Obsah

1.	ÚVOD	
2.	TEORET	TICKÁ ČÁST5
2	.1. RNA	A 5
	<i>2.1.1</i> .	Historie6
	2.1.2.	Druhy RNA
	2.1.3.	Struktura RNA
	2.1.4.	<i>RNA viry</i> 9
	2.1.5.	Struktura
	2.1.6.	Rozdělení
	2.1.7.	Rozmnožování
	2.1.8.	<i>Ribozym</i>
	2.1.9.	Ribozym hepatitidy D
	2.1.10.	Struktura HDV ribozymu
	2.1.11.	Aktivita
2	.2. EXI	PERIMENTÁLNÍ ZÁVĚRY 14
	2.2.1.	Mechanismus obecné zásady (general base)14
	2.2.2.	Mechanismus obecné kyseliny (general acid)14
	2.2.3.	<i>G/U wobble pár</i>
	2.2.4.	Vliv kationtů na aktivitu HDV ribozymu17
2	.3. POČ	ČÍTAČOVÉ SIMULACE 17
	2.3.1.	Molekulární dynamika
	2.3.2.	Potenciální energie
	2.3.3.	Pohybové rovnice
3.	PRAKTI	CKÁ ČÁST23
3	.1. CÍL	PRÁCE
3	.2. ME'	TODY
	3.2.1.	Struktury
	3.2.2.	Molekulární dynamika
	3.2.3.	Analýza MD trajektorií
	3.2.4.	Měřené hodnoty24
4.	VÝSLED	26 XY
4	.2. KO	NSTRUKCE MUTANTŮ HDV RIBOZYMU26

	4.3.	MUTANT G1/C37 S NEPROTONOVANÝM C75	
	4.3.1	. Vodíkové vazby v aktivním místě	
	4.3.2	2. Torze nukleotidů U-1 a G1	
	4.3.3	3. Analýza iontů sodíku v aktivním místě	
	4.4.	MUTANT G1/C37 S PROTONOVANÝM C75	
	4.4.1	l. Vodíkové vazby v aktivním místě	
	4.4.2	2. Torze nukloetidů U-1 a G1	
	4.4.3	8. Analýza iontů sodíku v aktivním místě	
	4.5.	NATIVNÍ G1/U37 S NEPROTONOVANÝM C75	
	4.5.1	l. Vodíkové vazby v aktivním místě	
	4.5.2	2. Torze nukloetidů U-1 a G1	
	4.5.3	8. Analýza iontů sodíku v aktivním místě	
	4.6.	NATIVNÍ G1/U37 S PROTONOVANÝM C75	
	4.6.1	l. Vodíkové vazby v aktivním místě	
	4.6.2	2. Torze nukloetidů U-1 a G1	
	4.6.3	B. Analýza iontů sodíku v aktivním místě	
	4.7.	MUTANT A+1/C37 S NEPROTONOVANÝM C75	
	4.7.1	. Vodíkové vazby v aktivním místě	
	4.7.2	P. Torze nukloetidů U-1 a A+1	
	4.7.3	3. Analýza iontů sodíku v aktivním místě	
	4.8.	MUTANT A+1/C37 S PROTONOVANÝM C75	
	4.8.1	. Vodíkové vazby v aktivním místě	
	4.8.2	P. Torze nukloetidů U-1 a A+1	
	4.8.3	3. Analýza iontů sodíku v aktivním místě	
	4.9.	GRAFY	47
5.	DISF	KUZE	
	,	·	
6.	ZÁV	/ER	
7.	POU	JŽITÁ LITERATURA	70
8.	PŘÍI	LOHY	74

1. ÚVOD

RNA patří mezi makrobiomolekuly, které se skládají z jednoho polynukleotidového vlákna. V dnešní době známe mnoho druhů RNA, jejichž funkce v buňce se liší. RNA se stala zájmem mnoha vědců, výzkumných center i akademických pracovníků a zkoumají ji metodami experimentálními i teoretickými. Od dob, kdy poprvé představili Watson a Crick strukturu DNA a vysvětlili její princip (1), uplynulo mnoho let a za tu dobu jsme v této oblasti udělali velký krok vpřed. První sekvenci RNA, která čítala 77 nukleotidů, objevil a popsal americký biochemik Robert W. Holley v roce 1965 (2). Předpokládá se, že formy RNA pravděpodobně byly i prvními primitivními katalyzátory v živé hmotě (3). Dnes tvoří RNA enzymy (ribozymy) jen nepatrnou část ve srovnání s enzymy tvořenými proteiny. Nicméně jde o zajímavou a ne zcela probádanou oblast enzymové katalýzy.

Ribozym Hepatitidy D (HDV ribozym) je RNA enzym nacházející se v lidském viru Hepatitidy D. Skládá se z 85 nukleotidů a jeho polynukleotidové vlákno tvoří několik sekundárních struktur (4). Trojrozměrné struktury různých forem HDV ribozymu byly získány rentgenovou strukturní analýzou. Nejdůležitější částí ribozymu je aktivní místo tvořené "G1/U37 wobble" párem a katalytickým nukleotiden C75, který je do aktivního místa vnořen. Zde dochází ke štěpení vazby mezi G1 a U-1 bázemi na základě mechanismu obecné acido-bazické (general acid-base) katalýzy (5). Experimentální studie ukazují, že esenciální roli má nukleotid C75 jako katalyzátor nacházející se v blízkosti aktivního místa a dále kovové kationty (monovalentní či divalentní), které zde figurují jako kofaktory (6). Mechanismy této reakce jsou zkoumány experimentálně i teoreticky, bylo navrženo mnoho možných kombinací, ale bohužel zatím bez jasných závěrů.

Mechanismus a stabilitu nejen těchto RNA motivů můžeme s rychlým vývojem výpočetní techniky zachytit pomocí počítačových simulací. Tento moderní nástroj je hojně používán ke studiu problémů fyziky, chemie a biologie na molekulární úrovni. Zvláště pak v biochemii či chemii pracujeme s biomakromolekulami, které čítají několik tisíc atomů. Pro tyto simulace používáme termín molekulární modelování, což není pouhá simulace, ale také sledování tvaru a konformace molekul.

Pozorování RNA motivů ve vodném prostředí je důležité pro pochopení mechanismu rekce, jejich uspořádání v daných podmínkách a užitečné pro následné vyvozování závěrů a možností jak daný problém řešit a ovlivnit.

V bakalářské práci jsem se zaměřil na vývoj a ovlivňování aktivního místa HDV ribozymu pomocí molekulární dynamiky. Zabýval jsem se polohou nukleotidu C75 v aktivním místě a jeho tvorbou vodíkových vazeb, pohybem monovalentních iontů převážně v oblasti žlábku mezi nukleotidy U-1 a G1 a pozoroval změny, které nastaly u mutantů "G1/U37 wobble" páru.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. RNA

Ribonukleová kyselina (RNA) patří mezi makromolekuly tvořené polynukleotidovým řetězcem. Obsahuje čtyři báze: adenin, guanin, cytosin a uracil (obr. 1). Ty jsou vázané na cukernou jednotku ribózu. Řetězec je pak vytvořen spojením pentóz pomocí fosfátových skupin.



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

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

2.1.1. Historie

Události vedoucí k separaci RNA začínaly ve čtyřicátých letech minulého století. V té době se obecně věřilo, že geny mohou obsahovat nebo se skládat z proteinů. Vědci tedy pokládali buněčné jádro za centrum syntézy bílkovin. V roce 1941 Caspersson navrhl, že RNA se bude podílet na syntéze proteinů (7). V souladu s tímto nápadem si Caspersson stále myslel, že protein je nositelem informace z jádra buňky a střídavě byla syntéza proteinů v cytoplazmě aktivována do jisté míry RNA. Genetická role virové RNA byla dokázána v roce 1952 (8) jako její schopnost infekce.

Model struktury DNA byl publikován v roce 1953 vědci Watsonem a Crickem (1) (9). Nesmíme ale zapomenout, že tato struktura byla výsledkem sesbírání rentgenových struktur z různých škol. Z modelu DNA okamžitě vyplynuly informace o principech struktury RNA (10), ale navzdory malé chemické odlišnosti mezi DNA a RNA, vykazují struktury RNA větší tvarovou rozmanitost. Intenzivní práce v této oblasti přinesl v následujícím desetiletí výsledky o mechanismu syntézy pomocí RNA polymerázy a DNA polymerázy.

Dlouho přetrvával názor, že RNA, která nosí jadernou informaci, je ribozomální RNA (rRNA) s tím, že má v cytoplazmě úlohu předlohy pro syntézu bílkovin. Důvodem byla hojnost rRNA a také nebyly známy jiné vhodné formy pro tuto roli.

Postulát genetických základů pro mediátorovou nebo také informační RNA (mRNA) byl pronesen Jacobem a Monodem v roce 1961 (11). Byl založen na interpretaci viru napadající bakterie a zároveň interpretaci bakteriálního enzymu. První kdo však pozorovali mRNA, byli Volkin s Astrachanem v roce 1956 v bakteriích napadených virem (12).

Mezi prvními, kdo objevil transferovou RNA (tRNA), byli Brachet a Jeener už v roce 1944. První originální zmínka se však objevila v teoretických kruzích v poznámce Cricka z roku 1957. V témže roce pak Hoagland s dalšími kolegy popsal přijetí aktivované aminokyseliny na tRNA a její následný výskyt v polypeptidu (13).

2.1.2. Druhy RNA

Nejznámější ribonukleové kyseliny jsou tři: informační (mRNA), přenosová (tRNA) a ribozomální (rRNA) (obr. 2). V dnešní době je známo mnohem více typů RNA, ale uvedené tři však patří mezi nejrozšířenější a nejznámější.

Informační mRNA slouží jako templát pro syntézu proteinů a translaci. Molekuly mRNA jsou heterogenní a jsou tvořeny z jaderného genu obsaženého v DNA procesem, který se jmenuje transkripce. Báze na mRNA jsou rozpoznávány tRNA pomocí tripletů (tří komplementárních bází). Každý triplet se skládá ze tří bází a tento systém se nazývá kodon (obr. 2A).

Přenosová tRNA, jak napovídá název, přenáší aktivované aminokyseliny na ribozom, kde se realizuje syntéza proteinů. Každé aminokyselině přísluší minimálně jedna tRNA. tRNA se skládá z asi 75 nukleotidů. Triplet bází přítomný na jedné ze smyček se nazývá antikodon. Ten se váže na komplementární kodon mRNA (viz obr. 2A).

Ribozomální rRNA je hlavní součásti ribozomů, kde zaujímá roli jak katalytickou tak strukturální. Na ribozomech se při translaci vyskytují všechny tři druhy RNA současně.

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



Obr. 2 (A) Trojlístek tRNA, kde se na 3' konci váže aktivovaná aminokyselina. Označený antikodon se váže na kodon mRNA, která takto nepřímo určuje pořadí aminokyselin. (B) Příklad rRNA nacházející se v ribozomech H. sapiens. Obrázek převzat z práce (14).

2.1.3. Struktura RNA

Struktura RNA se svými vlastnostmi v řadě případů podobá struktuře DNA (viz obr. 1). Strukturně a funkčně je tedy RNA v podstatě pochopitelná z analogie k DNA.

Ve většině případů jsou molekuly RNA složeny z jednoho řetězce se značnými sekundárními segmenty. Protože Watson-Crickovo párování je nepravidelné a neúplné, může být struktura více prostorově komplikovaná než u relativně stálé DNA.

Jednotka skládající se z báze a pentózy se označuje jako nukleosid. Báze je zde spojena s cukernou jednotkou pomocí N-glykosidové vazby. Naváže-li se na nukleosid fosfátová skupina do pozice C5', popisujeme tuto jednotku jako nukleotid. Nukleotidy spojené diesterovou vazbou v pozici 5' a 3' tvoří polynukleotidové řetězce.

Primární struktura RNA je dána kovalentně vázanými sekvencemi bází. Primární struktura molekuly je přítomna ve všech molekulách RNA a s rostoucím uspořádáním do sekundárních a terciárních struktur dochází k větší stabilitě molekuly a přizpůsobení vnějším podmínkám (15).

Sekundární struktura odkazuje na vzájemnou pozici přilehlých nukleotidů, která je ovlivněna zejména elektrostatickými silami (obr. 3).

Terciární struktura zahrnuje prostorové uspořádání makromolekul, pro které je důležité skládání (folding). Struktura závisí ve většině případů na nekovalentních vazbách.

