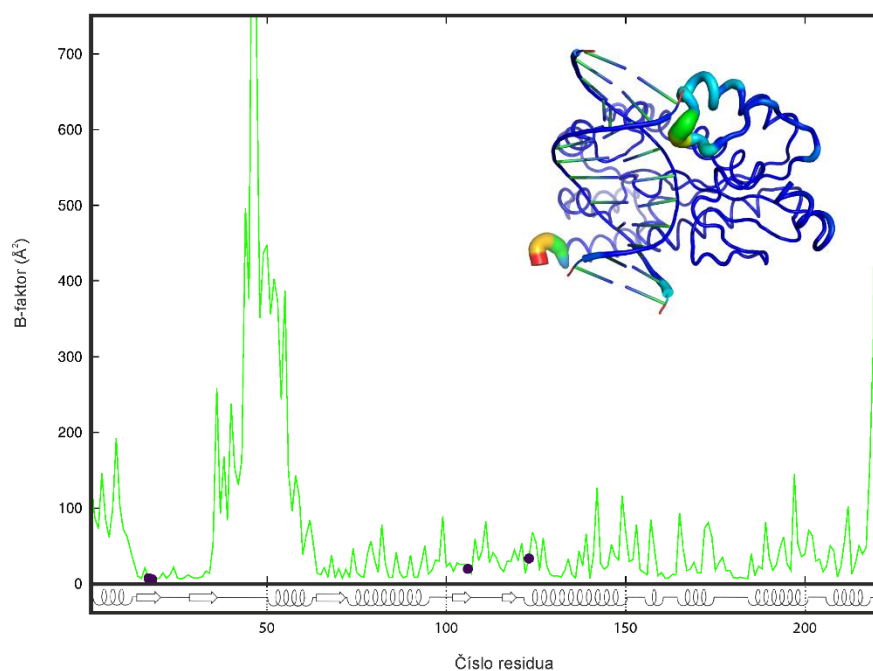
4.1.2 Systém 2Mg_ff10_2

Systém 2Mg_ff10 byl pro kontrolu spuštěn dvakrát. Tato kontrolní simulace nese označení 2Mg_ff10_2. I v tomto případě systém není na časové škále 1 μ s příliš stabilní. Nestabilita systému je dobře dokumentovaná v grafu celkové RMSd odchylky (Graf 5), kde dochází na konci simulace ke zvýšení RMS až k 4 Å. Pozvolný nárůst RMSd začíná v 700 ns

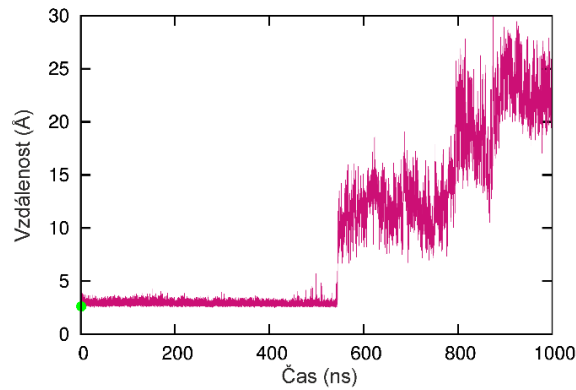
a trvá až do konce simulace, což je 1000 ns. Stejně jako v předchozím případě dochází k přemístění Lys46 z blízkosti aktivního místa. Lys46 je součástí smyčky spojené s α -helikální strukturou, která je velmi flexibilní (residua 36-62) a jejím pohybem dochází k narušení struktury celého aktivního místa (Graf 6). Pohyb lysinu 46 byl opět dokumentován měřením vzdálenosti od aktivního místa. Tato vzdálenost dosahuje hodnot až 30 Å.



Graf 5: Grafické znázornění RMS odchylek v čase pro simulaci 2Mg_ff10_2. Červený graf značí RMS odchylku v aktivním místě a jeho okolí a černý graf RMS odchylku celé struktury.

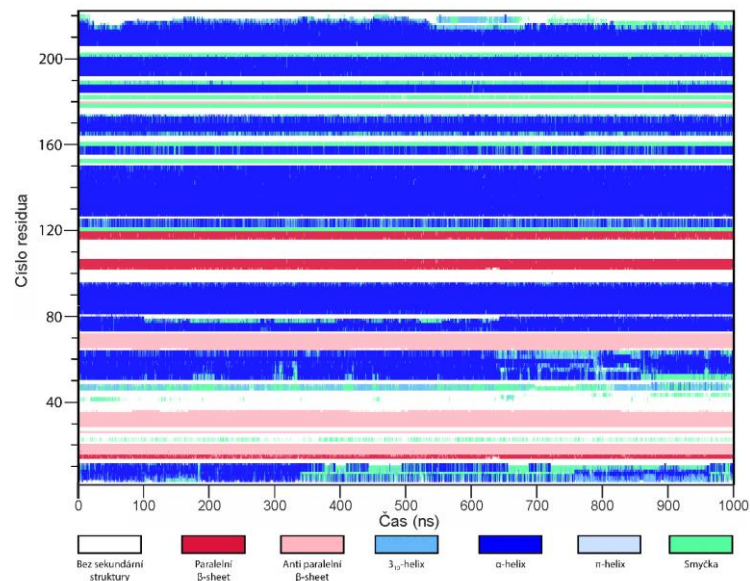


Graf 6: Grafické znázornění B-faktoru u residuí v simulaci 2Mg_ff10_2. Zelená čára značí B-faktor celého systému a fialové tečky residua v aktivním místě (D17, E18, D106 a D123).



Graf 7: Graf simulace 2Mg_ff10_2 Zelené kolečko označuje vzdálenost mezi lysinem 46 a kyslíkem fosfátové skupiny residua 240 na začátku simulace.

Vývoj sekundárních struktur u 2Mg_ff10_2 je podobný jako u předchozí simulace. U residuí aktivního místa se sekundární struktura příliš nemění. D17 a E18 jsou v průběhu celé simulaci součástí antiparalelního β -skládaného listu a D106 paralelního β -skládaného listu. U residuí, která mají vysoký B-faktor, dochází k největším změnám ve struktuře. Residuum D123 je nejčastěji ve struktuře α -šroubovice, ale vyskytuje se i v 3_{10} -šroubovici a ve smyčce. Viditelná nestabilita sekundárních elementů je na začátku (1-10 residuum) a na konci (217-222) proteinové struktury. Střídají se zde α -šroubovice, 3_{10} -šroubovice a smyčka. Dále není struktura příliš stabilní mezi residui 36-62, jak je vidět nejen v grafu B-faktorů, ale i v grafu sekundárních struktur. Nepravidelná sekundární struktura je také viditelná v oblasti residuí 156-158, kde se střídají α -šroubovice, 3_{10} -šroubovice a smyčka.



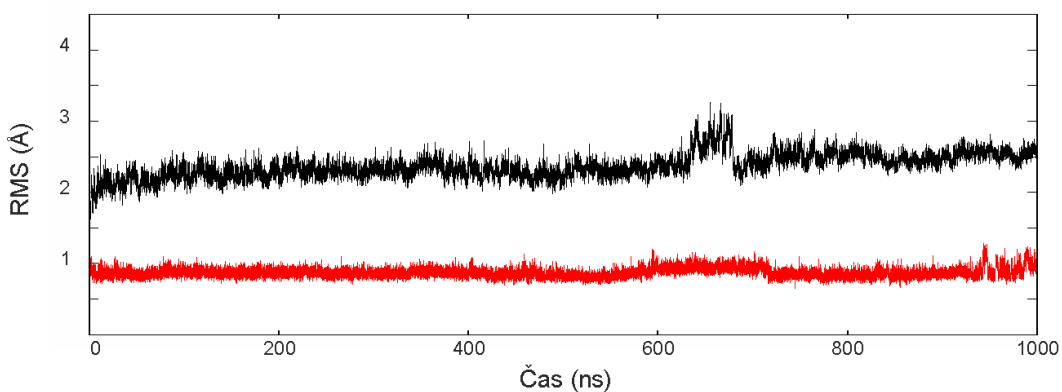
Graf 8: Graf sekundární struktury proteinu v simulaci 2Mg_ff10_2.

Tak jako u předchozích výsledků systému 2Mg_ff10_2 i pohyb iontů je podobný simulaci 2Mg_ff10_1. Zatím co iont č. 1 zůstává téměř bez pohybu, ion č. 2 se v průběhu 1 μ s posune o 5 Å od své startovní pozice. Iont č. 2 se přiblížil k residuu Asp 123. Vzdálenost 3,5 Å, která byla měřena od kyslíku postranního řetězce Asp123, se zmenšila na 1,9 Å.

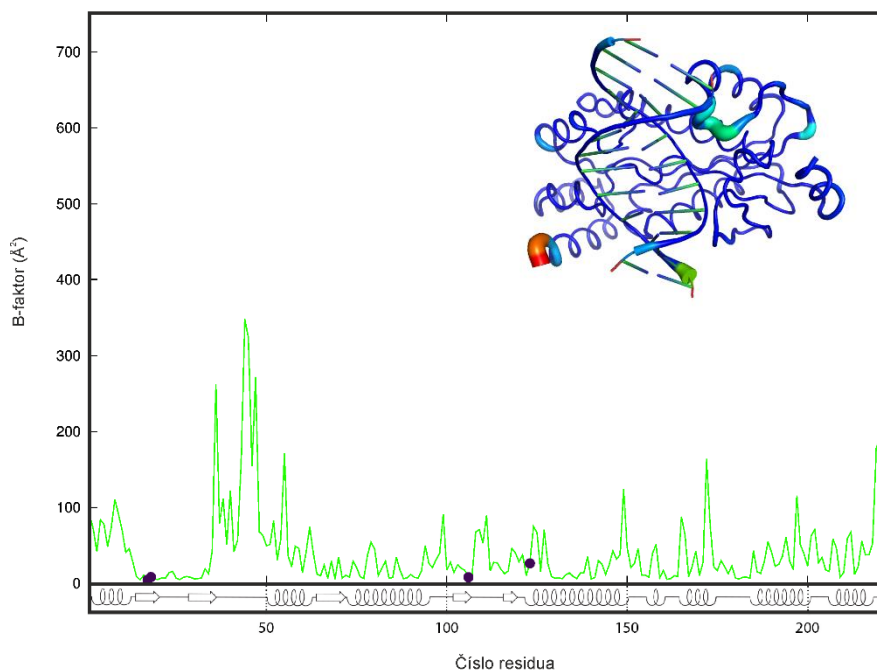
Kontrolní systém 2Mg_ff10_2 potvrdil výsledky první simulace 2Mg_ff10_1. Během MD simulace, která trvá 1 μ s, dojde ke změnám v oblasti aktivního místa. Proto tento systém není stabilní.

4.1.3 Systém 2Mg_ff12

V simulaci 2Mg_ff12 jsou v aktivním místě taktéž dva Mg^{2+} ionty. Tato simulace na rozdíl od dvou předchozích byla spuštěna v jiném silovém poli, a to v ff12SB [35]. Systém 2Mg_ff12 je celkově o něco stabilnější než předchozí dvě simulace tj. 2Mg_ff10. V grafu celkové RMS odchylky je vidět výraznější skok pouze v čase 650–700 ns, kde hodnota RMS dosahuje 3,3 Å. Z grafu B-faktorů je patrná zvýšená flexibilita residuí 36-55, ale ne tak velká jako v předešlých dvou systémech. Mimo to, se velká fluktuace objevila i na C-konci proteinového řetězce.