Kvarterní struktura vyplývá ze shlukování řetězců. Dochází k multimolekulárním asociacím RNA-RNA a RNA-protein.



Obr. 3 Sekundární struktura RNA v závislosti na vzájemném postavení nukleotidů.

2.1.4. RNA viry

Viry samy o sobě jsou jednoduché organismy stejně jako ve výpočetní technice, kde se obdobně nazývají jednoduché programy nebo jejich zbytky škodící našemu počítači. Zařazujeme je do skupiny nebuněčných organismů. Mají jednoduchou strukturu. Jsou adaptované na vnitrobuněčný parazitismus a nejsou tedy schopné samostatné existence (16). Dokonce i ke své replikaci využívají hostitelskou buňku. Drtivá většina z nich obsahuje pouze dvě složky živé hmoty a to nukleovou kyselinu a bílkoviny. Našemu organismu viry škodí a způsobují různé druhy onemocnění. V dnešní době známe tisíce druhů virů, které jsou původci onemocněné od dětské obrny až k banální rýmě.

2.1.5. Struktura

Velikost virů se pohybuje mezi 20 až 300 nm. Skládá se z nukleové kyseliny (RNA nebo DNA) a bílkovinného obalu, kapsidy. Kapsida však není povinná u některých infekčních virů, které se vyskytují převážně u rostlin, a nazýváme je viroidy.

2.1.6. Rozdělení

Viry můžeme dělit podle povahy nukleové kyseliny na RNA a DNA viry. Další dělení se zabývá jejich způsobem replikace. Dělíme tak viry do tří skupin, u kterých probíhá:

- a) syntéza RNA podle RNA,
- b) syntéza RNA podle DNA a syntéza DNA podle RNA,
- c) syntéza DNA podle DNA.

U typu *a* je syntéza RNA katalyzována RNA polymerázou, které tyto viry samy kódují. U typu *b* je cyklus transkripce, reverzní (obrácené) transkripce a reakce tvorby RNA z DNA a DNA z RNA katalyzován enzymy RNA polymerázou II a virovou reverzní transkriptázou. Poslední případ (typ *c*) využívá pro svou replikaci DNA polymerázu hostitelské buňky nebo kódují vlastní DNA polymerázu (17).

Další způsob dělení virů je podle jejich schopnosti interakce. Viry infikující živočišnou buňku se nazývají *viry živočišné*, viry napadající rostliny jsou *viry rostlinné*, virům hub říkáme *mykoviry*, virům sinic pak *cyanofágy* a viry napadající bakterie nazýváme *bakteriofágy*.

2.1.7. Rozmnožování

DNA i RNA viry vstupují do buňky, kde se pak rozmnožují pomocí dvou známých infekčních cyklů:

- a) lytický cyklus ten končí rozpadem hostitelské buňky a uvolněním rozmnožených virů
- b) lyzogenní (virogenní) cyklus

Všechny RNA viry se replikují v cytoplazmě a na buněčném jádru jsou nezávislé. Výjimkou je jediný RNA vir chřipky latinsky nazýván *Orthomyxovirus*. Viry, jak zjišťujeme a pociťujeme čím dál častěji, jsou schopny rychlé evoluce. Je to dáno nenapravováním chyb, které vzniknou při působení RNA polymerázy. Mutační rychlost je vysoká. Tyto změny, které se někdy mohou zdát naprosto nevýznamnými, mohou mít někdy až katastrofální následky. Příkladem je resistence některých virů na léčiva, převážně antibiotika.

2.1.8. Ribozym

Dnes známe katalyzátory chemických reakcí v živé hmotě převážně ve formě proteinů. Avšak prvními primitivními katalyzátory pravděpodobně byly úseky RNA, které nazýváme ribozymy. Ve svém evolučním vývoji byly nahrazeny proteiny, ale i přesto můžeme ribozymy pozorovat v dnešním světě a považujeme je za relikty prebiotického světa. Patří mezi ně právě ribozym hepatitidy D.

2.1.9. Ribozym hepatitidy D

Ribozym viru Hepatitidy D (HDV ribozym) je malá samoštěpící se RNA, která se vyskytuje v genomické i antigenomické formě viru a je zodpovědná za virové transkripce viru hepatitidy D. Skládá se z 85 nukleotidů, které tvoří polynukleotidové vlákno s několika sekundárními strukturami. Trojrozměrné struktury HDV ribozymu byly získány rentgenovou strukturní analýzou a jejich seznam shrnuje tabulka 1.

Tab. 1Souhrn struktur HDV ribozymu dostupné na serveru Protein Data Bank.Struktury jsou označovány čtyř místnou zkratkou, jež jsou uvedeny v prvním sloupci.

struktura	metoda	rozlišení	stav	ionty
1sj3	X Ray Diffraction	2,20 Å	prekurzor	Mg^{2+}
1sj4	X Ray Diffraction	2.70 Å	prekurzor	Cu^{2+}
1vbx	X Ray Diffraction	2.70 Å	prekurzor	EDTA
1sjf	X Ray Diffraction	2.75 Å	prekurzor	$[Co(NH_3)_6]^{3+}$
1vby	X Ray Diffraction	2.80 Å	prekurzor	Mn^{2+}
1vbz	X Ray Diffraction	2.90 Å	prekurzor	Ba^{2+}
1vc0	X Ray Diffraction	2.50 Å	prekurzor	Sr^{2+}
1vc5	X Ray Diffraction	3.40 Å	prekurzor	EDTA
1vc6	X Ray Diffraction	2.80 Å	prekurzor	Mg^{2+}
1vc7	X Ray Diffraction	2.45 Å	prekurzor	Sr^{2+}
1drz	X Ray Diffraction	2.30 Å	produkt	Mg^{2+}
2oj3	X Ray Diffraction	2.90 Å	prekurzor	$Tl^{+} a [Co(NH_{3})_{6}]^{3+}$

1cx0	X Ray Diffraction	2.30 Å	produkt	Mg^{2+}
20ih	X Ray Diffraction	2.40 Å	prekurzor	Tl^+

Velmi zajímavé je množení samotného viru hepatitidy D (HDV). Infekce virem hepatitidy D vyžaduje předchozí infekci virem hepatitidy B (HBV) a HDV se zde vyskytuje tedy jako satelitní virus viru hepatitidy D. Pro replikaci HDV genomu byl navržen "double rolling circle model" (18). Zde dochází k replikaci po otáčející se kružnici a právě tuto reakci katalyzuje HDV ribozym. Nejprve dojde k rozštěpení kružnice genomického viru hepatitidy D (pomocí HDV ribozymu), přepisu na antigenomický virus hepatitidy D a následně dojde k přepisu zpět na genomický virus hepatitidy D. Tento mechanismus replikace je hojně využíván u prokaryot, ale kružnicové DNA nebo RNA jsou nacházeny i v lidských buňkách.

2.1.10. Struktura HDV ribozymu

Celková struktura (85 nt) je tvořena 5 kmeny (stem) s Watson-Crickovým párováním bází: P1, P1.1, P2, P3, P4 (viz obr. 4). Ty jsou uspořádány do dvou koaxiálních kup (stacků), které jsou spojeny spojovacími sekvencemi (joining sequences). Nejdůležitější částí HDV ribozymu je aktivní místo tvořené "G1/U37 wobble" párem, skládajícím se z nukleotidů G1 a U37, a katalytickým C75 nukleotidem, který je vnořen do aktivního místa.



Obr. 4 Struktura HDV ribozymu. (A) Barevně jsou odděleny kmeny P1, P1.1, P2, P3, P4, které tvoří sekundární strukturu. Šipka naznačuje místo, kde se HDV ribozym štěpí. (B) 3D struktura HDV ribozymu. Sekundární struktury jsou označeny barevně a korespondují s obrázkem A. Obrázek byl převzat z článku (19).

2.1.11. Aktivita

Ribozym katalyzuje reakci transesterifikace a významně se podílí na uspořádání antigenomického a genomického vlákna během virové replikace. HDV ribozym byl první enzym, u kterého byl objeven fakt, že sám sebe štěpí za účasti nukleotidu C75. Tento proces se děje na základě mechanismu, který se snaží objasnit mono vědců z celého světa. Bylo vydáno mnoho publikací, které směřují k pochopení mechanismu obecné acido-bazické katalýzy (general acid-base), který předpokládá, že nukleotid C75 se může v mechanismu samoštěpení za určitých podmínek chovat buď jako obecná zásada nebo obecná kyselina (viz kapitola 2.2.).

Na aktivitu HDV ribozymu má vliv wobble pár, přítomnost C75 a kationtů. Experimentální studie se intenzivně zabývají umístěním, strukturou a katalytickou funkcí kovových iontů, které pokládají za kofaktory chemické reakce.

2.2. EXPERIMENTÁLNÍ ZÁVĚRY

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

2.2.1. Mechanismus obecné zásady (general base)

V tomto mechanismu je nukleotid C75 neprotonován a má tedy funkci obecné zásady (general base) (19). Atom C75(N3) se váže na atom U-1(O2'). Naproti tomu voda či oxoniový ion bez přítomnosti Mg²⁺ nebo hydratovaný Mg²⁺ se zde nachází jako obecná kyselina a poskytuje vodíkový ion odstupujícímu atomu G1(O5') (obr. 5A). Tento model byl podpořen mnoha krystalovými strukturami, molekulárně dynamickými studiemi a QM/MM studiemi (19).

2.2.2. Mechanismus obecné kyseliny (general acid)

Reakce probíhá opačným způsobem, co se týče role GA a GB. Nukleotid C75 je protonovaný a chová se tedy jako obecná kyselina. Protonem se váže na atom fosfodiesterové vazby G1(O5'). Obecná báze v přítomnosti Mg^{2+} iontů byl navržen Mg^{2+} ion s hydroxidovými skupinami a bez přítomnosti Mg^{2+} iontu to může být hydroxidový ion nebo voda (obr. 5B). Zatím ale neexistuje struktura, která by byla v souladu s mechanismem obecné kyseliny. V blízkosti U-1(O2') byl nalezen monovalentní ion, který se může podílet na stabilizaci aktivního jádra a přenosu protonu (6).



Obr. 5 Dva navrhované mechanismy štěpení HDV ribozymu: (A) Mechanismus obecné zásady – atom U-1(O2') je deprotonován nukleotidem C75, proton se váže na atom C75(N3). Štěpení se děje na atomu G1(O5'). Ten získává proton od obecné kyseliny, kterou může být molekula vody koordinovaná na hořečnatý iont. (B) Mechanismus obecné kyseliny – proton atomu G1(O5') je poskytován protonovaným nukleotidem C75. Nukleofil U-1(O2') je deprotonován obecnou bází. Obrázek byl převzat z práce (19).

2.2.3. G/U wobble pár

Cis Watson-Crick G/U pár (viz obr. 6) je nejběžnější neklasickým párem v RNA. Byl objeven Crickem v roce 1966 při zkoumání antikodon-kodon interakce tRNA a mRNA (20). Není to typické Watson-Crickovo párování, ale pro mnoho RNA je velmi časté a hraje důležitou roli právě při katalýze (21). Někteří autoři uvádí, že nejméně 50% WC párů v 16S a 23S rRNAs obsahuje více jak 1% G/U v sekvenčním uspořádání a kolem 10% všech párů ukazuje 50% nahrazení právě G/U párem (22) (23).

G/U wobble pár vytváří v HDV ribozymu nukleotidy G1 a U37. Tento neklasický pár se vyskytuje v RNA velmi často. Kromě tohoto druhu může být G/U pár nahrazen isosterickými páry G/C, A/U nebo A⁺/C (24). Důležitá je kombinace purinpyrimidin. Experimentálně bylo zjištěno, že obrácená nebo dokonce jiná sekvence bází je neaktivní kombinace pro katalýzu. Dřívější kinetické studie ukazují, že HDV ribozym preferuje v aktivním místě "wobble" pár (G/U nebo A⁺/C), důvod je však stále nejasný (25).

Plně isosterický pár k cis WC G/U je cis WC A⁺/C, který je v důsledku protonace atomu A(N1) jen ojedinělý (26) (27). Kvůli asymetrii však nemůžou být obracené páry bazí k G/U nebo A⁺/C U/G nebo C/A⁺ považovány za isosterické a tedy jimi nahrazeny v případné RNA s podmínkou zachování její funkce.

"G/U wobble" pár poskytuje v oblasti "major groove" (obr. 6) vazebné místo pro divalentní ionty (4) a je nezávislý na pH na rozdíl od páru A⁺/C, který je závislý na pH (28). U páru se v "major groove" nevytváří vazebné místo pro ionty. Důvodem je jiné uspořádání vazeb a protonace dusíku adeninu. Vazebné místo pro ionty v "major groove" se nevyskytují ani u páru G/C a A/U.



Obr. 6 "*G/U* wobble" pár a k němu isosterické formy *G/C*, *A/U* a A^+/C . Obrázek byl převzat z práce (29).

2.2.4. Vliv kationtů na aktivitu HDV ribozymu

Kovové ionty pomáhají vykonávat funkce RNA (30). Katalytická funkce jsou přímo závislé na koncentraci a typu přítomného kationtu (31). Štěpení (self cleaveing) HDV ribozymu se děje mezi nukleotidy U-1 a G1 (viz kapitola 2.2.1 a 2.2.2.). Nukleotid C75 a divalentní ionty aktivují U-1(O2'H) nukleofil a zároveň dochází ke stabilizaci G1(O5'). Pro katalýzu je důležitá přítomnost iontů a to jak divalentních tak monovalentních (32).

Divalentní ionty, které podporují katalýzu HDV ribozymu jsou Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} a Co^{2+} . Z nich má největší význam Mg^{2+} . Tento ion katalyzuje reakci mnohonásobně silněji než jiné divalentní či monovalentní ionty i při nízkých koncentracích (33) (32). Stejně jako C75 i Mg^{2+} můžeme v mechanismu posuzovat jako obecnou kyselinu (general acid) nebo obecnou zásadu (general base). Hydratovaný Mg^{2+} může být donorem protonu pro kyslík O5' (general acid) nebo akceptorem protonu hydroxylové skupiny 2'-OH (general base) (34) (35). Podobnou strukturu a roli hraje v mechanismu kompetitivní inhibitor $[Co(NH3)_6]^{3+}$. $[Co(NH3)_6]^{3+}$ se chová podobně jako Mg²⁺ s tím rozdílem, že nepřenáší protony.

Monovalentní ionty nemají takový vliv na katalýzu. Ta v jejich přítomnosti probíhá pomaleji a pro průběh rychlejší reakce potřebujeme použít koncentrovanější roztok iontů. Nejčastějším iontem, který se na katalýze podílí, je Na⁺. Ten se však experimentálně velmi špatně měří. Proto se používají vetší kovové ionty s lépe měřitelnými vlastnostmi (např. Tl⁺, který je svým atomovým poloměrem a koordinační geometrií podobný iontům K+). Monovalentní ionty se na rozdíl od divalentních lépe uchytí blízko skupiny 2'-OH a pravděpodobně tak pomáhají při mechanismu GB a jeho stabilizaci (36) (6). Dřívější krystalografické studie poukazují na to, že divalentní ionty se nenacházejí blízko 2'-OH, kde by napomáhaly přenosu protonů, při koncentracích vyšších než 20mM. HDV ribozym zde pravděpodobně preferuje monovalentní ionty.

2.3. POČÍTAČOVÉ SIMULACE

Počítačové simulace jsou v dnešní době již nepostradatelnou součástí různých vědeckých odvětví. V chemii si teoretická chemie vydobyla svou pozici a za svoji krátkou existenci sklízí již nemalé úspěchy. Kromě toho umožňují řešit problémy

jiných oblastí např. minimalizace složitých funkcí v kombinatorické optimalizaci. Obecně se tomuto přístupu říká "ab initio".

K popisu systému mnoha částic jako je například protein nebo molekula nukleové kyseliny, používáme různé statistické soubory. Podle fyzikálních podmínek dělíme statistické soubory, kde hlavním kriteriem je, zda je systém popisován klasickou nebo kvantovou mechanikou. Systémy popisovány klasickou mechanikou jsou technicky méně náročné a od toho se odvíjí možnost počítat mnohem větší systémy než je tomu u výpočtů kvantové mechaniky. (37)

2.3.1. Molekulární dynamika

Molekulární dynamikou rozumíme vývoj systému N částic v čase podle zákonů mechaniky. Používáme zde zákonů klasické fyziky, které jsou jednodušší nejen pro pochopení, ale i pro náročnost výpočtu ve srovnání s výpočty kvantovými.

V kvantové chemii docházíme k výsledkům řešením časově závislé Schrödingerovy rovnice (1), resp. stacionární Schrödingerovy rovnice (2)

$$\mathbf{H}|\psi\rangle = i\hbar \frac{\partial}{\partial t}|\psi\rangle \tag{1}$$

$$\mathbf{H}|\psi\rangle = E|\psi\rangle \tag{2}$$

v nichž **H** je Hamiltonův operátor, $|\psi\rangle$ je ket-vektor určující stav Hamiltoniánu, \hbar je redukovaná Planckova konstanta a E je energie systému. Tomuto přístupu říkáme kvantová dynamika (QD) (38). I když používáme pro výpočet aproximace, které vedou k řešení Hartree Fockových rovnic, jsou výpočty komplikované a pro mnoho systému nepočitatelné.

Dalším přístupem je kvantově mechanická molekulová dynamika (QM/MD), která pracuje s Born-Oppenheimerovou aproximací. Ta předpokládá, že jádra jsou až o tři řády těžší než elektrony. Vývoj jader v čase je tedy popisován klasickou mechanikou, ale elektrony jsou počítány kvantovou mechanikou. U biomakromolekul jako proteiny či nukleové kyseliny jsou pro tyto přístupy buď příliš náročné na výpočetní techniku, nebo zcela neřešitelné. Proto používáme metody založené pouze na klasické mechanice často nazývané Newtonovskou mechanikou, která postuluje Newtonovy pohybové zákony (zákon setrvačnosti, zákon síly a zákon akce a reakce). Molekulárně mechanická molekulová dynamika (MM/MD) je prozkoušena i experimentálně a také příliš nezatěžují výpočetní techniku. Kvantově chemické výpočty jsou nahrazeny potenciálovým polem.

2.3.2. Potenciální energie

,

Při použití metody MM/MD je potenciální energie vyjádřena parametricky. V programovém balíku AMBER, který jsem pro své výpočty používal, jsou nevazebné interakce reprezentovány van der Waalsovou a elektrostatickou interakcí. Kovalentní vazby jsou pak parametrizovány délkou vazeb, vazebnými úhly a torzními úhly (38).

Energie vazeb a vazebných úhlů jsou definovány podle rovnic (3). Jsou závislé na druhé mocnině odchylky z rovnovážné polohy.

$$V_{bond} = \sum_{bond} K_r (r - r_0)^2 \qquad V_{angle} = \sum_{angle} K_\alpha (\alpha - \alpha_0)^2$$
(3)

 V_{bond} je vazebný příspěvek potenciální energie, V_{angle} je úhlový příspěvek k potenciální energii, r je vazebná vzdálenost, α vazebný úhel, r_0 a α_0 má hodnotu optimální vazebné vzdálenosti či úhlu. Konstanty K_r a K_{α} značí tuhost vazby resp. úhlů. Příspěvky jsou sumou všech vazeb a úhlů. Takto definovaný potenciál je ve velmi dobré shodě s experimentálně získanými hodnotami, avšak pouze v oblasti minima a nedovoluje pozorovat disociaci vazeb.

Energie torzních úhlů vyjadřuje superpozice několika funkcí (rov. 4)

$$V_{torzion} = \sum_{torzion} \sum_{n} \frac{V_n}{2} \left[1 + \cos(n\phi - \phi_{n0}) \right]$$
(4)

kde $V_{torzion}$ je příspěvek potenciální energie, ϕ je vazebná torze, ϕ_{n0} je fázový posun v n-té periodě. V_n značí výšku potenciálové bariéry, n je perioda jedné harmonické složky. Elektrostatická energie je vyjádřena Coulombovým zákonem (rov. 5) jako interakční energie dvou parciálních nábojů

•

,

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

V čitateli se nachází součin nábojů atomů $q_i q_j$, ve jmenovateli pak permitivita vakua ε_0 a vzdálenost atomů r_{ij} .

Van der Waalsovu interakční energii popisuje Lennard-Jonesův potenciál 12-6 (rov. 6)

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

kde ε_{ij} je hloubka potenciálové jámy, r_{ij} vzdálenost dvou atomů a σ_{ij} je vzdálenost atomů, při níž je potenciální energie nulová. Důležité jsou právě členy r_{ij} ⁻¹² pro repulsi a r_{ij} ⁻⁶ pro disperzi. Průběh Lennard-Jonesova potenciálu je znázorněn na obrázku 7.



vzdálenost (Å)

Obr. 7 Křivka znázorňuje průběh Lennard-Jonesův potenciál nebo také energii v atomových jednotkách v závislosti na vzdálenosti dvou atomů vodíku. Vzdálenost je uváděna v Ångstremech. Energie v minimální hodnotě odpovídá ε_{ij} a místo, kde křivka protíná osu x, odpovídá hodnotě σ_{ij} .

Celková potenciální energie je pak součtem všech výše uvedených přídavků potenciální energie (rov. 7)

$$V_{TOTAL} = V_{bond} + V_{angle} + V_{torzion} + V_{ELS} + V_{VDW}$$
(7)

2.3.3. Pohybové rovnice

.

Každá částice se nachází při simulacích ve výše uvedeném potenciálovém poli a je dána její superpozicí. Na každou částici působí vektor síly $\mathbf{F}(\mathbf{r})$, \mathbf{r} je vektor její polohy. V simulaci se pak přiřadí každé částici její poloha, vektory rychlosti jsou dány náhodně Maxwell-Bolzmannovským rozdělením pro danou teplotu. Pokud známe potenciál, vypočítáme sílu \mathbf{F} , která působí na jednotlivé částice (38) (rov. 8)

$$\mathbf{F}(\mathbf{r}) = -\nabla U \tag{8}$$

V molekulární dynamice sledujeme časový vývoj celé soustavy. Pohybujeme se zde v jednotkách fs. Nejčastěji volíme integrační krok 1fs nebo 2fs. Poloha částice v dalším kroku je pak vyjádřena rovnicí (9)

$$\mathbf{r}_{\mathbf{n}+1} = \mathbf{r}_{\mathbf{n}} + \mathbf{v}_{\mathbf{n}} \cdot \Delta t \tag{9}$$

kde \mathbf{r}_{n+1} je poloha částice v kroku n+1, \mathbf{r}_n poloha v n-tém kroku, \mathbf{v}_n vektor rychlosti a Δt značí integrační krok.

,

Nejdelší simulace se pak pohybují ve stovkách nanosekund. Výsledky takto krátkých simulací nám mohou pomoci při sledování změn struktury u chemických reakcí, které pro svou velkou rychlost nejsou experimentálně zjistitelné.

3. PRAKTICKÁ ČÁST 3.1. CÍL PRÁCE

Mutace G1/U37 "wobble" páru za klasický Watson-Crick pár G1/C38 se sníží rychlostní konstanta ribozymu, ale katalýza i za těchto podmínek probíhá jak zjistili studie molekulárních biologů (25). Detailní mechanismus reakce však nebyl zatím prokázán. Pochopení mechanismu štěpení HDV ribozymu má nesmírný význam pro navržení inhibice rozmnožování. Ke studiu mechanismů biomolekul je vhodné využít metod teoretické chemie.

Cílem mé práce bylo sledovat změny uspořádání nukleotidů v aktivním místě, analýza vodíkových vazeb nukleotidu C75 a důkladná analýza sodíkových iontů v aktivním místě. Všechny analýzy se vztahovaly ke změnám formy C75 a změně "wobble" páru G1/U37 na klasický Watson-Crick pár G1/C37 a A+1/C37 pár. Pro studium chování HDV ribozymu a jeho mutantů byla použita molekulová dynamika.

3.2. METODY

3.2.1. Struktury

Počáteční geometrie byly převzaty z krystalové struktury C75U mutantu HDV ribozymu ze serveru Protein Data Bank (PDB) s kódem 1VC0 a 1SJ3 (Tabulka 1). Struktura katalyticky inaktivního C75U mutantu byla upravena programem LeaP balíku AMBER 9.0 na nukleotid neprotonovaný C75 či protonovaný C75H⁺.