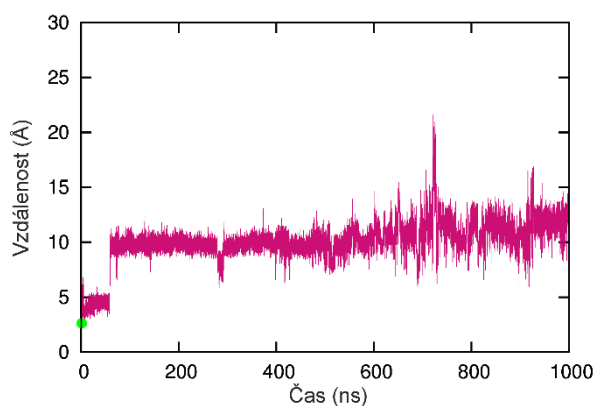


Graf 9: Grafické znázornění RMS odchylek v čase pro simulaci 2Mg_ff12. Červený graf značí RMS odchylku v aktivním místě a jeho okolí a černý graf RMS odchylku celé struktury.



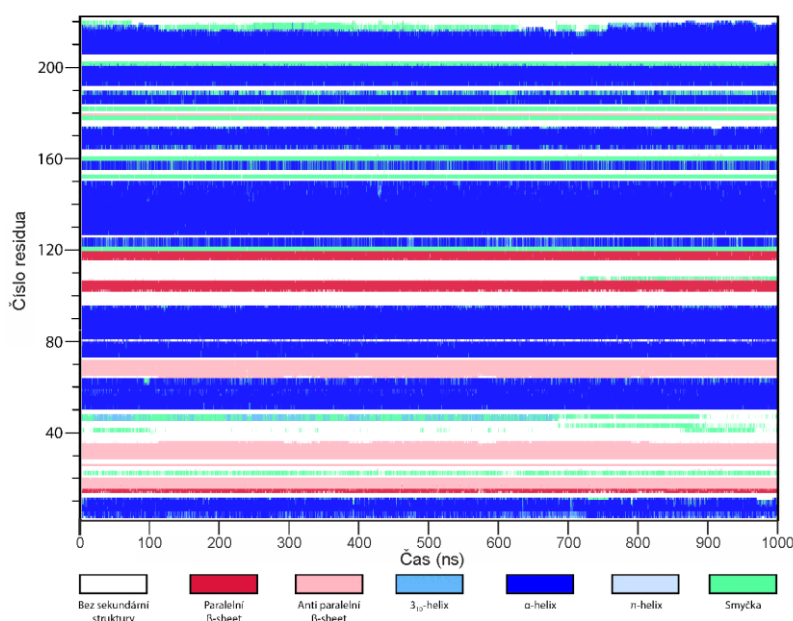
Graf 10: Grafické znázornění B-faktoru u residuí v simulaci 2Mg_ff12. Zelená čára značí B-faktor celého systému a fialové tečky residua v aktivním místě (D17, E18, D106 a D123).

Nejvyšší B-faktor, kromě residua na C-konci, nemá jako v předchozích simulacích lysin 46, ale kyselina asparagová 44 a serin 45. Tyto residua jsou na začátku simulace poblíž aktivního místa. Jsou součástí stejné smyčky jako Lys46. Ta se v průběhu simulace opět oddaluje od aktivního místa a přibližuje se k okraji struktury k α -šroubovici. I když v této simulaci nemá lysin tak vysoký B-faktor (154 \AA^2), byl zaznamenán významný pohyb Lys46 od aktivního místa.



Graf 11: Graf simulace 2Mg_ff12 Zelené kolečko označuje vzdálenost mezi lysinem 46 a kyslíkem fosfátové skupiny residua 240 na začátku simulace.

Graf vývoje sekundárních struktur je podobný jako v předchozích simulacích. Větší rozdíl je v chování residuí 1-10. Tato část proteinové struktury je na rozdíl od předchozích simulací stabilní. Nestabilita sekundárních elementů na konci (217-222) proteinové struktury zůstává. Střídají se zde α -šroubovice, 3_{10} -šroubovice a smyčka. Dále není struktura příliš stabilní mezi residui 36-50 (smyčka a část α -helixu s Lys46), jak je vidět v grafu. Tato nestabilita je už potvrzena grafem B-faktoru, kde v těchto místech docházelo k velkým fluktuacím. Nepravidelná sekundární struktura je viditelná v oblasti residuí 156-158, kde se střídají α -šroubovice, 3_{10} -šroubovice a smyčka.



Graf 12: Graf sekundární struktury proteinu v simulaci 2Mg_ff12.

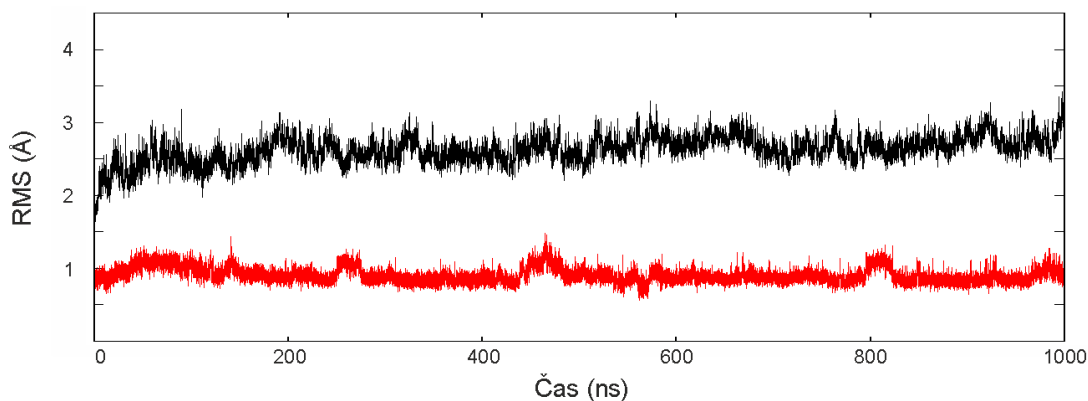
I když simulace 2Mg_ff12 probíhala v jiném silovém poli, umístění iontů během simulace bylo stejné jako u simulací 2Mg_ff10. Iont č. 2 se opět přiblížil k residuu Asp123 na 2 Å. Dále už nedocházelo k zásadním změnám v systému.

Celkový pohled na výsledky systému 2Mg_ff12 se jevil stabilněji než u simulací 2Mg_ff10, ale i tak byla ovlivněna struktura aktivního místa, a to tím, že se residua v aktivním místě za 1 μ s přemístily.

4.1.4 Systém 2Na_ff12_1

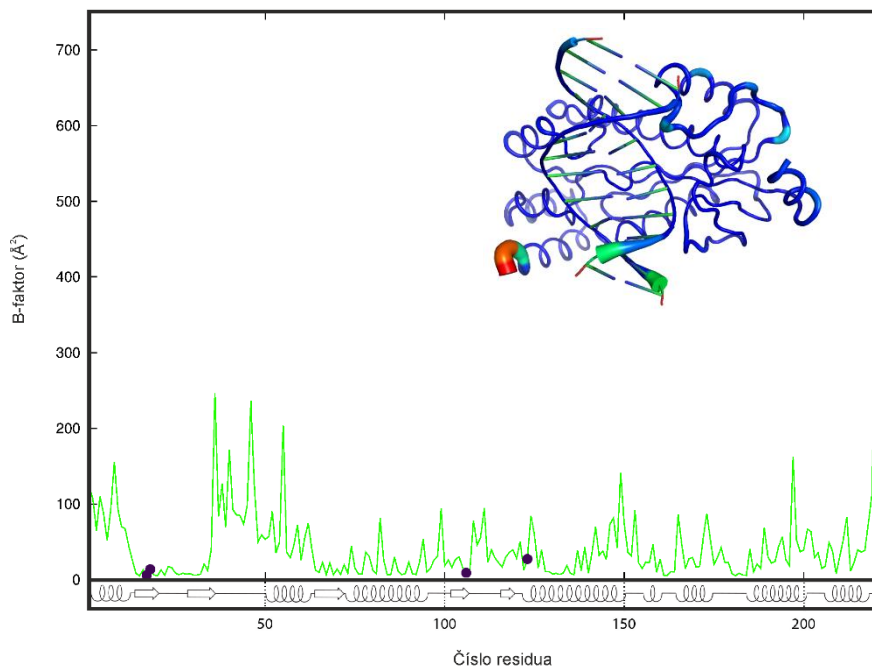
Systém 2Na_ff12_1 má v aktivním místě přítomny dva Na^+ ionty a jak je patrné z označení systému, bylo použito silové pole *ff12SB* v kombinaci s *parmbc0* a χ_{OL3} . Stabilita

tohoto systému je vyšší než u systémů, kde jsou v aktivním místě dva Mg^{2+} ionty. RMSd odchylka celé struktury vypadá podobně jako u předchozích simulací. Pohybuje se v rozmezí 2-3 Å. Rozdíly jsou patrné u RMSd odchylky aktivního místa, ta na první pohled ukazuje více výchylek než ve strukturách s dvěma Mg^{2+} ionty.



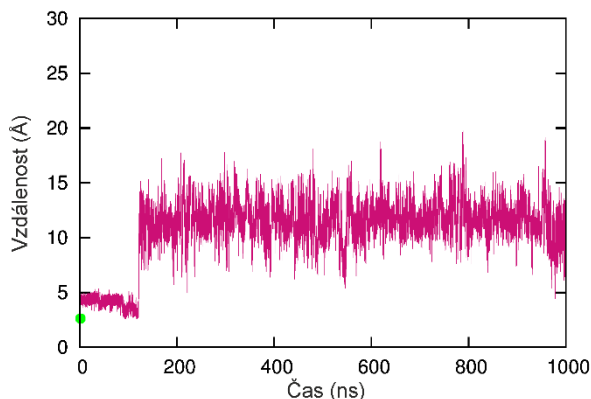
Graf 13: Grafické znázornění RMS odchylek v čase pro simulaci 2Na_ff12_1. Červený graf značí RMS odchylku v aktivním místě a jeho okolí a černý graf RMS odchylku celé struktury.

Stabilita systému je velmi dobře podchycena strukturou obarvenou pomocí B-faktorů. V grafu (Graf 14) je patrná mnohem menší fluktuace mezi 36-59 oproti simulacím se dvě Mg^{2+} ionty.



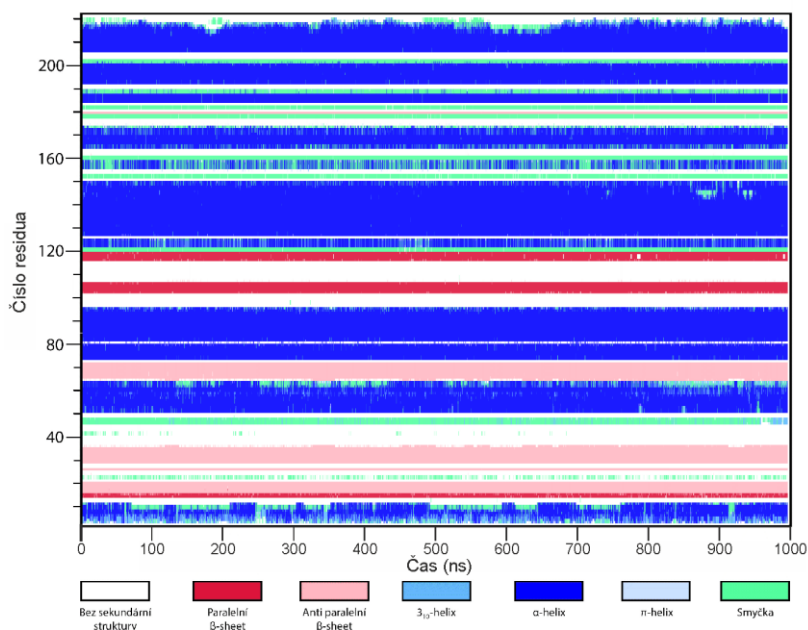
Graf 14: Grafické znázornění B-faktoru u residuí v simulaci 2Na_ff12_1. Zelená čára značí B-faktor celého systému a fialové tečky residua v aktivním místě (D17, E18, D106 a D123).