3.2.2. Molekulární dynamika

Všechny MD simulace byly provedeny použitím programového balíku AMBER 9.0 (39) se silovým polem parm99 Cornellové a kol. (40) (41) (42). HDV ribozym byl zasolvatován do obdélníkového boxu s automaticky explicitním modelem vody TIP3P (43). Vzdálenost mezi stěnou boxu a nejbližším atomem solutu byla nastavena na 10 Å. Nejbližší možná vzdálenost rozpouštědla k atomu solutu byla použita vzdálenost 0,7 Å. Parametry pro protonovaný nukleotid C75H⁺ byly do programu LeaP dodány (viz kapitola 8). Systém byl neutralizován sodíkovými kationty Na⁺ umístěné pomocí programu LeaP. Pro vyvážení struktury a následné produkci trajektorií byl použit modul Sander balíku AMBER 9.0. Trajektorie byly spuštěny za teploty 300 K a konstantního tlaku s časovým úsekem 2,0 ps.

3.2.3. Analýza MD trajektorií

Trajektorie byly analyzovány použitím modulu Ptraj balíku AMBER 9.0 a vizualizovány programy PyMOL (44)a VMD (45). Parametry RMSd a gyrační poloměr byly počítány přes všechny atomy fosforu, které se nacházejí v páteři RNA standardními protokoly v modulu Ptraj. Analýzu radiální distribuční funkce byla provedena modulem Ptraj s poloměrem 10 Å. Vodíkové vazby v aktivním místě byly zjištěny programem VMD přes celou trajektorii a převedeny do grafické podoby v programu Corel Draw 12. Nejčastější výskyt iontů byl popsán hustotními mapami spočítané opět modulem Ptraj a vizualizovány programem VMD. Grafy jednotlivých analýz byly vytvořeny programem Gnuplot a uloženy ve formátu PNG s rozlišením 1280x1024.

3.2.4. Měřené hodnoty

Gyrační poloměr (Rg)

Jedná se o vzdálenost od osy rotace, v níž by musela být soustředěna veškerá hmotnost částice, aby měla stejný moment setrvačnosti jako skutečná částice. Gyrační poloměr je definován pro atomy o hmotnosti m_i a umístěných ve vzdálenosti r_i od těžiště celé molekuly jako druhá odmocnina hmotnostního průměru veličiny r_i^2 všech hmotných částic (rov 10).

$$Rg = \left(\frac{\sum_{i=1}^{n} m_{i} \cdot r_{i}^{2}}{\sum_{i=1}^{n} m_{i}}\right)^{1/2}$$
(10)

Střední kvadratická odchylka (RMSD = Root mean square deviation)

je definováno jako míra průměrné vzdálenosti mezi atomy dvou molekul. V našem případě se jedná o vzdálenosti fosforů jednotlivých nukleotidů v řetězci. Matematicky se jedná o druhou odmocninu součtu čtverců rozdílu souřadnic dělena počtem jedinců (atomů)

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

kde $d(x_i, y_i)$ je vzdálenost odpovídajících atomů x_i a y_i , N je počet atomů a w_i značí ohodnocení jednotlivých atomů (nejčastěji rovno jedné nebo relativní atomové hmotnosti)

Hustotní mapa

Hustotní mapa nám poskytuje informaci o nejčastějším výskytu daného atomu, iontu, či molekuly. Nástroj *ptraj* programového balíku AMBER 9.0 nám hustotní mapy převede do formátu, jenž můžeme znázornit ve 3D podobě například programem VMD.

4. VÝSLEDKY

4.2. KONSTRUKCE MUTANTŮ HDV RIBOZYMU

Mutanty RNA motivů všeobecně se experimentálně velmi obtížně a hlavně z ekonomického hlediska nákladně vyrábějí. V tomto směru jsou počítačové simulace vhodnější. Ušetří nám drahocenný čas a finanční prostředky na výrobu jednotlivých mutantů. MD simulace nám umožňují pohled na jednotlivé atomy (all atomic view) a jejich chování v čase, který není schopna pozorovat žádná experimentální metoda, zatím však s nynější výpočetní technikou jen ve stovkách nanosekund.

Konstrukce probíhala pomocí programu LeaP balíku AMBER 9.0. Postupně v pořadí, jak uvidíte dále v textu, byly vytvořeny mutanty, které se liší na nukleotidu 1, 37 a 75. Nukleotid 37 byl obsazen cytosinem (C37) a uracilem (U37). Co se týče nukleotidu 75, ten byl vždy obsazen cytosinem a změna byla v protonaci či deprotonaci atomu C75(N3) (Tabulka 2).

Tab. 2 Přehled jednotlivých simulací divokého typu s G1/U37 "wobble" párem a jeho mutantů s G1/C38 párem a A+1/C37 párem. Proton či neproton značí, zda je nukleotid C75 protonovaný nebo neprotonovaný.

Simulace	Počáteční struktura	Počet nukleotidů	Protonované stavy	Pár 1/37	Délka simulace (ns)	Počet iontů
G1/C37 proton	1vc0	73	C41H ⁺ /C75H ⁺	G/C	40	69 Na ⁺
G1/C37 neproton	1vc0	73	C41H ⁺ /C75	G/C	70	70 Na ⁺
G1/U37 proton	1vc0	73	C41H ⁺ /C75H ⁺	G/U	40	69 Na ⁺
G1/U37 neproton	1SJ3	63 ¹	C41H ⁺ /C75	G/U	40	59 Na ⁺
A+1/C37 neproton	1 SJ 3	63 ¹	$C41H^{+}\!/C75H^{+}$	A+/C	24	58 Na ⁺
A+1/C37 proton	1SJ3	63 ¹	C41H ⁺ /C75	A+/C	23	57 Na ⁺

¹ Struktura neobsahuje deset nukleotidů v P4 stemu. Jedná se o nukleotidy vytvářející smyčku (loop), která však na reakci nemá významný vliv.

4.3. MUTANT G1/C37 S NEPROTONOVANÝM C75

4.3.1. Vodíkové vazby v aktivním místě

Vodíkové vazby v aktivním místě se zjišťovaly pomocí programu VMD přes celou trajektorii jako funkce vzdálenosti těžkých atomů. Jednalo se o atomy O2, O2', O3', O5' rezidua U-1, atomy O1P, O2P, O5' nukleotidu G1, atomy N3, O2, N4 nukleotidu C75 a atomy O1P, O2P rezidua G2. Průběh všech vodíkových vazeb je znázorněn v Grafu 1.



Graf 1 Vzdálenost vodíkových vazeb (těžkých atomů) v simulaci mutantu G1/C37 s neprotonovaným atomem C75(N3).

Jedinou permanentní vazbou v aktivním místě je vazba mezi G1(O2P) a C75(N4). Vazba se vytvoří po 10 ns. Vazby nukleotidu U-1 buď ze začátku simulace zaniknou, nebo se krátce vytvoří při změnách polohy aktivního místa. Mezi další vazby, které je možno postřehnout, jsou G1(O1P), G1(O2P) s C75(N3) a C75(N4). V simulaci jde zřetelně vidět stabilní konformace vodíků C75(N4) na nemůstkující atomy G1(O1P), G1(O2P) (Obrázek 8).



Obr. 8 Počáteční struktura a typická struktura pro mutant G1/C37 s neprotonovaným C75. Vazby jsou znázorněny mezi nukleotidy G1 (červený), C75 (žlutý), C37 (béžový) a U-1 (modrý).

4.3.2. Torze nukleotidů U-1 a G1

Torze se opět zjišťovaly pomocí programu VMD. Jednalo se o torze α , β , γ , δ , ε , ζ nacházející se na páteři RNA a dále pak o torzi χ , která se nachází na N-glykosidické vazbě (viz Obr. 9).



Obr. 9 Rozložení torzí v molekule RNA. V naší simulaci jsme se zabývali torzemi $\alpha 2$, $\beta 2$, $\gamma 2$, $\delta 1$, $\epsilon 1$, $\zeta 1$ a $\chi 1$. B₁ a B₂ značí báze v našem případě uracil -1 a guanin 1. Obrázek byl převzat z článku (46).

Už těsně po 5 ns dojde k výrazné změně torzí $\alpha 2$, $\gamma 2$, $\epsilon 1$. $\alpha 2$ je v počáteční struktuře na hodnotě -90°, později se ustálí na 60°. $\gamma 2$ je na počátku na hodnotě 180° a ustálí se na hodnotě 40°. $\epsilon 1$ má zpočátku hodnotu 180° a po 5 ns se úhel ustálí na hodnotě -160°. Dále se zde vyskytují torze, které jsou velmi nestabilní a flexibilní. Jedná se o torze $\delta 1$, $\chi 1$. Posun torzí je tedy možno vidět už po několika ns (obr. 10). Všechny torze jsou graficky vyobrazeny na grafech 19 a 20.



Obr. 10 Změna uspořádání nukleotidů U-1 a G1 a s tím spojená změna torzních úhlů. Obrázky znázorňují uspořádání před simulací a po ustálení torzních úhlů (6 ns).

4.3.3. Analýza iontů sodíku v aktivním místě

Jak bylo uvedeno již výše, ionty mají vliv na rychlosti štěpení HDV ribozymu a působí jako kofaktory chemické reakce. Simulace mutantů HDV ribozymu byly neutralizovány Na⁺ ionty. Provedli jsme tedy analýzu těchto iontů v aktivním místě, jejich hustotní mapy a vazby na jednotlivé atomy nukleotidů U-1, G1 a C75. Okupance atomů ionty Na⁺ jsou shrnuty v tabulce 3. V potaz byly brány jen ionty, které měly okupanci větší než 1% a byly vzdáleni maximálně 3,5Å.

Tabulka 3 Souhrn okupnací atomů ionty Na⁺. V závorce za procentuálním výsledkem je uveden počet iontů Na⁺, které se u daného atomu vyskytnou během simulace.

		GC C75	GC C75H ⁺	GU C75	$\mathbf{GU} \mathbf{C75H}^+$
RES(ATOM)	ATOM	OKUPANCE (%)	OKUPANCE (%)	OKUPANCE (%)	OKUPANCE (%)
G1(O2P)	Na ⁺	$48,36(1)^2$	$74,36(1)^3$	73,84 (6)	
U-1(O2')	Na ⁺	41,49 (1) ⁴	2,91 (2)	24,70 (4)	16,36 (2)
G1(N7)	Na^+	50,44 (11)	45,17 (8)	26,41 (6)	65,35 (7)
U-1(O3')	Na ⁺	12,89 (1)	$51,1(1)^2$	19,58 (6)	14,46 (2)

² Jedná se o iont 84Na⁺, který se v oblasti aktivního místa objevuje celkem pětkrát s celkovou okupancí
99,78% a s atomem G1O2P tvoří vazbu během simulace po dobu přibližně 34 ns.

³ Jedná se o iont 74Na⁺, který se v oblasti aktivního místa objevuje celkem čtyřikrát a to mezi atomy G1@O2P, C20@O2, U-1@O3' a C75@N4 s celkovou okupancí **150%.**

⁴ Jedná se o iont 138Na⁺, který se v oblasti aktivního místa objevuje celkem šestkrát s celkovou okupancí **83,03%** a s atomem na O2' na residuu U-1 tvoří vazbu během simulace po dobu přibližně **32** ns.

C75(N4)	Na^+	11,48 (1)	$3,63(1)^2$	8,80 (2)	4,98 (1)
G1(O1P)	Na^+	15,66 (7)	16,38 (3)	47,78 (6)	3,69 (2)
C75(O2)	Na^+	10,52 (5)	18,9 (6)	75,05 (4)	
C75(N3)	Na^+	5,38 (3)		55,92 (4)	
G1(O5')	Na^+	1,15 (1)	2,25 (1)	1,10 (1)	
C75(O2')	Na ⁺	5,67 (3)	23,82 (4)	31,59 (3)	2,46 (1)

Mutant G1/C37 s neprotonovaným nukleotidem C75 obsahuje tři dominantní místa s velkou okupancí Na⁺ iontů. Jedná se o atomy G1(O2P), U-1(O2') a G1(N7). První dva jmenované jsou obsazeny pouze jedním iontem. V důsledku toho, že atom C75(N3) je deprotonován, vyskytují se zde Na⁺ ionty. Hustotní mapa je uvedena na obrázku 11.



Obr. 11 Hustotní mapa sodíkových iontů u mutantu G1/C37 s C75. Oranžové šipky (vlevo) značí polohu nukleotidů U-1, G1 a C75 v HDV ribozymu a rozložení nejčastějšího výskytu Na⁺ iontů. Obrázek vpravo je detailní pohled na nukleotidy U-1, G1 a C75. Kruhem jsou označeny hustotní mapy: 1-sodíkové ionty vyskytující se u atomu G1(N7); 2- sodíkové ionty vyskytující se u atomů G1(O1P) a G1(O2P); 3- sodíkové ionty vyskytující se u atomu U-1(O2').

4.4. MUTANT G1/C37 S PROTONOVANÝM C75

4.4.1. Vodíkové vazby v aktivním místě

Deprotonace nukleotidu C75 způsobila zpevnění jeho vazby k nemůstkujícím atomům kyslíku G1 báze. Po krátkém časovém úseku (cca 1 ns) se ustálí silné vodíkové vazby mezi atomy G1(O1P) s C75(N3) a G1(O2P) s C75(N4). Dalšími významnými vazbami v aktivním místě jsou G1(O1P) s C75(N4) a G1(O2P) s C75(N3).

U této simulace jsou patrné i dvě slabé fluktuující vodíkové vazby nukleotidu U-1. Jedná se vazby mezi atomy U-1(O2') s C75(N3) a C75(O2) (Graf 2).



Distance

v simulaci mutantu G1/C37 s protonovaným atomem C75(N3).





Obr. 12 Počáteční struktura a typická struktura pro mutant G1/C37 s protonovaným C75. Vazby jsou znázorněny mezi nukleotidy G1 (červený), C75 (žlutý), C37 (béžový) a U-1 (modrý).

4.4.2. Torze nukloetidů U-1 a G1

Zde opět dochází po ~5 ns k posunutí torzí $\alpha 2$ a $\gamma 2$. $\alpha 2$ je na počátku simulace na hodnotě kolem -90° a po 5 ns se ustálí na hodnotě 70°. $\gamma 2$ je na počátku simulace posunuta do úhlu 180°. Po 5 ns se ustálí na úhlu 50° až do konce simulace. Jako flexibilní torze se projevily $\delta 1$, $\zeta 1$. Zbylé torze jsou stálé po celou dobu trajektorie. Průběhy torzí v čase jsou graficky znázorněny na grafech 21, 22. Pro představu jsou uvedeny i obrázky změny geometrie bazí U-1 a G1 (obr. 13).



Obr. 13 Změna uspořádání nukleotidů U-1 a G1 a s tím spojená změna torzních úhlů. Obrázky znázorňují uspořádání před simulací a po ustálení torzních úhlů (5 ns).

4.4.3. Analýza iontů sodíku v aktivním místě

U mutantu s protonovaným C75(N3) atomem došlo logicky k redukci výskytu iontu v blízkosti atomu C75(N3). Okupance se z tohoto místa přesunula k atomu C75(O2) a procentuální výskyt kontaktních Na⁺ na tomto atomu vzrostl na 18%. Velmi výrazně vzrostla okupance iontů v blízkosti atomu G1(O2P), která dosáhla hodnoty 74%, zatímco okupance iontů okolo atomu C75(O1P) se od mutantu G1/C37 s C75 příliš neliší. V blízkosti atom G1(N7), který je důležitý pro rychlost reakce samoštěpení (4), je okupován Na⁺ ionty. Okupance se pohybuje kolem 45%. Ionty se zde ale velmi často mění (tab. 3). Hustotní mapa je uvedena na obrázku 14.



Obr. 14 Hustotní mapa sodíkových iontů u mutantu G1/C37 s $C75H^+$. Oranžové šipky (vlevo) značí polohu nukleotidů U-1, G1 a C75 v HDV ribozymu a rozložení nejčastějšího výskytu Na⁺ iontů. Obrázek vpravo je detailní pohled na nukleotidy U-1, G1 a C75. Kruhem jsou označeny hustotní mapy: 1-sodíkové ionty vyskytující se u atomů G1(N7), C75(O2) a G1(O1P); 2- sodíkové ionty vyskytující se u atomu G1(O2P); 3- sodíkové ionty vyskytující se u atomu C75(O2).

4.5. NATIVNÍ G1/U37 S NEPROTONOVANÝM C75

4.5.1. Vodíkové vazby v aktivním místě

Změna G1/C37 páru na G1/U37 má vliv na stabilitu a tvorbu vazeb mezi atomy G1(O1P), G1(O2P) s C75(N3) a C75(N4). Tyto vazby nejsou stálé a kolem 5 ns dochází k zániku vazby G1(O1P) s C75(N4) a G1(O2P) s C75(N3). Vazba G1(O2P)

s C75(N4) se zpočátku simulace ani nevytvoří. Vytváří se až kolem 25 ns a trvá přibližně 10 ns (Obrázek 15).

U nukleotidu U-1 dochází po 5 ns také ke ztrátě několika vodíkových vazeb. Jde o vazbu mezi atomy U-1(O2') s C75(N3) a dvě slabé vodíkové vazby mezi atomy U-1(O3') s C75(N3) a U-1(O3') s C75(N4) (Graf 3).



Distance

Graf 3 Vzdálenost těžkých atomů v simulaci mutantu G1/U37 s neprotonovaným atomem C75(N3).

G1/U37 "wobble" pár se váže jinak než klasický Watson-Crick pár G1/C37. To zapříčiňuje přeskládání aktivního místa. Pouze v této simulaci můžeme pozorovat vazbu mezi atomy C75(N3) a U-1(O2') (viz Obrázek 15), která je typická pro mechanismus obecné zásady (general base).





Obr. 15 Počáteční struktura (nahoře) a typická struktura (dole) pro mutant G1/U37 s neprotonovaným C75. Vazby jsou znázorněny mezi nukleotidy G1 (červený), C75 (světle modrý), U37 (béžový) a U-1 (modrý).

4.5.2. Torze nukloetidů U-1 a G1

U tohoto mutantu dochází k výrazné změně hodnot jednotlivých torzí a přestavbě aktivního místa. Torze $\alpha 2$ je na začátku simulace na hodnotě 80° a k jejímu ustálení dochází kolem 15 ns na hodnotě -170°. Ke konci simulace se posouvá na -60°. Torze $\gamma 2$ je v tomto případě stálá a tím se liší od předcházejících simulací. Průměrná hodnota je 50°. V simulaci dochází k posunu torzí $\varepsilon 1$, $\zeta 1$ a $\chi 1$. Torze $\varepsilon 1$ začíná s počáteční hodnotou -160° a po 15 ns se ustálí na -80°. $\zeta 1$ začíná s úhlem 80°, po 15 ns přejde na hodnotu 70°. Torze $\chi 1$ je flexibilnější než předcházející dihedrální úhly, kde z úhlu 140° přejde hned po startu na 100° a opět po 15 ns se ustálí na -80°. Torze $\beta 2$ se nemění během celé simulace a zůstává na 180°. Pro představu jsou uvedeny obrázky změn torzí (obr. 16). Všechny torze jsou graficky znázorněny na grafech 23 a 24.


Obr. 16 Změna uspořádání nukleotidů U-1 a G1 a s tím spojená změna torzních úhlů. Obrázky znázorňují uspořádání před simulací a po ustálení torzních úhlů (19 ns).

4.5.3. Analýza iontů sodíku v aktivním místě

U nativní struktury G1/U37 s C75 je jistá okupance Na⁺ iontů u každých analyzovaných atomů. V důsledku neprotonovaného atomu C75(N3) se zvýšila okupance ionty Na⁺ (55%). Velmi výrazný výskyt Na⁺ iontů můžeme sledovat také u atomu C75(O2) (75%). Opět okupance iontů v blízkosti atomu G1(O2P) je vetší než atomu G1(O1P), ale obě okupance jsou velmi značné (viz tab. 2). U nativní struktury s "G1/U37 wobble" párem se již nevyskytují místa s velkou okupancí Na⁺ iontu pouze jedním iontem Na⁺, ale ionty se zde velmi často mění. Ve srovnání s mutantem G1/C37 s C75H⁺ a jeho atomem G1(O2P) je počet iontů u mutantu G1/U37 s C75 šestinásobný (viz tab. 3). Hustotní mapa je uvedena na obrázku 17.



Obr. 17 Hustotní mapa sodíkových iontů u nativní struktury G1/U37 s C75. Oranžové šipky (vlevo) značí polohu nukleotidů U-1, G1 a C75 v HDV ribozymu a rozložení nejčastějšího výskytu Na⁺ iontů. Obrázek vpravo je detailní pohled na nukleotidy U-1, G1 a C75. Kruhem jsou označeny hustotní mapy: 1-sodíkové ionty vyskytující se u atomů G1(N7), U-1(O2'); 2- sodíkové ionty vyskytující se u atomu G1(O2P).

4.6. NATIVNÍ G1/U37 S PROTONOVANÝM C75

4.6.1. Vodíkové vazby v aktivním místě

Tato modifikace se ukázala jako velmi nevhodná z pohledu tvorby vazeb v aktivním místě. Protonovaný atom C75(N3) se váže na atomy G1(O1P) a G1(O2P) (Obrázek 18).

Nukleotid tvoří vodíkovou vazbu mezi U-1(O5') a G2(O1P). V jiných případech, jak je patrné z grafů, se vazby netvoří (Graf 4).



Distance

Graf 4 Vzdálenost těžkých atomů v simulaci mutantu G1/U37 s protonovaným atomem C75(N3).





Obr. 18 Počáteční struktura (nahoře) a typická struktura (dole) pro mutant G1/U37 s protonovaným C75. Vazby jsou znázorněny mezi nukleotidy G1 (červený), C75 (žlutý), U37 (béžový) a U-1 (modrý).

4.6.2. Torze nukloetidů U-1 a G1

Startovní geometrie se okamžitě po spuštění simulace přeorientuje a přechází na stabilní torze, které si drží až do konce simulace. $\alpha 2$ má počáteční hodnotu -60° a přechází okamžitě na 170°, $\beta 2$ z hodnoty -120 přejde na -180°, $\gamma 2$ má na staru hodnotu -150°, ale ihned se přeorientuje na 50°, $\epsilon 1$ přechází z -130° na -170° a torze $\chi 1$ z 70° na 110°. Torze $\delta 1$, $\zeta 1$ jsou velmi flexibilní po celou dobu simulace. Pro představu jsou uvedeny obrázky změn torzí (obr. 19). Všechny odpovídající torze jsou graficky znázorněny na grafech 25 a 26.



Obr. 19 Změna uspořádání nukleotidů U-1 a G1 a s tím spojená změna torzních úhlů. Obrázky znázorňují uspořádání před simulací a po ustálení torzních úhlů. Torze jsou prakticky stálé po celou dobu simulace.

4.6.3. Analýza iontů sodíku v aktivním místě

U tohoto mutantu došlo k výraznému poklesu míst, kde se vyskytují ionty sodíku. Jedná se o atomy G1(O2P), G1(O5'), C75(N3) a C75(O2). U atomu C75(N3) se tato situace předpokládala z důvodu jeho protonace. Nejvyšší okupanci ionty zaznamenal atom G1(N7) (65%). Další okupance sodíkovými ionty jednotlivých atomů jsou výrazně nižší než u předcházejících mutantů (viz tab. 3). Hustotní mapa je uvedena na obrázku 20.



Obr. 20 Hustotní mapa sodíkových iontů u nativní struktury G1/U37 s C75H⁺. Oranžové šipky (vlevo) značí polohu nukleotidů U-1, G1 a C75 v HDV ribozymu a rozložení nejčastějšího výskytu Na⁺ iontů. Obrázek vpravo je detailní pohled na nukleotidy U-1, G1 a C75. Kruhem jsou označeny hustotní mapy: 1-sodíkové ionty vyskytující se u atomů G1(N7).

4.7. MUTANT A+1/C37 S NEPROTONOVANÝM C75

4.7.1. Vodíkové vazby v aktivním místě

I když simulace tohoto mutantu je kratší než předcházející simulace (~24 ns), pozorujeme už kolem ~2 ns úbytek vodíkových vazeb A+1(O1P) a A+1(O2P) s C75(N3) a C75(N4) (Graf 5). Po 2 ns simulace se však vytvoří vodíková vazba U-1(O5') s atomem C75(N3). Kdyby byl atom C75(N3) protonovaný, jednalo by se o katalýzu obecné kyseliny. V tomto případě, je však atom neprotonovaný.



Distance

Graf 5 Vzdálenost těžkých atomů v simulaci mutantu A+1/U37 s neprotonovaným atomem C75(N3).