Lys46, který v předchozích simulacích vykonává velký pohyb z aktivního místa je zde stabilnější, jeho fluktuace není tak výrazná. Hodnota B-faktoru lysinu je 236 \AA^2 . V této simulaci nemá lysin tak vysoký B-faktor a jeho vzdálenost od aktivního místa dosahuje hodnot 15 \AA , což je méně než ve všech předchozích simulacích, nicméně i tak pozorujeme jeho odchod z aktivního místa (Graf 15).



Graf 15: Graf simulace 2Na_ff12_1 Zelené kolečko označuje vzdálenost mezi lysinem 46 a kyslíkem fosfátové skupiny residua 240 na začátku simulace.

Viditelná nestabilita sekundárních elementů je na začátku (1-10 residuum) a na konci (217-222) proteinové struktury. Střídají se zde α -šroubovice, 3_{10} -šroubovice a smyčka. V rozmezí vyššího B-faktoru residuí 36-59 je sekundární struktura docela stabilní, na rozdíl do předchozích systémů. Nepravidelná sekundární struktura je viditelná ještě v oblasti residuí 156-158, kde se taktéž střídají α -šroubovice, 3_{10} -šroubovice a smyčka.



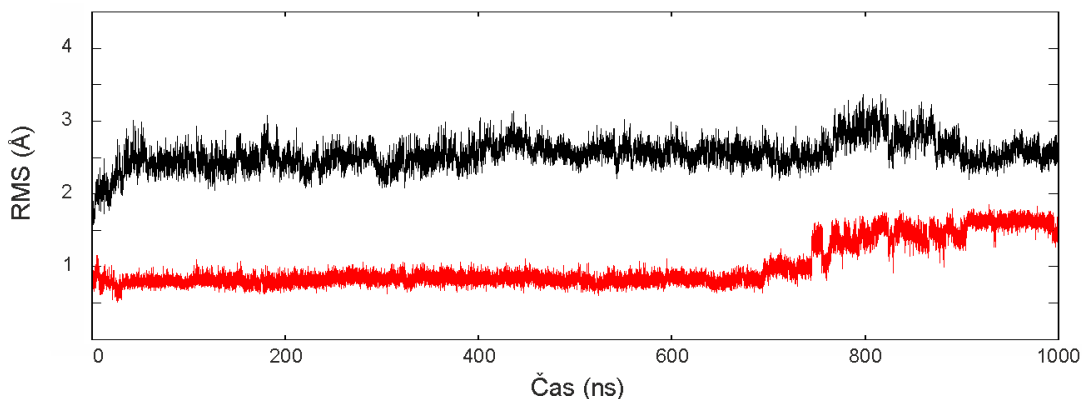
Graf 16: Graf sekundární struktury proteinu v simulaci 2Na_ff12_1.

Sodné ionty se v této simulaci chovaly jinak, než ionty Mg^{2+} ve výše popsaných systémech. Iont č. 1 se v průběhu simulace posunul o 3,8 Å. Výsledkem tohoto pohybu je přiblížení iontu č. 1 k residuu Asp106 a C240, ale oddálení od ostatních residuí, kterými byl koordinován. K tomuto jevu došlo potom, co iont č. 2 opustil aktivní místo a zároveň se do okolí aktivního místa dostaly další dva Na^+ ionty.

Stabilita systému 2Na_ff12_1 je větší než u systémů 2Mg_ff10 a 2Mg_ff12, ale i v tomto případě dochází ke změnám ve struktuře aktivního místa. Pohybují se zde některá residua a velký pohyb je zde dokumentován i u iontů.

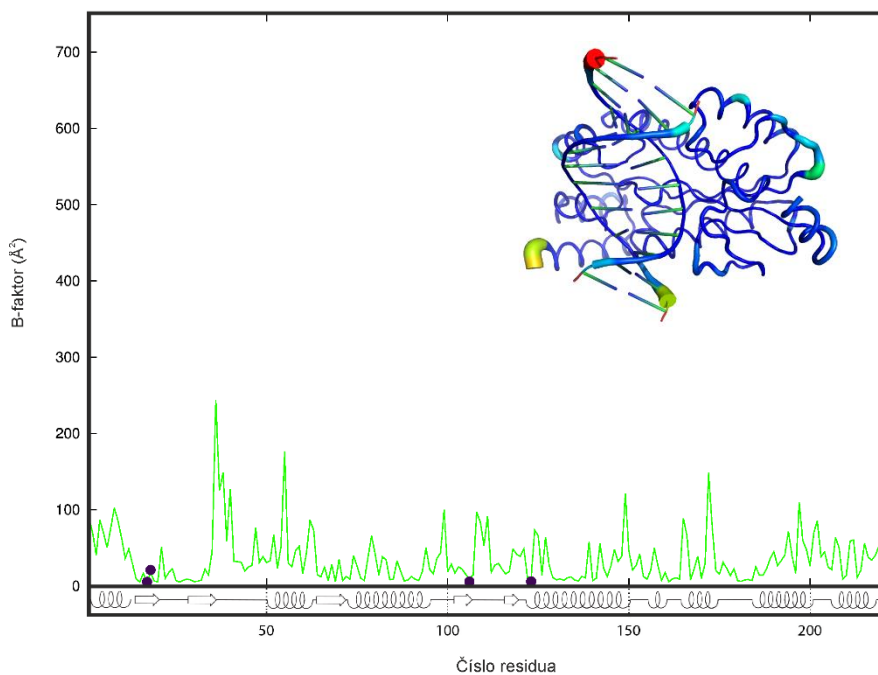
4.1.5 Systém 2Na_ff12_2

Kontrolní systém 2Na_ff12_2 má v aktivním místě přítomny dva Na^+ ionty. Stabilita tohoto systému je opět vyšší než u systémů, kde jsou v aktivním místě dva Mg^{2+} ionty. RMSd odchylka celé struktury vypadá podobně jako u předchozích simulací. Dochází zde k nepravidelným výchylkám a hodnoty se pohybují mezi 2-3,5 Å. Rozdíly jsou u RMSd odchylky aktivního místa, ta se ze začátku pohybuje v rozmezí 0,7-1 Å a v čase 750 ns dochází ke skoku a hodnoty RMSd jsou drženy okol 1,5 Å.



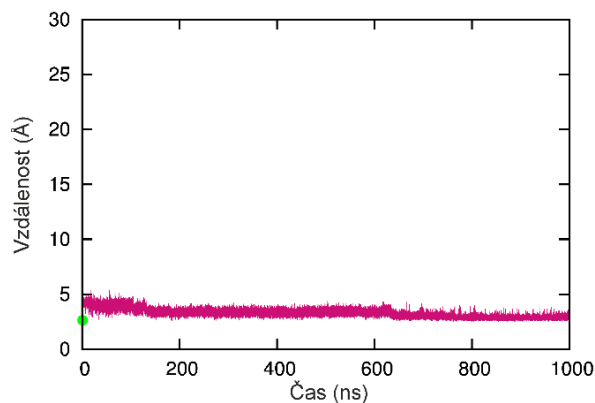
Graf 17: Grafické znázornění RMS odchylek v čase pro simulaci 2Na_ff12_2. Červený graf značí RMS odchylku v aktivním místě a jeho okolí a černý graf RMS odchylku celé struktury.

Hodnoty B-faktoru ukazují výraznější fluktuaci mezi 36-40 residuem (Graf 18). Tento pohyb je téměř stejný jako v systému 2Mg_ff12_1. Vyšší hodnota B-faktoru byla dále zaznamenána u residua číslo 197 a na C-konci proteinového řetězce. Hodnoty B-faktoru jsou na rozdíl od struktur se dvěma Mg^{2+} ionty výrazně nižší.



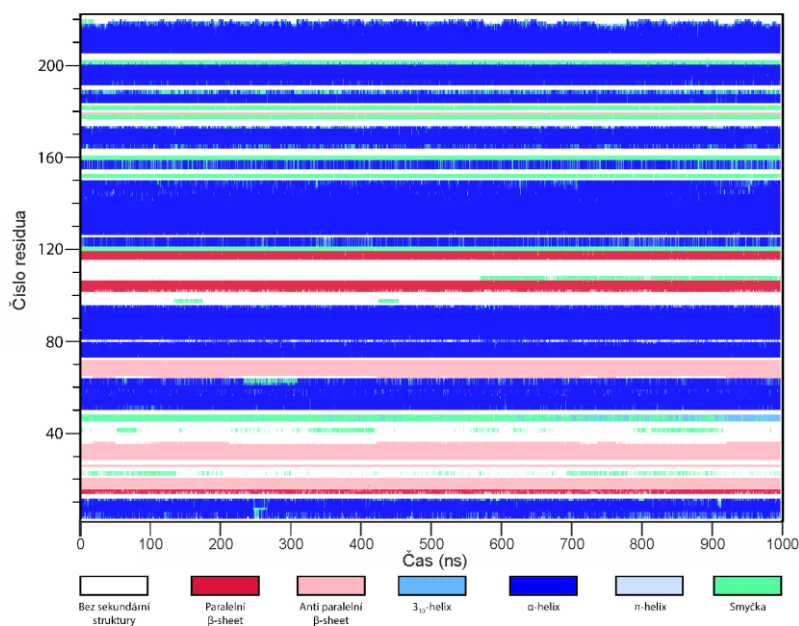
Graf 18: Grafické znázornění B-faktoru u residuí v simulaci 2Na_ff12_2. Zelená čára značí B-faktor celého systému a fialové tečky residua v aktivním místě (D17, E18, D106 a D123).

Lysin 46, který v předchozích simulacích vykonává velký pohyb z aktivního místa je zde stabilnější, jeho fluktuace je malá jen 27 \AA^2 a vzdálenost Lys46 od kyslíku fosfátové skupiny residua C240 dosahuje maximálně 5 \AA (Graf 19).



Graf 19: Graf simulace 2Na_ff12_2 Zelené kolečko označuje vzdálenost mezi lysinem 46 a kyslíkem fosfátové skupiny residua 240 na začátku simulace.

Stabilitu systému ukazuje i sekundární struktura. Na začátku ani na konci proteinové struktury se neobjevují výrazné změny v sekundárních elementech. I v oblasti vyššího B-faktoru je sekundární struktura docela stabilní. Jsou zde vidět jen nepatrné změny sekundárních elementů, na rozdíl od předchozích systémů. Nepravidelná sekundární struktura je viditelná v oblasti residuů 156-158, kde se střídají α -šroubovice, 3_{10} -šroubovice a smyčka.



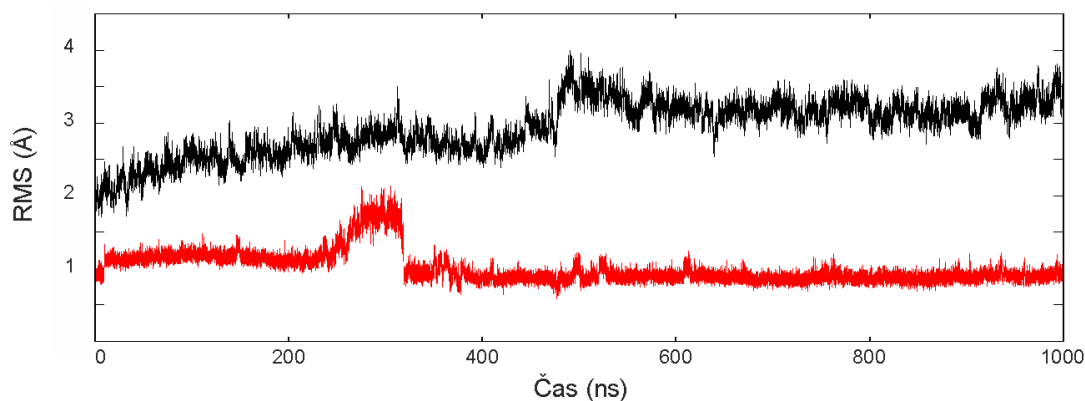
Graf 20: Graf sekundární struktury proteinu v simulaci 2Na_ff12_2.

Ionty, přítomné v aktivním místě systému 2Na_ff12_2, na rozdíl od iontů systému 2Na_ff12_1, v průběhu simulace tak výrazně nemění své místo. Posun z času 0 μ s na 1 μ s je u iontu č. 1 o 1,6 Å a u iontu č. 2 o 1,5 Å od startovní pozice.

Při porovnání systému 2Na_ff12_2 se všemi předchozími systémy, vychází tento systém nejstabilněji. Ale i zda je viditelný pohyb residuů poblíž aktivního místa a tím je celá jeho struktura aktivního místa ovlivněna.

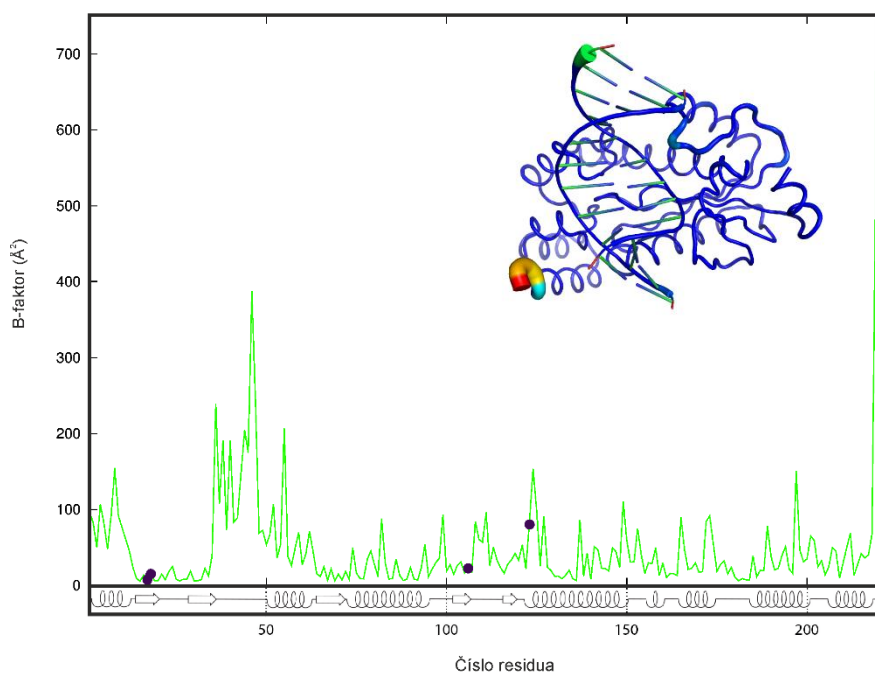
4.1.6 Systém 2Na_ff10

Systém 2Na_ff10 má v aktivním místě přítomny dva Na⁺ ionty a bylo použito silové pole ff10. Stabilita tohoto systému je vyšší než u systémů, kde jsou v aktivním místě dva Mg²⁺ ionty, ale nižší než u předešlých systémů se dvěma Na⁺ ionty. Roli zde může hrát výměna silového pole. U RMSd odchylky celé struktury dochází k nepravidelným výchylkám. Výraznější skok je v 500 ns a hodnoty RMS celkové odchylky, které byly kolem 2 Å, jsou až do konce simulace zvýšeny na hodnotu 3,5 Å. Tento skok byl způsoben pohybem konce nukleové kyseliny a smyčky, které je součástí Lys46. Rozdíly jsou i u RMS odchylky aktivního místa, hodnoty jsou asi 1,5 Å a v čase 250-350 ns dochází k vychýlení a po té k poklesu až pod 1 Å.



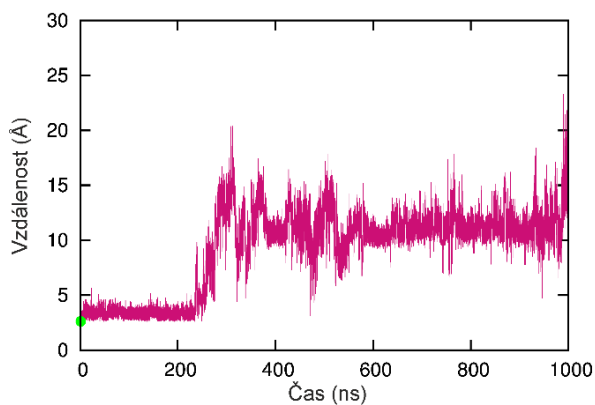
Graf 21: Grafické znázornění RMS odchylek v čase pro simulaci 2Na_ff10. Červený graf značí RMS odchylku v aktivním místě a jeho okolí a černý graf RMS odchylku celé struktury.

Hodnoty B-faktoru jsou nepatrně vyšší než u simulací se dvěma Na⁺ ionty v silovém poli ff12SB, ale nedosahují takových hodnot jako u simulací se dvěma Mg²⁺ ionty. K výraznější fluktuaci dochází mezi 36-62 residuem, kde je klíčové residuum Lys46.



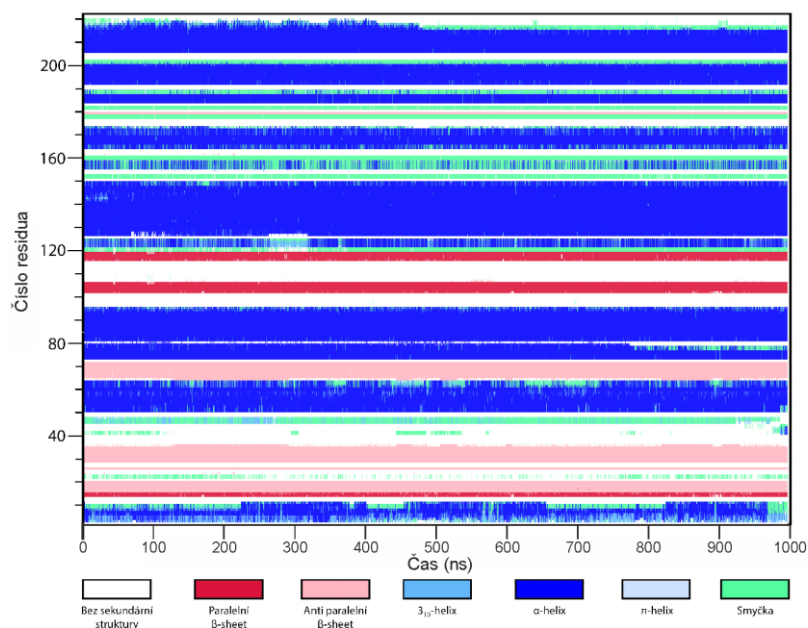
Graf 22: Grafické znázornění B-faktoru u residuí v simulaci 2Na_ff10. Zelená čára značí B-faktor celého systému a fialové tečky residua v aktivním místě (D17, E18, D106 a D123).

Lysin 46 se postupně vzdaluje od aktivního místa a jeho fluktuace je 387 \AA^2 . V průběhu simulace odejde až do vzdálenosti 20 \AA od aktivního místa (Graf 23).



Graf 23: Graf simulace 2Na_ff10 Zelené kolečko označuje vzdálenost mezi lysinem 46 a kyslíkem fosfátové skupiny residua 240 na začátku simulace.

Celkové chování systému je dokumentováno pomocí vývoje sekundárních struktur. V oblasti vysokého B-faktoru je sekundární struktura relativně stabilní. Jsou zde vidět jen nepatrné změny sekundárních elementů, na rozdíl od systémů s hořčičnými ionty v aktivním místě. Nepravidelná sekundární struktura je viditelná v oblasti residuí 156-158, kde se střídají α -šroubovice, 3_{10} -šroubovice a smyčka.

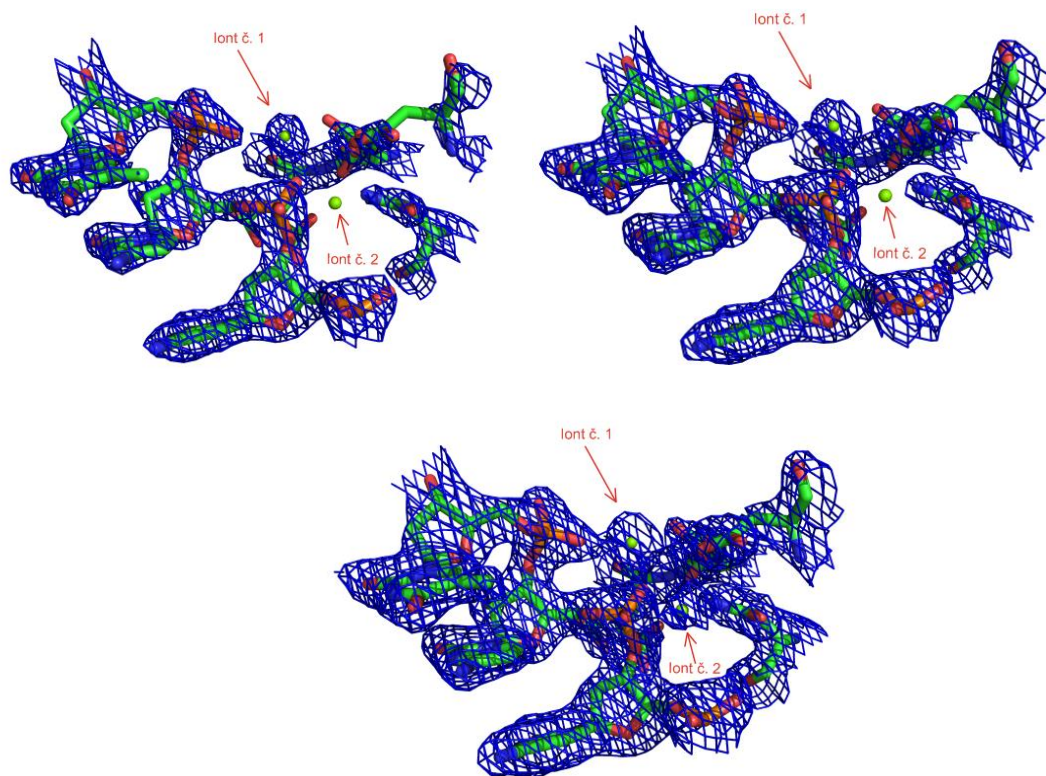


Graf 24: Graf sekundární struktury proteinu v simulaci 2Na_ff10.

V simulaci 2Na_ff10 byl viditelný pohyb obou Na⁺ iontů v aktivním místě. Iont č. 1 se v průběhu simulace oddaluje od residua DT 241 a přibližuje se k Asp106, ale na konci simulace v čase 1 μs je umístění téměř na stejné pozici jako na začátku. Iontu č. 2 vykonává relativně velký pohyb v kapse aktivního místa a ke konci simulace interaguje s kyslíkem postranního řetězce Glu18 od kterého se nachází ve vzdálenosti 2,19 Å.

Systém 2Na_ff10 nevykazuje příliš stabilní chování. V průběhu simulace, která trvala 1 μs, dochází k přeskupení residuí, které jsou umístěny v okolí aktivního místa a to má vliv na jeho strukturu.