V simulaci se změní poloha nukleotidu U-1 tak, že vytváří vazbu trvající ~8 ns mezi atomy U-1(O4) s C37(N4) (Obrázek 21). Tato vazba nebyla v předcházejících simulacích pozorována.





Obr. 21 Počáteční struktura (nahoře) a typická struktura (dole) pro mutant A+1/C37 s neprotonovaným C75. Vazby jsou znázorněny mezi nukleotidy A+1 (červený), C75 (světle modrý), C37 (béžový) a U-1 (modrý).

4.7.2. Torze nukloetidů U-1 a A+1

Torzní úhly se během simulace příliš nemění. $\beta 2$ zůstává po celou dobu na hodnotě 180°. Podobně se chová i torzní úhel $\epsilon 1$ se stálou hodnotou kolem -170°. Mezi hodně flexibilní dihedrální úhly patří $\gamma 2$, držící se v průměru kolem hodnoty 60°, dále pak $\zeta 1$ s průměrnou hodnotou ~70°. Mezi torzní úhly, které změní svou hodnotu a zůstanou v ní po nějakou dobu nebo trvale, patří $\alpha 2$ a $\delta 1$ (Grafy 27, 28). Nejflexibilnějším torzním úhlem je $\chi 1$. Tuto změnu můžeme velmi dobře vidět na obrázku 22, kde je patrná změna pozice nukleotidu C75.



Obr. 22 Změna uspořádání nukleotidů U-1 a A+1 a s tím spojená změna torzních úhlů. Obrázky znázorňují uspořádání před simulací (vlevo) a po ustálení torzních úhlů.

4.7.3. Analýza iontů sodíku v aktivním místě

Změna vyvolaná záměnou nukleotidu G1 na A+1 vyvolala rozdíly ve výskytu iontů Na⁺ na této pozici. U velmi významného atomu G1(N7) týkající se katalýzy je u adeninu zaznamenán značný pokles okupance ionty a to u obou mutantů s protonovaným či neprotonovaným C75 (Tabulka 4).

Mutant s neprotonovaným C75 obsahuje v aktivním místě tři oblasti s okupancí ionty nad 50 %. Jedná se o atomy A+1(O1P), C75(O2) a C75(N3) (Tabulka 4). Výskyt iontů u atomu C75(N3) je pochopitelné z jeho deprotonace a viditelné také u nativní struktury a mutantu G1/C37 s neprotonovaným atomem C75(N3).

Tabulka 4 Souhrn okupnací atomů ionty Na⁺. V závorce za procentuálním výsledkem je uveden počet iontů Na⁺, které se u daného atomu vyskytnou během simulace.

		A+/C C75	$A+/C C75H^+$
RES (ATOM)	ATOM	OKUPANCE	OKUPANCE
		(%)	(%)2
A+1(O2P)	Na ⁺	9,38(2)	43,33(3)
U-1(O2')	Na ⁺	12,65(2)	
A+1(N7)	Na ⁺	2,96(1)	10,84(3)
U-1(O3')	Na^+	36,61(2)	
C75(N4)	Na ⁺	14,01(1)	
A+1(01P)	Na^+	95,44(3)	1,85(1)
C75(O2)	Na ⁺	73,46(3)	32,23(3)
C75(N3)	Na ⁺	61,37(3)	
A+1(05')	Na ⁺		13,11(1)
C75(O2')	Na^+	18,06(3)	5,51(3)

Na hustotní mapě (Obrázek 23) můžeme vidět, že převážná část iontů je soustředěna mezi atomy A+1(O1P), A+1(O2P), C75(O2) a C75(N3). Dalším regionem, označeným na obrázku 23 číslem 2, je okolí atomu C75(N4). Tato okupance, i když atom C75(N4) obsahuje dva vodíky, je pozorována i u dřívějších simulací (viz Tabulka 3).



Obr. 23 Hustotní mapa sodíkových iontů u mutantu A+1/C37 s C75. Oranžové šipky (vlevo) značí polohu nukleotidů U-1, A+1 a C75 v HDV ribozymu a rozložení nejčastějšího výskytu Na⁺ iontů. Obrázek vpravo je detailní pohled na nukleotidy U-1, A+1 a C75. Kruhem jsou označeny hustotní mapy: 1-sodíkové ionty vyskytující se u atomů A+1(O1P), A+1(O2P) a C75(N3); 2- sodíkové ionty vyskytující se u atomu C75(N4).

4.8. MUTANT A+1/C37 S PROTONOVANÝM C75

4.8.1. Vodíkové vazby v aktivním místě

Opět jako u předcházejících simulací s protonovaným atomem C75(N3) dochází k posílení vazeb A+1(O1P nebo O2P) s C75(N3 a N4). Co zde však pozorujeme jako stálou vazbu je vazba atomů U-1(O2') s C75(N3), což je vzhledem k protonaci N3 zvláštní, neboť tato vazba je předpokládaná pro mechanismus obecné báze. Atom C75(N3) zároveň tvoří vazbu s atomem U-1(O3').

Vazba C75(N3) s A+1(O5') důležitá pro mechanismus obecné kyseliny se v této simulaci vůbec nevyskytuje (Graf 6). Podobně se chová atom A+1(O5') i k jiným atomům C75.



Graf 6 Vzdálenost těžkých atomů v simulaci mutantu A+1/C37 s protonovaným atomem C75(N3).



Obr. 24 Počáteční struktura (nahoře) a typická struktura (dole) pro mutant A+1/U37 s protonovaným C75. Vazby jsou znázorněny mezi nukleotidy A+1 (šedý), C75 (světle modrý), C37 (stříbrný) a U-1 (červený).

4.8.2. Torze nukloetidů U-1 a A+1

I když oproti mutantu A+1/C37 s C75 je u tohoto mutantu změna pouze v protonaci nukleotidu C75, došlo zde k jiným změnám torzních úhlů a jinému uspořádání nukleotidů U-1 a A+1. Pozorujeme zde čtyři stálé torzní úhly $\alpha 2$ (60°), $\beta 2$ (160°), $\gamma 2$ (40°) a $\zeta 1$ (90°). Torzní úhel $\delta 1$ se ihned po startu simulace přesouvá z hodnoty 70° na hodnotu 110°, pak se ale flexibilně vrací k hodnotě 80°. $\varepsilon 1$ mění svou hodnotu po 2 ns simulace z -160° na -90°, kde setrvá ~5 ns. Poté se opět vrací na hodnotu -160°. Na konci simulace osciluje mezi těmito dvěma hodnotami. $\chi 1$ je zpočátku simulace flexibilní. Okamžitě po startu se přesouvá z hodnoty 120° na 160° a po ~2 ns se posunuje na hodnotu 90° (Grafy 29, 30).



Obr. 25 Změna uspořádání nukleotidů U-1 a A+1 a s tím spojená změna torzních úhlů. Obrázky znázorňují uspořádání před simulací (vlevo) a po ustálení torzních úhlů.

4.8.3. Analýza iontů sodíku v aktivním místě

Mutant A+1/C37 s protonovaným C75 neobsahuje atom v aktivním místě, který byl okupován ionty Na⁺ nad 50%. Oproti mutantu s neprotonovaným C75 došlo k redukci výskytu iontů u atomů U-1(O2'), U-1(O3'), C75(N4) a C75(N3). Můžeme vidět pouze dva atomu s výraznější okupancí ionty a to C75(O2) (32%), A+1(O2P) (43%) (Tabulka 4). Tato změna v okupancích může být dán jiným uspořádáním aktivního místa.

Protonavaný atom C75(N3) vytváří vodíkovou vazbu s atomem A+1(O1P). Nukleotid C75 se stabilizuje pomocí atomu C75(O2) s A+1(O2P) přes sodíkové ionty (Obrázek 26). Z hustotní mapy v aktivním místě pozorujeme další dvě až tři místa s častým výskytem iontů. Jedná se o atomy A+1(N7), U-1(O5') a také o atom A+1(O5').



Obr. 26 Hustotní mapa sodíkových iontů u mutantu A+1/C37 s $C75H^+$. Oranžové šipky (vlevo) značí polohu nukleotidů U-1, A+1 a C75 v HDV ribozymu a rozložení nejčastějšího výskytu Na⁺ iontů. Obrázek vpravo je detailní pohled na nukleotidy U-1, A+1 a C75. Kruhem jsou označeny hustotní mapy: 1-sodíkové ionty vyskytující se u atomů A+1(O2P) a C75(O2); 2- sodíkové ionty vyskytující se u atomu A+1(N7); 3- sodíkové ionty přítomné u atomu U-1(O5').

4.9. GRAFY

Jednotlivé grafy byly sestaveny pomocí programu Gnuplot. Obrázky jsou ve formátu PNG a s rozlišení 1280 x 1024. Jednotlivé grafy znázorňují časový průběh Rg, RMSD a torze nukleotidu U-1 a G1 či A+1.



Graf 7, 8 Časový vývoj gyračního poloměru, RMSD pro systém s G1/C37 párem a neprotonovaným atomem C75(N3).



Graf 9, 10 Časový vývoj gyračního poloměru, RMSD pro systém s G1/C37 párem a protonovaným atomem C75(N3).



Graf 11, 12 Časový vývoj gyračního poloměru, RMSD pro systém s G1/U37 párem a neprotonovaným atomem C75(N3).



Graf 13, 14 Časový vývoj gyračního poloměru, RMSD pro systém s G1/U37 párem a protonovaným atomem C75(N3).



Graf 15, 16 Časový vývoj gyračního poloměru, RMSD pro systém s A+1/C37 párem a neprotonovaným atomem C75(N3).



Graf 17, 18 Časový vývoj gyračního poloměru, RMSD pro systém s A+1/C37 párem a protonovaným atomem C75(N3).



Graf 19 Časový průběh torzí α , β , γ , δ mutantu G1/C37 s neprotonovaným nukleotidem C75.



Gra. 20 Časový průběh torzí ε , ζ , χ mutantu G1/C37 s neprotonovaným nukleotidem C75.



Graf 21 Časový průběh torzí α , β , γ , δ mutantu G1/C37 s protonovaným nukleotidem C75.



Graf 22 Časový průběh torzí ε , ζ , χ mutantu G1/C37 s protonovaným nukleotidem

C75.



Graf 23 Časový průběh torzí α , β , γ , δ mutantu G1/U37 s neprotonovaným nukleotidem C75.



Graf 24 Časový průběh torzí ε, ζ, χ mutantu G1/U37 s neprotonovaným nukleotidem C75.



Graf 25 Časový průběh torzí α , β , γ , δ mutantu G1/U37 s protonovaným nukleotidem C75.



C75.



Graf 27 Časový průběh torzí α , β , γ , δ mutantu A+1/C37 s neprotonovaným nukleotidem C75.



Graf 28 Časový průběh torzí ε , ζ , χ mutantu A+1/C37 s neprotonovaným nukleotidem

C75.



Graf 29 Časový průběh torzí α , β , γ , δ mutantu A+1/C37 s protonovaným nukleotidem C75.



Graf 30 Časový průběh torzí ε , ζ , χ mutantu A+1/C37 s protonovaným nukleotidem C75.

5. DISKUZE

Všech šest simulací představuje stabilní časové trajektorie, ve kterých pět kmenů s Watson-Crickovým párováním bází: P1, P1.1, P2, P3, P4 (viz obr. 4) zůstává relativně blízko krystalových struktur, což vyplývá z jejich topologie. Tato celková stabilita molekuly je dána kompaktním složením struktury, sítí vodíkových vazeb a patrových interakcí (stacků).

Experimenty zabývající se HDV ribozymem a jeho štěpením poukazují na to, že krystalová struktura rozštěpeného ribozymu (produktu) ukazuje, že C75 je v pozici obecné kyseliny (47), zatímco struktura před rozštěpením (prekurzor) je přítomna s C75 na pozici obecné báze (48).

Analýza vazeb v aktivním místě HDV ribozymu

V MD simulacích prezentovaných v této bakalářské práci, jejichž struktury jsou struktury prekurzorů, jsem zanalyzoval vazby v aktivním místě (Grafy 1-6). Pro mechanismus obecné báze je důležitá vazba C75(N3) na U-1(O2'). Ta se ze startu simulací objevuje takřka ve všech simulacích právě z důvodů struktury prekurzorů. Nicméně ve všech případech dochází k přerušení vazby v rozmezí 3-9 ns po startu MD simulací. Pouze ve třech případech dojde k opětovnému vytvoření vazby. Jedná se o nativní strukturu G1/U37 s C75 a mutanty G1/C37 s C75H⁺ a A+1/C37 s C75H⁺. Výsledek týkající se vazby C75(N3) - U-1(O2') struktury s G1/U37 "wobble" párem jsou v souladu s předcházejícími MD simulacemi Krasovské a kol. (49). Vodíková vazba mezi atomy C75(N3) a U-1(O2') je v mých simulacích pozorována častěji, neboť simulace prezentované v této bakalářské práci jsou čtyřikrát delší než v článku Krasovské a kol.