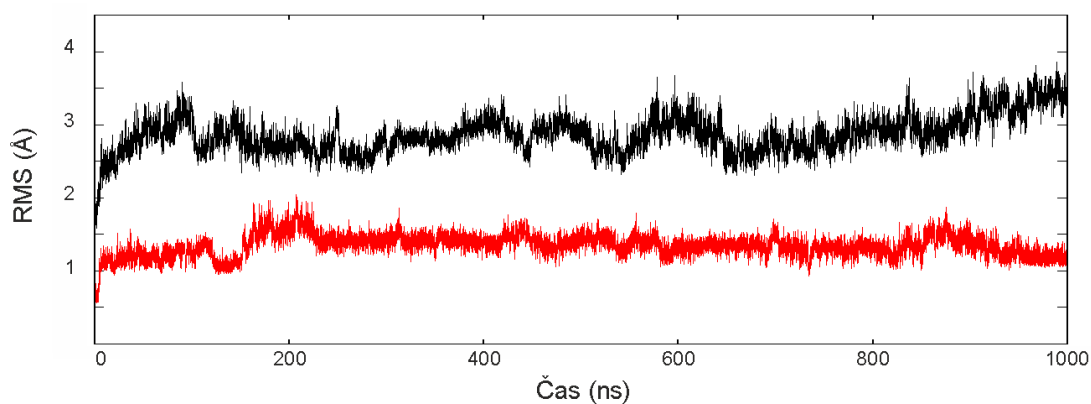
Skoro všechny výše zmíněné systémy v průběhu simulace vykazovaly ve větší či menší míře zvýšenou flexibilitu residuí v blízkosti aktivního místa. Zvýšená flexibilita byla způsobena hlavně odchodem Lys46 od aktivního místa. Při studiu chování předchozích simulací byla vyslovena hypotéza, zda nedochází k pohybu Lys46 kvůli blízkosti Mg²⁺ iontu (iont č. 2). Tento iont nebyl tak dobře koordinovaný jako druhý z iontů přítomných v aktivním místě a při bližším prozkoumání map elektronové hustoty se spíše zdálo, že by se mohlo jednat o vodu či monovalentní iont (Obrázek 13). Proto byla vytvořena ještě sada simulací bez tohoto diskutabilního iontu.



Obrázek 13: Mapy elektronové hustoty aktivního místa. První mapa elektronové hustoty je tvarována na 2.0σ , druhá na 1.5σ a třetí na 1.0σ .

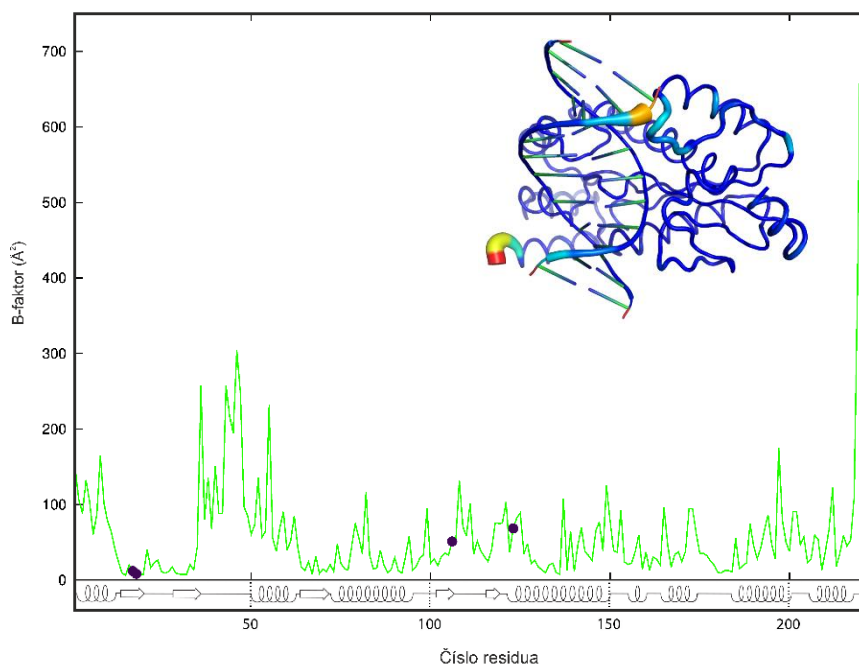
4.1.7 Systém Mg/Wat_ff10

Systém Mg/Wat_ff10 má v aktivním místě pouze jeden Mg^{2+} iont v pozici č. 1 (viz Obrázek 10) a bylo použito silové pole *ff10*. V porovnání s předchozími simulacemi, je stabilita tohoto systému podobná jako u struktur se dvěma sodnými ionty. U RMS odchylky celé struktury dochází k nepravidelným výchylkám. Hodnota je 1,5-3,5 Å. Rozdíly jsou patrné i v RMS aktivního místa, kde jejich velikost je 0,5-1,5Å.



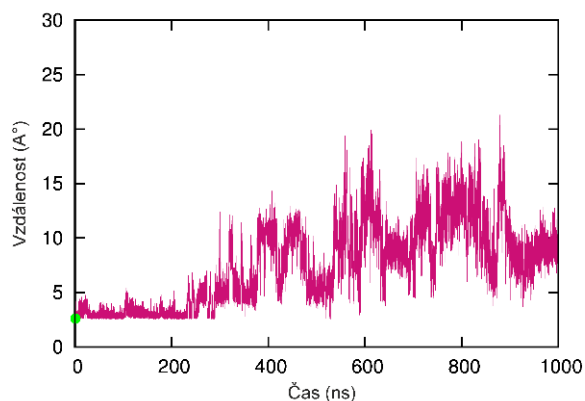
Graf 25: Grafické znázornění RMS odchylek v čase pro simulaci Mg/Wat_ff10. Červený graf značí RMS odchylku v aktivním místě a jeho okolí a černý graf RMS odchylku celé struktury.

Hodnota B-faktoru ukazuje zvýšenou fluktuaci mezi 36-55 residuem (Graf 26). Tento pohyb je mnohem menší než ve strukturách, které mají v aktivním místě přítomny dva Mg^{2+} ionty a je podobný jako v simulacích se dvěma Na^+ ionty. Fluktuace byla dále zaznamenána u residua číslo 197 a na C-konci proteinového řetězce.



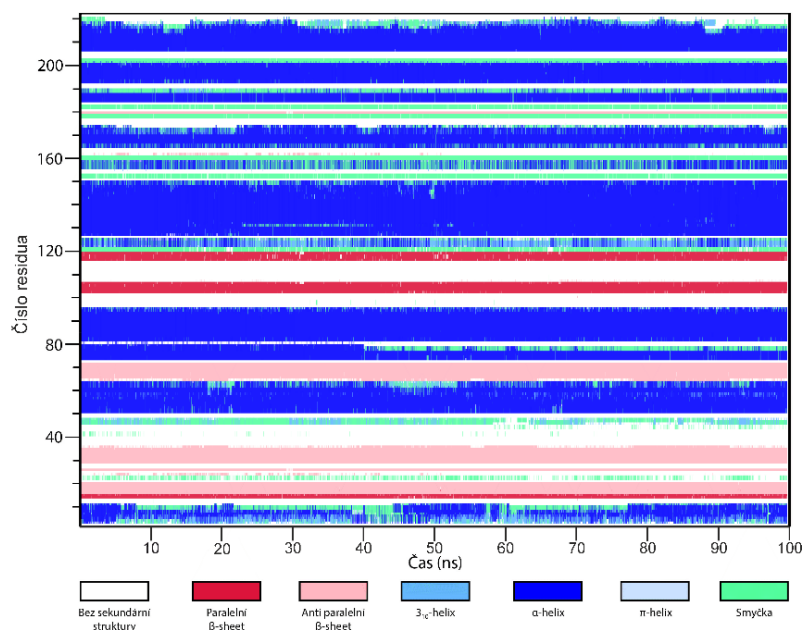
Graf 26: Grafické znázornění B-faktoru u residuí v simulaci Mg/Wat_ff10. Zelená čára značí B-faktor celého systému a fialové tečky residua v aktivním místě (D17, E18, D106 a D123).

Lysin 46 je na začátku simulace umístěn v blízkosti aktivního místa. Je součástí smyčky, která se v průběhu simulace oddaluje od aktivního místa. Protože, ve většině simulací byla fluktuace Lys46 velká, byl zaznamenán jeho pohyb měřením vzdálenosti od aktivního místa. Tato vzdálenost byla měřena od kyslíku fosfátové skupiny residua C240 a dosahuje v časové škále 1 μs hodnot 15 Å. I v této simulaci má B-faktor lysinu 46 jednu s nejvyšších hodnot 243 Å².



Graf 27: Graf simulace Mg/Wat_ff10. Zelené kolečko označuje vzdálenost mezi lysinem 46 a kyslíkem fosfátové skupiny residua 240 na začátku simulace.

Stabilitu systému ukazuje i sekundární struktura. U residuí v aktivním místě je sekundární struktura stabilní, tak jako ve všech analyzovaných systémech. Nestabilní sekundární elementy jsou na začátku (1-10 residuum) a na konci (217-222) proteinové struktury. Střídají se zde α -šroubovice, 3_{10} -šroubovice a smyčka. V oblasti vysokého B-faktoru je sekundární struktura relativně stabilní. Jsou zde vidět jen nepatrné změny sekundárních elementů tak jako v simulacích 2Na_ff10 a 2Na_ff12. Nepravidelná sekundární struktura je viditelná v oblasti residuí 156-158, kde se střídají α -šroubovice, 3_{10} -šroubovice a smyčka.

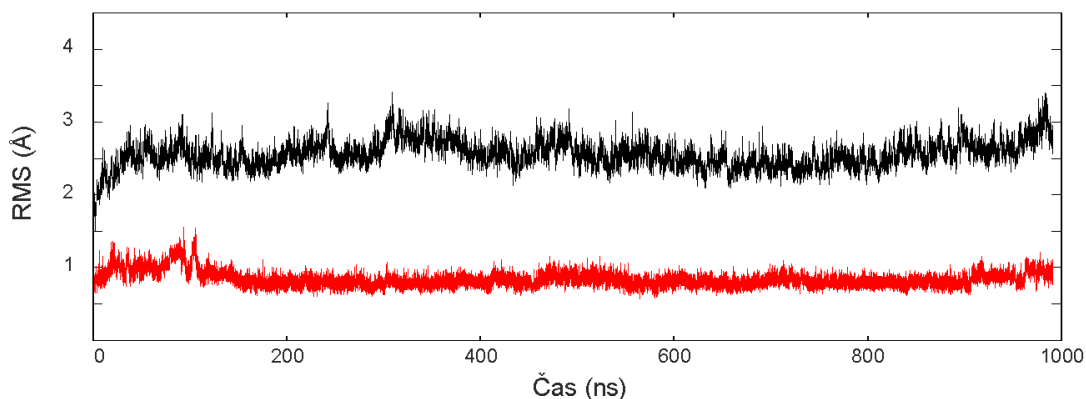


Graf 28: Graf sekundární struktury proteinu v simulaci Mg/Wat_ff10.

Stabilita systém Mg/Wat_ff10 v časové škále 1 μ s je lepší než u simulací se dvěma hořečnatými ionty. I přesto dochází v průběhu simulace k pohybu residuí okolo aktivního místa.