Stejně jsem zanalyzoval vazbu C75(N3) s G1 nebo A+1(O5'), která je důležitá v případě, že C75 figuruje jako obecná kyselina. Zmíněná vazba se však nevyskytla u žádné simulace obsahující C75H⁺. Naopak u simulací obsahující pouze C75 se jasná vazba mezi atomy vyskytla ve dvou ze tří případů, u struktury G1/U37 a A+1/C37 s C75 (Grafy 3 a 5). Protože se však vazba nevyskytla u struktur s C75H⁺, nemůžeme z prezentovaných simulací zatím domněnku o mechanismu obecné kyseliny potvrdit.

MD simulace poukazují na vazby G1(O1P a O2P), A+1(O1P a O2P) s C75(N3 a N4) jako na nejčastější kontakty v aktivním místě (Grafy 1-6). Pozorujeme zde zesílení vazeb při protonaci atomu C75(N3) (viz Grafy 2, 4, 6). Podle dřívější práce, zabývající se MD simulacemi nativní struktury s G1/U37 "wobble" párem, Krasovské a kol. (49) je právě protonovaný nukleotid C75 vázán na G1(O1P nebo O2P) atomem C75(N3).

Podle práce Krasovské a kol. bude hrát důležitou roli pro katalýzu také smyčka L3 a hlavně její G25/U20 "wobble" pár. Výsledky analýzy vazeb v aktivním místě prezentované v této bakalářské práci u struktur s G1/U37 "wobble" párem se shodují s výsledky práce Krasovské a kol. (49).

Analýza Na⁺ iontů v aktivním místě HDV ribozymu

Atom G1(N7) je podle nedávno publikovaných experimentálních prací (4) důležitý pro katalýzu samoštěpící reakce HDV ribozymu. Absencí tohoto atomu došlo k výraznému snížení aktivity HDV ribozymu. V okolí atomu G1(N7) byl potvrzen výskyt divalentních iontů Mg^{2+} . Závislost kinetiky reakce na přítomnosti Mg^{2+} ionty byla získána pro genomický HDV ribozym s G1/U37 a mutanty G1/C37, A1/U37 a A+1/C37 páry v aktivním místě, všechny vyznačují se podobným chováním. Absence divalentních iontů vedla opět ke snížení aktivity.

V MD simulacích týkajících se nativního stavu G1/U37 a mutantu G1/C37 je okupance atomu G1(N7) skoro ve všech případech nad 50% (viz Tabulka 3) a nezáleželo na protonaci čí deprotonaci nukleotidu C75. Tyto výsledky můžeme pozorovat i na hustoptních mapách iontů z MD simulací, i když jsme na rozdíl od experimentátorů pracovali s monovaletními ionty Na⁺. Rozdíl nastal u mutantu A+1/C37. Tím, že adenin je kladně nabit, okupance ionty atomu G1(N7) vymizely (viz Tabulka 4). Převážná většina iontů, přítomných v aktivním místě, se přesunula do oblasti kyslíku fosfátové skupiny O1P a O2P nukleotidu A+1. Za zajímavý postřeh stojí určitě to, že snížení okupance v blízkosti atomu A+1(N7) je přítomna u obou simulací mutantu A+1/C37. Z toho pokud A+1/C37 mutant měl C75H⁺, výskyt Na⁺ iontů se u atomu G1(N7) zpětinásobil ve srovnání s mutantem A+1/C37 s C75. Avšak

tento poznatek musíme brát s rezervou vzhledem k délce MD simulací těchto dvou mutantů.

V případech velké okupance atomu G1(N7) ionty by výsledky mohly vést k tvrzení, že C75 by se v protonované formě mohl chovat jako obecná kyselina a ionty (monovalentní či divalentní) by mohly být ve formě obecné báze. Naše pozorování je tak ve shodě s experimentálními daty publikovanými Bevilacqou a kol. (4). Dále odpovídá předpokladu, že G/U "wobble" páry vytváří kapsy záporného potenciálu, které vážou ionty.

Dále stojí za zmínku také další atomy. Na atomu G1(O5') nebo A+1(O5') dochází ke štěpení při acido-bazické katalýze. U atomu se během simulací nevyskytly výrazné okupance ionty Na⁺, u některých dokonce úplně vymizely. Pokud bychom brali v úvahu mechanismus obecné zásady, atom O5' by musel být obklopen iontem, který by se zde choval jako obecná kyselina. Nepřítomnost iontů tedy spíše nahrává mechanismu obecné kyseliny. Nicméně zde mohou být ionty vázány na atom přes první solvatační sféru, které by lépe identifikovaly mapy hustoty vod.

Velmi silně okupovanými atomy ionty Na⁺ v aktivním místě jsou G1(O1P), G1(O2P) či A+1(O1P) a A+1(O2P). Dominantní okupance se nachází ve většině případů jen na jednom z atomů a záleží na uspořádání aktivního místa. Jediný případ, kdy atomy G1(O1P) a G1(O2P) nejsou v přítomnosti Na⁺ iontů, je nativní struktura GU s C75H⁺. Tyto atomy zde tvoří vazbu s nukleotidem C75 a ionty se zde už nemohou vázat (viz kapitola 4.6.).

6. ZÁVĚR

V této práci jsem použil pro studium HDV ribozymu MD simulace, které nám mohou ukázat vývoj systému v čase. Sestavil jsem řadu struktur HDV ribozymu, které se lišily nukleotidy na pozici 1 a 37 a také protonaci či deprotonaci nukleotidu C75. Postupně prošli simulacemi struktury mutantu G1/C37, nativní struktura s G1/U37 "wobble" párem a mutant A+1/C37. Struktury odpovídaly krystalovým strukturám prekurzorů HDV ribozymu.

Výsledky MD simulací s G1/U37 "wobble" párem byly již dříve publikovány v článku Krasovské a kol. (49). Výsledky mých simulaci s G1/U37 "wobble" párem v analyzovaných vazbách v tomto případě souhlasí s analýzou vazeb publikované v článku Krasovské (49) (Grafy 3, 4). Další mutanty a jejich vazby mezi nukleotidy U-1, G1 nebo A+1 a C75 nepotvrdily myšlenky mechanismu obecné zásady či kyseliny.

Identifikoval jsem přítomnost iontů u atomů G1(N7) nebo A+1(N7), C75(N3) či G1(O5') nebo A+1(O5'), které jsou důležité pro katalýzu a zároveň u dalších atomů nacházející se v aktivním místě HDV ribozymu (viz Tabulka 3 a 4). Zjistil jsem, že přítomnost iontů u atomu G1(N7) nezáleží na protonaci či deprotonaci atomu C75(N3) a je v simulacích obsahující G1/U37 "wobble" pár nebo G1/C37 pár velmi často okupován ionty Na⁺. Tyto výsledky týkající se výskytu iontů v aktivním místě korespondují s experimenty prezentované v práci Bevilacqua a kol. (4). Nicméně Bevilacqua tvrdí, že ionty, které mohou mít funkci obecné báze, se vyskytují blízko atomu G1(N7). V případě A+1/C37 páru okupace ionty atomu A+1(N7) vymizela, ale aktivita mutantu s A+1/C37 párem je podobná aktivitě strukturám s G1/U37 nebo G1/C37 párem. Jak vysvětlit tento fakt? To bude zřejmě cílem dalších vědeckých prací.

Z výsledků týkajících se iontů v aktivním místě lze potvrdit myšlenky experimentátorů v práci (4), které se přiklánějí k mechanismu obecné kyseliny. Nicméně z analýzy vazeb nevyšel žádný jasný výsledek a z tohoto hlediska lze pouze souhlasit s tvorbou vazeb u nativní struktury prezentované již dříve v článku Krasovské a kol. (49).

Ve výzkumu HDV ribozymu musíme čekat na další krystalové struktury, experimentální a teoretické výsledky. Nicméně kompletní výsledky prezentované v mé bakalářské práci mohou pomoci při budoucím objasnění mechanismu štěpení HDV ribozymu a bližšímu pochopení rozmnožování viru hepatitidy D.

7. POUŽITÁ LITERATURA

1. Watson, JD a Crick, FHC. Molecular structure of nucleic acids-A structure of deoxyribose nucleic asid. *NATURE*. 1953, stránky 737-738.

2. Holley, RW., a další. Structure of a ribonucleic acid. Science. 1965, 147, stránky 1462-5.

3. Harris, ME a Cassano, AG. Experimental analyses of the chemical dynamics of ribozyme catalysis. *CURRENT OPINION IN CHEMICAL BIOLOGY*. 2008, stránky 626-639.

4. **Chen, JH., a další.** A catalytic metal ion interacts with the cleavage site GU wobble in the HDV ribozyme. *Biochemistry*. 2009, 48(7), stránky 1498-1507.

5. Ferré-D'Amaré, AR. a Doudna, JA. Crystallization and structure determination of a hepatitis delta virus ribozyme: use of the RNA-binding protein U1A as a crystallization module. *J Mol Biol.* 2000, 295(3), stránky 541-56.

6. **Cerrone-Szakal, Andrea, Siegfried, Nathan a Bevilacqua, Philip.** Mechanistic Characterization of the HDV Genomic Ribozyme: Solvent Isotope Effects and Proton Inventories in the Absence of Divalent Metal Ions Support C75 as a General Acid. *Journal of the American Chemical Society*. 09. Říjen 2008, stránky 14504-14520.

7. **Caspersson, T. a Schultz, J.** Ribonucleic acids in both nucleus and cytoplasm, and the function of the nucleolus. *Proc. N. A. S.* 1940, 26, stránky 507-515.

8. Gierer, A. a Schramm, G. INFECTIVITY OF RIBONUCLEIC ACID FROM TOBACCO MOSAIC VIRUS. *Nature*. 1956, stránky 702-703.

9. Watson, JD. a Crick, FH. Structure of DNA. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 1953, 18, stránky 123-31.

10. Rich, A. a Watson, JD. Some relations between DNA and RNA. *Proc. N. A. S.* 1954, 40, stránky 759–764.

11. Jacob, F. a Monod, J. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J Mol Biol.* 1961, 3, stránky 318-56.

12. Volkin, E. a Astrachan, L. Phosphorus incorporation in Escherichia coli ribo-nucleic acid after infection with bacteriophage T2. *Virology*. 1956, 2, stránky 149-61.

13. Hoagland, MB., Zamecnik, PC. a Stephenson, ML. Intermediate reactions in protein biosynthesis. *Biochim Biophys Acta*. 1957, 24, stránky 215-6.

14. Wuyts, J, a další. The European Large Subunit Ribosomal RNA Database. *Nucleic Acids.* 2001, stránky 175–177.

15. Sirlin, J. L. Biology of RNA. New York and London : Academic Press, 1972.

16. Chalupová-Karlovská, Vlastimila. *Obecná biologie*. Olomouc : Nakladatelství Olomouc, s.r.o., 2002.

17. Závada, Vojtěch. RNA viry, viroidy a viry replikující se reversní transkripcí. Praha : Nakladatelství Peres, 1999.

18. Been, MD. a Wickham, GS. Self-cleaving ribozymes of hepatitis delta virus RNA. Eur J Biochem. 1997, 247(3), stránky 741-53.

19. Banas, Pavel, a další. General base catalysis for cleavage by the active-site cytosine of the hepatitis delta virus ribozyme: QM/MM calculations estabilish chemical feasibility. *J. Phys. Chem.* 2008, 112(35), stránky 11177-87.

20. Crick, F.H. Codon-anticodon pairing: the wobble hypothesis. J. Mol. Biol. 1966, stránky 548-555.

21. **Varani, G. a McClain, W.H.** The G x U wobble base pair. A fundamental building block of RNA structure crucial to RNA function in diverse biological system. *EMBO Rep.* 2000, stránky 18-23.

22. Gutell, R.R., Larsen, N. a Woese, C.R. Lessons from an evolving rRNA: 16S a 23S rRNA structures from a comparative perspective. *Microbiol.* 1994, stránky 10-26.