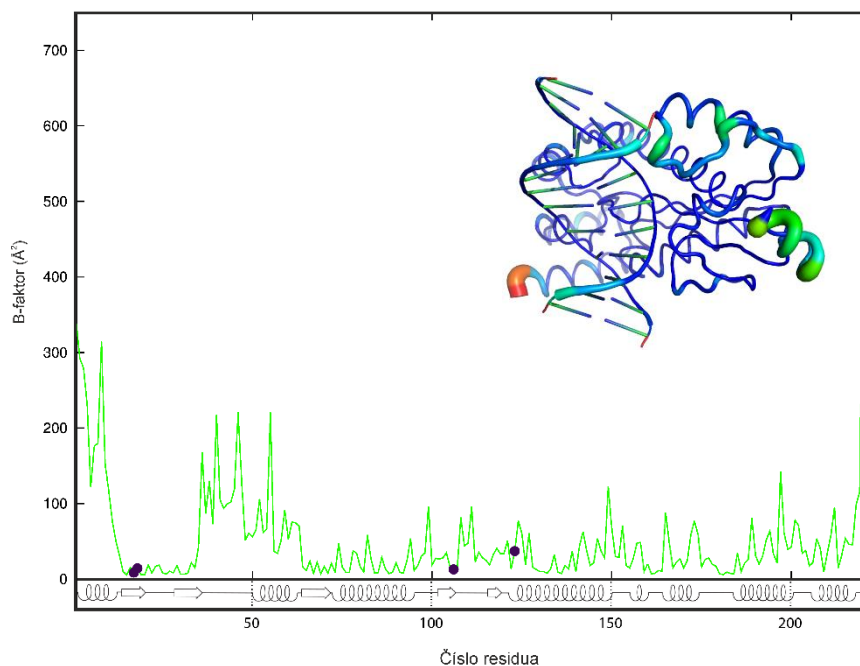
4.1.8 Systém Na/Wat_ff10

Systém Na/Wat_ff10, obsahuje v aktivním místě pouze jeden Na^+ iont v pozici č. 1 (viz Obrázek 10). Tato simulace probíhá na časové škále 1 μ s a byla spuštěna v silovém poli ff10. V porovnání s předchozími simulacemi, je stabilita tohoto systému podobná jako u struktur se dvěma sodnými ionty. U RMSd odchylky celé struktury dochází k nepravidelným výchylkám. Hodnota je 1,5-3 Å. K významným výchylkám dochází i v RMS aktivního místa, kde jejich velikost je 0,5-1,5Å. RMS aktivního místa vypadá stabilněji než u struktury s jedním Mg^{2+} iontem.



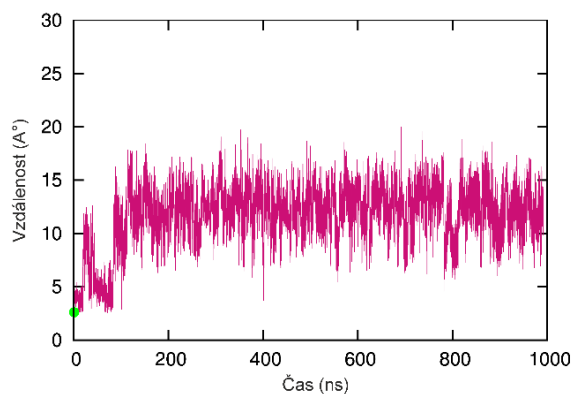
Graf 29: Grafické znázornění RMS odchylek v čase pro simulaci Na/Wat_ff10. Červený graf značí RMS odchylku v aktivním místě a jeho okolí a černý graf RMS odchylku celé struktury.

Z grafu B-faktor je patrná výraznější fluktuace mezi 36-59 residuem. Tento pohyb je mnohem menší než ve strukturách, které mají v aktivním místě přítomny dva Mg^{2+} ionty, ale je srovnatelný se strukturou, která má v aktivním místě pouze jeden Mg^{2+} iont. Fluktuace byla dále zaznamenaná u residua Lys8 a na C-konci proteinového řetězce.



Graf 30: Grafické znázornění B-faktoru u residuí v simulaci Na/Wat_ff10. Zelená čára značí B-faktor celého systému a fialové tečky residua v aktivním místě (D17, E18, D106 a D123).

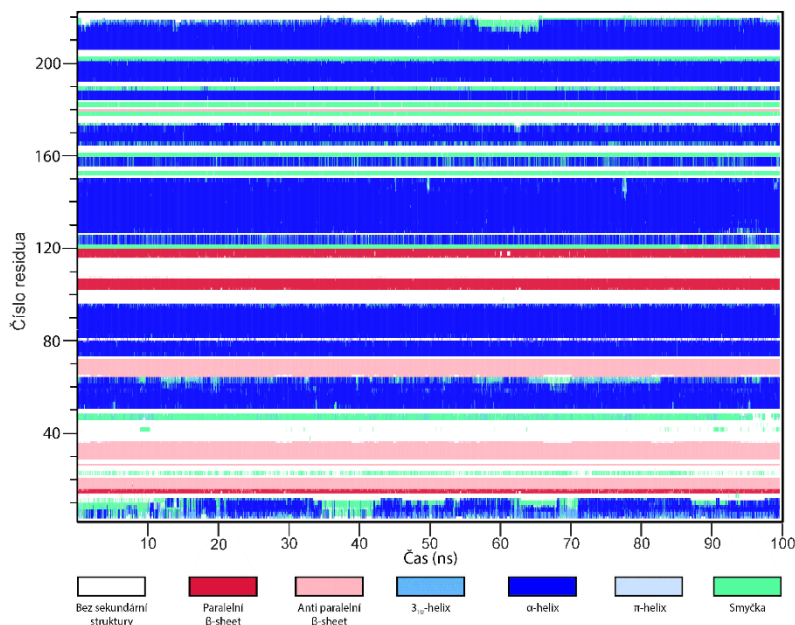
Lysin 46, který je na začátku simulace umístěn poblíž aktivního místa, měl ve většině simulací vysoký B-faktor. U tohoto systému má B-faktor Lys46 jednu s nejvyšších hodnot a to 245 Å² a jeho vzdálenost od aktivního místa se pohybuje v hodnotách 20 Å.



Graf 31: Graf simulace Na/Wat_ff10. Zelené kolečko označuje vzdálenost mezi lysinem 46 a kyslíkem fosfátové skupiny residua 240 na začátku simulace.

Stabilita sekundárních elementů v aktivním místě jsou totožné se všemi ostatními simulacemi. Viditelná nestabilita sekundárních elementů je na začátku (1-10 residuum) a menší nestabilita na konci (217-222) proteinové struktury. Střídají se zde α -šroubovice, 3_{10} -šroubovice a smyčka. V oblasti vysokého B-faktoru je sekundární struktura docela

stabilní. Jsou zde vidět jen nepatrné změny sekundárních elementů tak jako v simulacích se dvěma sodnými ionty nebo jedním hořečnatým iontem. Nepravidelná sekundární struktura je viditelná v oblasti residuí 156-158, kde se střídají α -šroubovice, 3_{10} -šroubovice a smyčka.



Graf 32: Graf sekundární struktury proteinu v simulaci Na/Wat_ff10.

Systém Na/Wat_ff10, který probíhá v časové škále 1 μ s, je stabilnější než u simulací se dvěma hořečnatými ionty. I zde dochází v průběhu simulace k přesouvání residuí umístěných okolo aktivního místa a tím i ke změně jeho struktury.

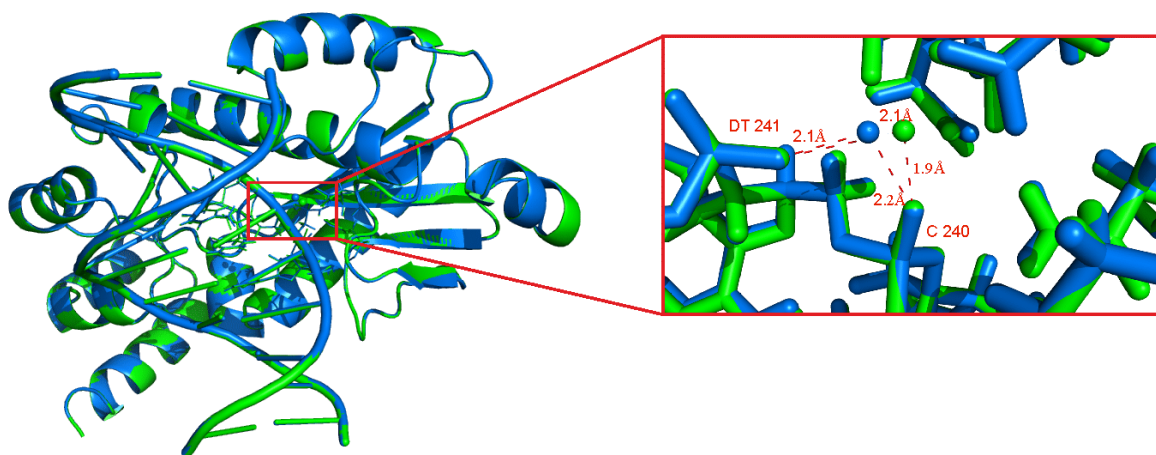
Výše zmíněné simulace s jedním iontem vykazovaly strukturní změny v blízkosti aktivního místa. Při bližším zkoumání, bylo zjištěno, že k těmto změnám nedochází v průběhu samotné simulace, ale došlo k nim ještě při vyhřívání struktury před samotným během simulace. Tyto změny byly nevratné a byly způsobeny pravděpodobně absencí druhého iontu, protože v systémech se dvěma ionty k tomu nedochází.

4.2 Změna konformace aktivního místa při minimalizaci a vyhřívání

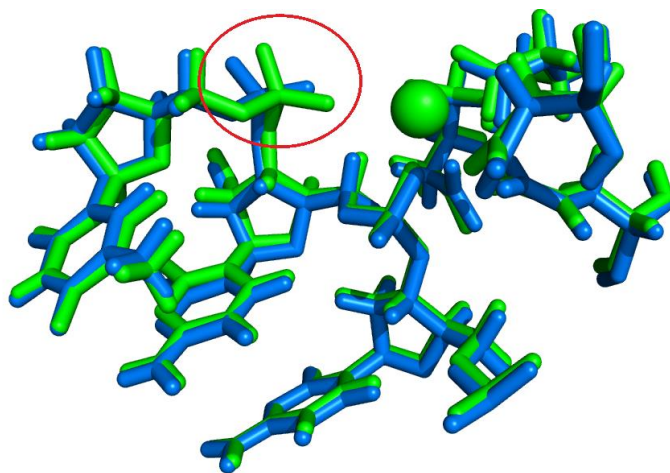
V prvních krocích minimalizace a vyhřívání molekuly dochází k tomu, že se nukleová kyselina přiblíží k proteinu asi o 0,3 Å. Tento jev nastává u všech popisovaných simulací a je způsoben působením barostatu. Tam kde jsou v aktivním místě umístěny dva hořečnaté nebo sodné ionty, je to jediná velká strukturní změna pozorovaná v přípravné fázi před samotným během MD simulace. Naopak je tomu u simulací, ve kterých je v aktivním místě přítomen

pouze jeden hořečnatý či sodný iont (iont č. 1, viz Obrázek 10). V těchto simulacích dochází k dvoukrokovému přeskládání aktivního místa. V prvním kroku dojde k posunutí iontu z jeho startovní pozice (Obrázek 14) a ve druhém k pootočení fosfátové skupiny residua 241 (Obrázek 15). Posun iontu je pravděpodobně způsoben elektrostatickým přitahováním iontu fosfátovou skupinou residua 240 a kyselinou glutamovou (residuum 18). Iont č. 1 se posouvá v kapse aktivního místa směrem dolů, tj. k Glu18, Asp17 a C240, a vzdaluje se od fosfátové skupiny residua 241 (Graf 33). V simulacích kde jsou dva kovové ionty, nedochází k posunutí iontu č. 1 dolů, protože je na původním místě držen interakcemi druhého iontu, který je umístěn níže. Na druhou stranu v simulacích se dvě ionty dochází k problémům s Lys46, který odchází vlivem iontu č. 2. Výše uvedená fakta nás vedou k myšlence, že v aktivním místě RNasy H2, musí být alespoň dva ionty. Jeden v pozici č. 1 a pak někde v blízkosti residua 240.