23. Gautheret, D., Konings, D. a Gutell, R.R. G.U base pairing motifs in ribosomal RNA. *RNA*. 1995, stránky 807-814.

24. **Mokdad, Ali, a další.** Structural and evolutionary classification of G/U wobble basepair in the ribosome. *Nucleic Acids Research.* 6. Březen 2006, stránky 1326-1341.

25. **Perrotta, AT. a Been, MD.** Core sequences and a cleavage site wobble pair required for HDV antigenomic ribozyme self-cleavage. *Nucleic Acids Res.* 1996, 24, stránky 1314-21.

26. Leontis, N.B., Stombaugh, J. a Westhof, E. The non-Watson-Crick base pair and their associated isostericity matrices. *Nucleic Acids Res.* 2002, stránky 3497-3531.

27. **Doudna, J.A., Cormack, B.P. a Szostak, J.W.** RNA structure, not sequence, determines the 5' splice-site specificity of a group I intron. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1989, stránky 7402-7406.

28. **Hesslein, AE., a další.** Exploration of the conserved A+C wobble pair within the ribosomal peptidyl transferase center using affinity purified mutant ribosomes. *Nucleic Acids Res.* 2004, 32(12), stránky 3760-70.

29. **Cerrone-Szakal, A.L., a další.** Mechanistic characterization of the HDV genomic ribozyme: The cleavage site base pair plays a structural role in facilitating catalysis. *RNA.* 2008, 14(9), stránky 1746-60.

30. Pyle, A. M. Metal ions in the structure and function of RNA. J. Biol. Inorg. Chem. 2002, stránky 679-690.

31. Hanna, R. a Doudna, J. A. Metal ions in ribozyme folding and catalysis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2000, stránky 166-170.

32. **Cerrone-Szakal, A. L., Siegfried, N. A. a Bevilacqua, P. C.** Mechanistic characterization of the HDV genomic ribozyme: solvent isotope effects and proton inventories in the absence of divalent metal ions support C75 as the general acid. *J. Am. Chem. Soc.* 2008, stránky 14504-14520.

33. **Nakano, S., Proctor, D. J. a Bevilacqua, P. C.** Mechanistic characterization of the HDV genomic ribozyme: assessing the catalytic and structural contributions of divalent metal ions within a multichannel reaction mechanism. *Biochemistry.* 2001, stránky 12022-12038.

34. Nakano, S., Chadalavada, D. M. a Bevilacqua, P. C. General acid-base catalysis in the mechanism of a hepatitis delta virus ribozyme. *Science*. 2000, stránky 1493-1497.

35. Das, S. R. a Piccirilli, J. A. General acid catalysis by the hepatitis delta virus ribozyme. *Nat. Chem. Biol.* 2005, stránky 45-52.

36. **Ke, Ailong, a další.** Structural Roles of Monovalent Cations in the HDV Ribozyme. *Structure*. Březen 2007, stránky 281-287.

37. **Ivo Nezbeda, Jiří Kolafa, Miroslav Kotrla.** Úvod do počítačových simulací. Praha : Karolinum, 1998.
Banáš, Pavel. Diplomová práce. Molekulární dynamika haloalkan dehalogenáz. Olomouc : Přírodovědecká knihovna, 2004.

39. Case, D. A., a další. AMBER 9.0. San Francisko : University of California, 2006.

40. **Cornell, W. D., a další.** A 2nd generation force-field for the simulation of proteins, nucleic acids, and organic-molecules. *J. Am. Chem. Soc.* 117. 1995, stránky 5179-5197.

41. Wang, J. M., Cieplak, P. a Kollman, P. A. How well does a restrained electrostatic potential (RESP) model perform in calculating corformational energies of organic and biological molecules? *J. Comput. Chem. 21.* 2000, stránky 1049-1074.

42. **Cheatham, T. E., Cieplak, P. a Kollman, P. A.** A modified version of the Cornell et al. force field with improved sugar pucker phases and helical repeat. *J. Biomol. Struct. Dyn. 16.* 1999, stránky 845-862.

43. Jorgensen, W. L., a další. Comparison of simple ptential functions for simulating liquid water. J. Chem. Phys. 79. 1983, stránky 926-935.

44. DeLano, W. L. The PyMOL Molecular Graphics System. 2002.

45. Humphrey, W., Dalke, A. a Schulten, K. VMD: Visual molecular dynamics. J. Mol. Graph. 14. 1996, stránky 33-38.

46. Vokacova, Z., a další. Structure and dynamics of the ApA, ApC, CpA, and CpC RNA dinucleoside monophosphates resolved with NMR scalar spin-spin couplings. *J Phys Chem B*. 2009, 113, stránky 1182-91.

47. Ferre-D'Amare, A.R., Zhou, K. a Doudna, J.A. Crystal structure of a hepatitis delta virus ribozyme. *Nature*. 1998, 395, stránky 567-574.

48. **Ke, A., a další.** A conformational switch controls hepatitis delta virus ribozyme catalysis. *Nature.* 2004, 429, stránky 201-205.

49. **Krasovska, M. V., a další.** Structural dynamics of precursor and product of the RNA enzyme from the hepatitis delta virus as revealed by molecular dynamics simulations. *J. Mol. Biol.* 2005, 351, stránky 731-748.

8. PŘÍLOHY

Příloha 1 Parametry pro protonovaný cytosin.

	RCP	INT	1					
(CHANGE	TIMO 3	DU	BEG				
0.00000								
	1	DUMM	DU	М	0.000000	0.000000	0.000000	0.00000
	2	DUMM	DU	М	1.449000	0.000000	0.000000	0.00000
	3	DUMM	DU	М	2.078700	1.385600	0.000000	0.00000
	4	Ρ	P	М	2.314489	1.776673	-0.478436	1.166200
	5	01P	02	E	1.933410	3.073374	-1.081549	-0.776000
	6	O2P	02	E	3.156547	0.871841	-1.292450	-0.776000
	7	05'	OS	М	2.994369	2.142475	0.922974	-0.498900
	8	C5'	СТ	М	2.156035	2.551837	2.019887	0.055800
	9	H5 ' 1	Н1	E	1.452687	1.753841	2.257803	0.067900
	10	Н5'2	Н1	E	1.604968	3.450028	1.741178	0.067900
	11	C4'	СТ	М	3.008252	2.847921	3.243186	0.106500
	12	H4'	H1	E	2.447118	3.477373	3.933851	0.117400
	13	04'	OS	S	3.228121	1.605168	3.977231	-0.354800
	14	C1'	CT	В	4.558614	1.150950	3.777548	0.006600
	15	H1'	Н2	E	5.072002	1.095281	4.737461	0.202900
	16	N1	N*	S	4.485689	-0.234531	3.276984	-0.123500
	17	C6	CM	В	4.434822	-0.525287	1.944988	0.320000
	18	НG	H4	E	4.450328	0.280846	1.226944	0.190000
	19	C5	CM	В	4.343212	-1.803676	1.520274	-0.740000
	20	Н5	HA	E	4.291174	-2.014169	0.462316	0.280000
	21	C4	CA	В	4.319830	-2.824428	2.526674	1.040000
	22	N4	N2	В	4.226588	-4.113038	2.170429	-1.050000
	23	H41	Н	E	4.213907	-4.831230	2.880581	0.490000
	24	H42	Н	Ε	4.169275	-4.366118	1.194777	0.490000
	25	NЗ	NA	В	4.390522	-2.522967	3.828979	-0.760000
	26	нЗ	Н	E	4.378261	-3.256188	4.508751	0.440000
	27	C2	С	S	4.475763	-1.230819	4.236789	0.840000
	28	02	0	Ε	4.540867	-0.935393	5.427913	-0.510000
	29	C3'	СТ	М	4.415606	3.377827	2.961306	0.202200
	30	н3'	H1	E	4.412072	3.941489	2.028369	0.061500
	31	C2'	СТ	В	5.230443	2.095696	2.779425	0.067000
	32	H2 ' 1	Η1	E	5.668211	2.081313	1.781301	0.097200
	33	02'	OH	S	6.272982	2.049941	3.757136	-0.613900
	34	но'2	HO	Ε	6.759278	1.235228	3.610987	0.418600
	35	03'	OS	М	5.029898	4.128649	3.998279	-0.524600

IMPROPER								
C6	C2	N1	C1'					
N1	NЗ	C2	02					
C2	C4	NЗ	HЗ					
C4	H41	N4	H42					
N1	C5	C6	НG					
C6	C4	C5	H5					
NЗ	C5	C4	N4					
T.OOP	CLOST	NG EX	XPT.TCT					

LOOP CLOSING EXPLICIT C1' C2' C2 N1

DONE STOP

Příloha 2 Parametry pro protonovaný adenin.

RAP	XYZ	0								
CHANG	ΈE	OMIT	DU	BEG						
0.0	000									
1	DUMM	1 DU	Μ	0	-1	-2	0.00	0.00	0.00	0.0000
2	DUMM	1 DU	М	1	0	-1	1.00	0.00	0.00	0.0000
3	DUMM	1 DU	Μ	2	1	0	1.00	90.00	0.00	0.0000
4	P	P	М	3	2	1	1.60	119.04	200.00	1.1662
5	Olp	02	Ε	4	3	2	1.48	109.61	150.00	-0.7760
6	O2P	02	Ε	4	3	2	1.48	109.58	20.00	-0.7760
7	05'	OS	М	4	3	2	1.60	101.43	-98.89	-0.4989
8	C5'	CT	М	7	4	3	1.44	119.00	-39.22	0.0558
9	Н5'1	. H1	Ε	8	7	4	1.09	109.50	60.00	0.0679
10	Н5'2	H1	Ε	8	7	4	1.09	109.50	-60.00	0.0679
11	C4'	СТ	Μ	8	7	4	1.52	110.00	180.00	0.1065
12	Н4'	Н1	E	11	8	7	1.09	109.50	-200.00	0.1174
13	04'	OS	S	11	8	7	1.46	108.86	-86.31	-0.3548
14	C1'	CT	В	13	11	8	1.42	110.04	105.60	0.1297
15	H1'	H2	Ε	14	13	11	1.09	109.50	-240.00	0.2007
16	N9	N*	S	14	13	11	1.52	109.59	-127.70	-0.0532
17	C8	CK	В	16	14	13	1.37	131.20	81.59	0.1412
18	Н8	Н5	Ε	17	16	14	1.08	120.00	0.00	0.2008
19	N7	NB	S	17	16	14	1.30	113.93	177.00	-0.5330
20	С5	CB	S	19	17	16	1.39	104.00	0.00	0.2613
21	C6	CA	В	20	19	17	1.40	132.42	180.00	0.2748
22	N6	N2	В	21	20	19	1.34	123.50	0.00	-0.7251
23	H61	Н	Ε	22	21	20	1.01	120.00	180.00	0.4282
24	H62	Н	Ε	22	21	20	1.01	120.00	0.00	0.4282
25	N1	NA	В	21	20	19	1.34	117.43	180.00	-0.2604
26	Н1	Н	Ε	25	21	20	1.00	119.46	180.00	0.3566
27	C2	CQ	В	25	21	20	1.33	118.80	0.00	0.1964
28	H2	Н5	Ε	27	25	21	1.08	120.00	180.00	0.1889
29	NЗ	NC	S	27	25	21	1.32	129.17	0.00	-0.4431
30	C4	CB	Ε	29	27	25	1.35	110.80	0.00	0.3240
31	C3'	CT	Μ	11	8	7	1.53	115.78	-329.11	0.2022
32	НЗ'	Н1	Ε	31	11	8	1.09	109.50	30.00	0.0615
33	C2'	CT	В	31	11	8	1.53	102.80	-86.30	0.0670
34	H2 ' 1	. H1	Ε	33	31	11	1.09	109.50	120.00	0.0972
35	02'	OH	S	33	31	11	1.43	109.50	240.00	-0.6139
36	НО'2	HO HO	Ε	35	33	31	0.96	107.00	180.00	0.4186
37	03'	OS	М	31	11	8	1.42	116.52	-203.47	-0.5246

IMPROPER							
C8	C4	N9	C1'				
C6	H61	N6	H62				
N7	N9	C8	Н8				
N1	NЗ	C2	H2				
С5	N1	C6	NG				
C6	C2	N1	H1				
C6	C2	N1	N6 H1				

LOOP CLOSING EXPLICIT C1' C2' C4 C5 C4 N9

DONE STOP