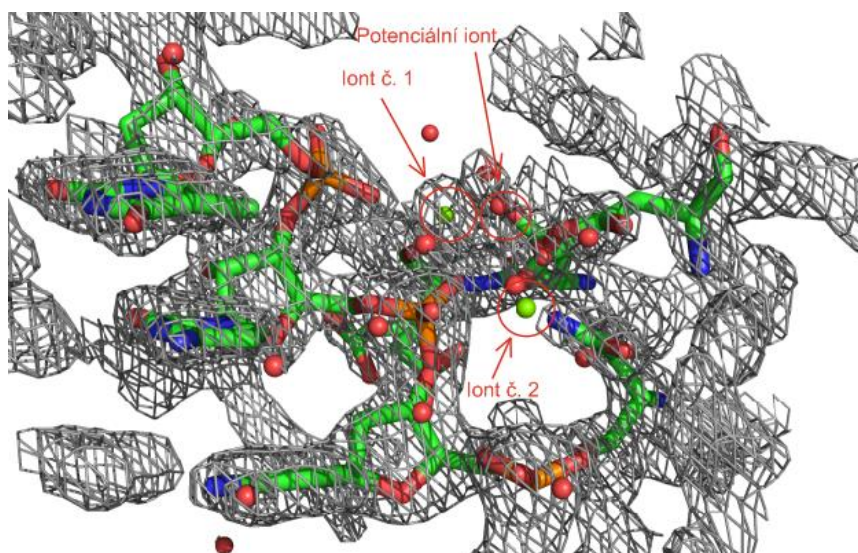
Toto tvrzení nám dokazuje i mapa elektronové hustoty, kde se kolem iontu č. 1 tvoří síť elektronové hustoty, ale kolem iontu č. 2 nikoliv (Obrázek 13). Na obrázku je označeno kde by se mohl potenciální iont nacházet (Obrázek 16).



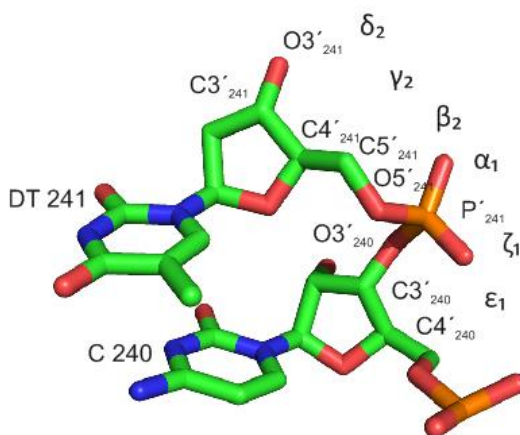
Obrázek 14: Průběh vzdalování hořečnatého iontu od fosfátové skupiny residua 241 u simulace číslo 7, kde je v aktivním místě přítomen pouze jeden znázorněný Mg^{2+} . Modrá barva znázorňuje strukturu na snímku 502 během minimalizace a vyhřívání a zelená barva snímek 503.



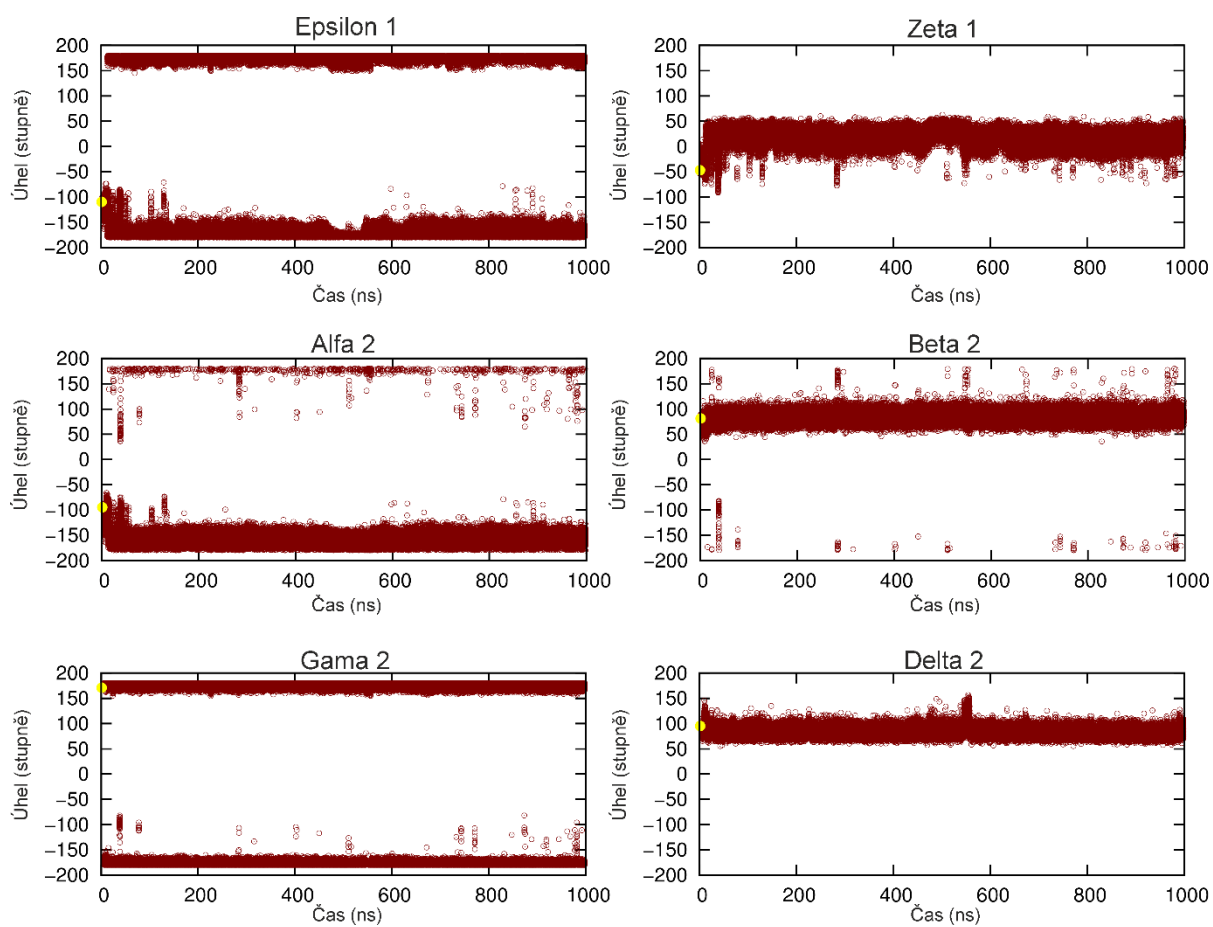
Obrázek 15: Aktivní místo struktury simulace číslo 7. Došlo zde k pootočení residua čísla 241, které je zvýrazněné červeně. Zelená barva znázorňuje strukturu na snímku 506 během minimalizace a vyhřívání a modrá barva na snímku 507.



Obrázek 16: Mapa elektronové hustoty aktivního místa a jeho okolí.



Obrázek 17: Znázornění oblasti, ze které byl stanovován pohyb dihedrálních úhlů.



Graf 33: Grafy dihedrálních úhlů systému Na/Wat_ff10. Epsilon 1 ($C4'_{240} - C3'_{240} - O3'_{240} - P_{241}$), zeta 1 ($C3'_{240} - O3'_{240} - P_{241} - O5'_{241}$), alfa 2 ($O3'_{240} - P_{241} - O5'_{241} - C5'_{241}$), beta 2 ($P_{241} - O5'_{241} - C5'_{241} - C4'_{241}$), gama 2 ($O5'_{241} - C5'_{241} - C4'_{241} - C3'_{241}$) a delta 2 ($C5'_{241} - C4'_{241} - C3'_{241} - O3'_{241}$).

5 Závěr

Předložená práce se zabývá studiem strukturního chování komplexu RNasy H2 s RNA/DNA hybridem metodami výpočetní chemie. Pozornost byla zaměřena hlavně na strukturu aktivního místa a na pozice, počet a mocenství iontů v aktivním místě. Celkem bylo provedeno osm simulací s různým nastavením a s různými silovými poli. Všechny simulace vykazovaly zvýšenou flexibilitu residuí v okolí aktivního místa a tím způsobenou nestabilitu aktivního místa. Zvýšená flexibilita byla dokumentována pomocí analýzy RMSd odchylky, B-faktorů a sekundárních elementů. Největší podíl na flexibilitě v okolí aktivního místa měl Lys46, který v simulacích se dvěma divalentními ionty opouštěl aktivní místo. Tento lysin je součástí smyčky, která se ukázala v simulacích jako velmi flexibilní a docházelo k jejímu výraznému posunu od startovní pozice. Studium mapy elektronové hustoty vstupní struktury v kombinaci s výsledky jednotlivých simulací se dvěma divalentními ionty byly podnětem k hypotéze, že zmíněný pohyb Lys46 je způsoben blízkostí jednoho z Mg^{2+} iontů (iont č. 2), neboť tento iont není v aktivním místě tak dobře koordinován jako iont č. 1. Tato hypotéza byla inspirací pro spuštění dalších dvou simulací. První s jedním Mg^{2+} a druhé s jedním Na^+ v aktivním místě (oba na pozici č. 1). I u těchto simulací byly zaznamenány změny umístění residuí poblíž aktivního místa. K této reorganizaci docházelo již při vyhřívání struktury tj. před tím, než vůbec začala samotná simulace. Při vyhřívání došlo k přemístění iontu č. 1 ze startovní pozice v kapse aktivního místa směrem od residua 241. V důsledku toho se potočila fosfátová skupiny residua 241, ke které se už iont elektrostaticky nevázal. Tento jev nebyl pozorován u simulací s dvěma ionty, protože iont č. 1 byl držen interakcemi druhého iontu na původním místě.

Výsledky simulací zahrnutých do předložené práce poukazují na to, že komplex RNasy H2 by měl mít v aktivním místě alespoň dva ionty. Bohužel se zdá, že jejich pozice, tak jak je navrhována krystalografy, není zcela správná. Pozice Mg^{2+} iontu č. 1 se zdá být v pořádku a simulace jeho pozici více méně potvrzují. Naproti tomu iont č. 2 je již v krystalové struktuře špatně koordinován a v průběhu simulací způsobuje reorganizaci aktivního místa. Špatná koordinace iontu č. 2 v kombinaci se studiem mapy elektronové hustoty ukazují, že iont č. 2 není v krystalové struktuře zcela dobře definován a možná se nemusí jednat o divalentní iont, ale o monovalentní iont. Z výsledků simulací se zdá, že druhý

iont je důležitý ke stabilizaci iontu č. 1 v původním místě a mohl by se vyskytovat někde v blízkosti residua 240.

6 Summary

This thesis deals with the study of the structural behavior of RNase H2 complex with RNA/DNA hybrid using methods of computational chemistry. Attention has been focused mainly on the structure of the active site and the position, number and valence of ions in the active site. It was performed eight simulations in total with different settings and with different force fields. All simulations showed increased flexibility of residues around the active site and thus caused instability of the active site. Increased flexibility was demonstrated by analysis RMSd deviations, B-factors and secondary elements. The largest share of flexibility around the active site had Lys46, which left the active site in simulations with two divalent ions. This lysine is part of the loop, which proved as very flexible in simulations and there was a significant shift from its starting position. The study of electron density maps of starting structure in combination with the results of each simulation with the two divalent ions gave rise to the hypothesis that the mentioned movement of Lys46 is not caused by the proximity of one of the Mg^{2+} ion (no. 2), because this ion is not coordinated as well as ion no. 1 at the active site. This theory inspired us to run two simulations (first one with Mg^{2+} and the second one with Na^+ in the active site on position no. 1). Also in these simulations changes of residues location near the active site were registered. The movement had already occurred during the thermalization of the structure before actual simulation started. An ion no. 1 transferred down in the pocket of the active site and moved away from residue 241. Consequently the phosphate group of the residue 241 turned, to which no ion was bind electrostatically any longer. This phenomenon was not observed in simulations with two ions because ion no. 1 was held owing to interactions of the second ion in an original place.

The results of the simulations included in the this thesis indicate that the RNase H2 complex should have at least two ions in the active site. Unfortunately, it seems that their positions, as proposed by crystallographer is not completely correct. Position of the Mg^{2+} ion no. 1 seems to be correct and simulation more or less confirmed its position. In contrast, ion no. 2 is already in the crystal structure poorly coordinated and during simulation it causes reorganization of the active site. Poor coordination of the ion no. 2 in combination with the study of electron density map show that the ion no. 2 is not entirely well defined in the crystal structure, and perhaps does not need to be a divalent ion, but monovalent ion. From

simulation results, it appears that the second ion is important to stabilize the ion no. 1 in the original site and could occur somewhere near residues 240.

7 Seznam použitých zdrojů

- [1] KOOLMAN, J. a K.-H. RÖHM. *Barevný atlas biochemie*. B.m.: Grada Publishing, a.s., U Průhonu 22, Praha 7, 2012. ISBN 978-3-13-759404-8.
- [2] SNUSTAD, Peter D. a Michael J. SIMMONS. *Genetika*. B.m.: Vydavatelství Masarykova univerzita, Nakladatelství, 2009. ISBN 978-80-210-4852-2.
- [3] ALBERTS, Bruce, Dennis BRAY, Alexander JOHNSON a Julian LEWIS. *Základy buněčné biologie*. 1998. ISBN 80-902906-2-0.
- [4] SHAMSI, Mohtashim Hassan a Heinz Bernhard KRAATZ. Interactions of Metal Ions with DNA and Some Applications. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials* [online]. 2013, roč. 23, č. 1, s. 4–23. ISSN 15741443. Dostupné z: doi:10.1007/s10904-012-9694-8
- [5] LEONTIS, N B a E WESTHOF. The annotation of RNA motifs. *Comparative and Functional Genomics* [online]. 2002, roč. 3, s. 518–524. ISSN 1531-6912. Dostupné z: doi:10.1002/cfg.213
- [6] ZIRBEL, Craig L., Judit E. ŠPONER, Jiri ŠPONER, Jesse STOMBAUGH a Neocles B. LEONTIS. Classification and energetics of the base-phosphate interactions in RNA. *Nucleic Acids Research* [online]. 2009, roč. 37, č. 15, s. 4898–4918. ISSN 03051048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkp468
- [7] MOORE, P B. Structural motifs in RNA. *Annual Review of Biochemistry* [online]. 1999, roč. 68, s. 287–300. ISSN 0066-4154. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.biochem.68.1.287
- [8] HENDRIX, Donna K, Steven E BRENNER a Stephen R HOLBROOK. RNA structural motifs: building blocks of a modular biomolecule. *Quarterly reviews of biophysics* [online]. 2005, roč. 38, č. 3, s. 221–243. ISSN 0033-5835. Dostupné z: doi:10.1017/S0033583506004215
- [9] RYCHLIK, Monika P., Hyongi CHON, Susana M. CERRITELLI, Paulina KLIMEK, Robert J. CROUCH a Marcin NOWOTNY. Crystal structures of rnae h2 in complex with nucleic acid reveal the mechanism of RNA-DNA junction recognition and cleavage. *Molecular Cell* [online]. 2010, roč. 40, č. 4, s. 658–670. ISSN 10972765. Dostupné z: doi:10.1016/j.molcel.2010.11.001
- [10] DOUBRAVA, Jaroslav. *Základy biochemie*. B.m.: Státní pedagogické nakladatelství, n. p., v Praze, 1984.
- [11] FRÉBORT, Ivo. Struktura a funkce biomakromolekul [online]. 2011. Dostupné z: <http://www.molbio.upol.cz/stranky/vyuka/BPOL/1>. Struktura proteinu.pdf

- [12] ŠÍPAL, Zdeněk, Pavel ANZENBACHER, Pavel PEČ, Jiří POSPÍŠIL a Ivan RŮŽIČKA. *Biochemie*. B.m.: Státní pedagogické nakladatelství v Praze, 1992. ISBN 80-04-21736-2.
- [13] ODSTRČIL, Jaroslav. *Biochemie*. B.m.: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotních oborů v Brně, 2005. ISBN 80-7013-452-9.
- [14] SPARKS, Justin L, Hyongi CHON, Susana M CERRITELLI, Thomas A KUNKEL, Erik JOHANSSON, Robert J CROUCH a Peter M BURGERS. RNase H2-initiated ribonucleotide excision repair. *Molecular cell* [online]. 2012, roč. 47, č. 6, s. 980–6. ISSN 1097-4164. Dostupné z: doi:10.1016/j.molcel.2012.06.035
- [15] NOWOTNY, Marcin, Sergei a. GAIDAMAKOV, Rodolfo GHIRLANDO, Susana M. CERRITELLI, Robert J. CROUCH a Wei YANG. Structure of Human RNase H1 Complexed with an RNA/DNA Hybrid: Insight into HIV Reverse Transcription. *Molecular Cell* [online]. 2007, roč. 28, č. 2, s. 264–276. ISSN 10972765. Dostupné z: doi:10.1016/j.molcel.2007.08.015
- [16] CHAPADOS, B R, Q CHAI, D J HOSFIELD, J QIU, B SHEN a J a TAINER. Structural biochemistry of a type 2 RNase H: RNA primer recognition and removal during DNA replication. *Journal of molecular biology* [online]. 2001, roč. 307, č. 2, s. 541–556. ISSN 0022-2836. Dostupné z: doi:10.1006/jmbi.2001.4494
- [17] NEZBEDA IVO, KOLAFKA JIŘÍ, KOTRLA Miroslav. *Úvod do počítačových simulací*. B.m.: Karolinum, 2002. ISBN: 8024606496.
- [18] REMKO MILAN. *Molekulové modelovanie, Principy a aplikácie*. B.m.: Slovak Academic Press, s.r.o., 2000. ISBN 80-88908-62-0.
- [19] LEACH A. R. *Molecular modeling-principles and applications*. 2001. ISBN-13: 978-0582382107.
- [20] MARTIN ŠREJBER. Srovnání silových polí pro studium biologických membrán Validation of force fields for biological membranes. *Thesis*. 2014, s. 48.
- [21] BERK HESS, DAVID VAN DER SPOEL, Erik Lindahl. Gromacs User Manual. *Department of Biophysical Chemistry, ...* [online]. 2014, s. 312. ISSN 0010-468X. Dostupné z: doi:10.1006/imms.1993.1022
- [22] CASE, D A, T A DARDEN, I I I CHEATHAM T.E., C L SIMMERLING, J WANG, R E DUKE, R LUO, R C WALKER, W ZHANG, K M MERZ, B P ROBERTS, B WANG, S HAYIK, A ROITBERG, G SEABRA, I KOLOSSVAI, K F WONG, F PAESANI, J VANICEK, J LIU, X WU, S R BROZELL, T STEINBRECHER, H GOHLKE, Q CAI, X YE, M.-J. HSIEH, G CUI, D R ROE, D H MATHEWS, M G SEETIN, C SAGUI, V BABIN, T LUCHKO, S GUSAROV, A KOVALENKO a P A KOLLMAN. AMBER 11. *University of California, San Francisco*. 2010.

- [23] SANSOM, M S P a P C BIGGIN. Molecular Simulations and Biomembranes. *From Biophysics to Function* [online]. 2010, s. 314. ISSN 1757-7152. Dostupné z: doi:10.1039/9781849732154
- [24] KLAUDA, Jeffery B., Richard M. VENABLE, J. Alfredo FREITES, Joseph W. O'CONNOR, Douglas J. TOBIAS, Carlos MONDRAGON-RAMIREZ, Igor VOROBYOV, Alexander D. MACKERELL a Richard W. PASTOR. Update of the CHARMM All-Atom Additive Force Field for Lipids: Validation on Six Lipid Types. *Journal of Physical Chemistry B* [online]. 2010, roč. 114, č. 23, s. 7830–7843. ISSN 15206106. Dostupné z: doi:10.1021/jp101759q
- [25] JORGENSEN, William L a Julian TIRADO-RIVES. The OPLS [optimized potentials for liquid simulations] potential functions for proteins, energy minimizations for crystals of cyclic peptides and crambin. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 1988, roč. 110, č. 6, s. 1657–1666. ISSN 0002-7863. Dostupné z: doi:10.1021/ja00214a001
- [26] HOMEYER, Nadine, Anselm H C HORN, Harald LANIG a Heinrich STICHT. AMBER force-field parameters for phosphorylated amino acids in different protonation states: Phosphoserine, phosphothreonine, phosphotyrosine, and phosphohistidine. *Journal of Molecular Modeling* [online]. 2006, roč. 12, č. 3, s. 281–289. ISSN 16102940. Dostupné z: doi:10.1007/s00894-005-0028-4
- [27] BERENDSEN, H J C, J R GRIGERA a T P STRAATSMA. The Missing Term in Effective Pair Potentials. *Journal of Physical Chemistry* [online]. 1987, roč. 91, č. 24, s. 6269–6271. ISSN 0022-3654. Dostupné z: doi:10.1021/j100308a038
- [28] JOUNG, In Suk a Thomas E. CHEATHAM. Determination of alkali and halide monovalent ion parameters for use in explicitly solvated biomolecular simulations. *Journal of Physical Chemistry B* [online]. 2008, roč. 112, č. 30, s. 9020–9041. ISSN 15206106. Dostupné z: doi:10.1021/jp8001614
- [29] WIKIPEDIA. Debye–Waller_factor. *Wikipedia.org* [online]. 2016. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Debye–Waller_factor
- [30] BC. POLAKOVIČ, Pavel. *Struktura a dynamika vybraných RNA enzymů*. B.m., 2014. Univerzita Palackého v Olomouci.
- [31] HORNAK, Viktor, Robert ABEL, Asim OKUR, Bentley STROCKBINE, Adrian ROITBERG a Carlos SIMMERLING. *Comparison of multiple amber force fields and development of improved protein backbone parameters* [online]. 2006. ISBN 0887-3585. Dostupné z: doi:10.1002/prot.21123
- [32] PÉREZ, Alberto, Iván MARCHÁN, Daniel SVOZIL, Jiri SPONER, Thomas E CHEATHAM, Charles A LAUGHTON a Modesto OROZCO. Refinement of the AMBER force field for nucleic acids: improving the description of alpha/gamma conformers. *Biophysical journal* [online]. 2007, roč. 92, č. 11, s. 3817–29. ISSN 0006-3495. Dostupné z: doi:10.1529/biophysj.106.097782

- [33] BANÁŠ, Pavel, Daniel HOLLAS, Marie ZGARBOVÁ, Petr JUREČKA, Modesto OROZCO, Thomas E. CHEATHAM, Jiří ŠPONER a Michal OTYEPKA. Performance of molecular mechanics force fields for RNA simulations: Stability of UUCG and GNRA hairpins. *Journal of Chemical Theory and Computation* [online]. 2010, roč. 6, č. 12, s. 3836–3849. ISSN 15499618. Dostupné z: doi:10.1021/ct100481h
- [34] ZGARBOVÁ, Marie, Michal OTYEPKA, Jiří ŠPONER, Arnošt MLÁDEK, Pavel BANÁŠ, Thomas E. CHEATHAM a Petr JUREČKA. Refinement of the Cornell et al. Nucleic acids force field based on reference quantum chemical calculations of glycosidic torsion profiles. *Journal of Chemical Theory and Computation* [online]. 2011, roč. 7, č. 9, s. 2886–2902. ISSN 15499618. Dostupné z: doi:10.1021/ct200162x
- [35] MAIER, J. A., C. MARTINEZ, K. KASAVAJHALA, L. WICKSTROM, K. E. HAUSER a C. SIMMERLING. ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from ff99SB. *Journal of Chemical Theory and Computation* [online]. 2015, roč. 11, s. 3696–3713. ISSN 1549-9618. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jctc.5b00255