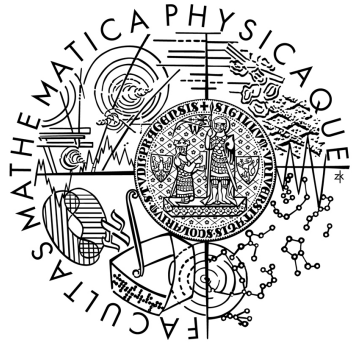
Univerzita Karlova v Praze
Matematicko-fyzikální fakulta

DIPLOMOVÁ PRÁCE



Tomáš Bartek

Molekulárně-dynamické simulace komplexů nukleových kyselin a enzymu RNase H

FÚ MFF UK

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Ivan Barvík, Ph.D.
Studijní program: Biofyzika

2009

Rád bych poděkoval vedoucímu své diplomové práce panu RNDr. Ivanu Barvíkovi, Ph.D. za pomoc, kterou mně v průběhu mé práce mnohokrát poskytnul a za velkou trpělivost a pochopení, které pro mě měl. Neméně za jeho odborné vedení, inspirativní nápady a hlubokou znalost problematiky, z nichž jsem měl možnost čerpat a učit se. Dále bych rád poděkoval ostatním pracovníkům Fyzikálního ústavu MFF UK za přátelskou atmosféru, kterou na svém pracovišti vytvářejí. Děkuji také své rodině a mamince, za podporu v mém pracovním úsilí.

Prohlašuji, že jsem svou diplomovou práci napsal samostatně a výhradně s použitm citovaných pramenů. Souhlasím se zapůjčováním práce a jejím zveřejňováním.

V Praze 17.4.2009 Tomáš Bartek

Obsah

1 Úvod **5**

1.1 Nukleové kyseliny a jejich role v přírodě . . . 5
1.1.1 Chemická struktura nukleových kyselin . . . 5
1.1.2 Popis konformací a geometrie nukleových kyselin . . . 8
1.1.3 Genová exprese . . . 10
1.1.4 Replikace DNA . . . 11
1.2 Proteiny: struktura a funkce . . . 12
1.3 RNase H enzym . . . 12
1.3.1 Enzymatická funkce RNasy H . . . 12
1.3.2 Lidská RNasa H - aktivní místo . . . 15
1.3.3 Lidská RNasa H - struktura proteinu . . . 16
1.4 Antisense technologie . . . 17

2 Metody **19**

2.1 Molekulárně dynamické simulace . . . 19
2.1.1 Metoda klasické molekulární dynamiky . . . 19
2.1.2 Numerické řešení pohybových rovnic . . . 21
2.1.3 Jednotlivé aspekty metody molekulární dynamiky . . . 24
2.2 Parametrizace empirických silových polí pro MD simulace . . . 28
2.2.1 Přehled empirických silových polí pro MD . . . 28
2.3 Softwarové balíky . . . 31
2.3.1 AMBER . . . 31
2.3.2 NAMD . . . 32
2.3.3 GAUSSIAN03 . . . 32
2.3.4 VMD, Chimera a Chemcraft . . . 32
2.3.5 Pomocné skripty . . . 32

3 Výsledky **33**

3.1 Cíle práce . . . 33
3.1.1 Biologická motivace - antisense oligonukleotidy . . . 33
3.1.2 Molekulárně-dynamické simulace komplexů enzymu RNase H a antisense oligonukleotidů . . . 34

3.1.3 Provedené MD simulace 35
3.2 Silová pole 45
3.2.1 Silová pole použitá pro fosfátové spojky 45
3.2.2 Silové pole pro modifikovanou fosfonátovou spojku 46
3.2 MD 1: 2× RNase H + $(dN.rN)_{14}$ / FF2 50
3.3 MD_2: 2× RNase H + $(dN.rN)_{14}$ / FF3 52
3.4 MD_3: 2× RNase H + $(dN.rN)_{14}$ / FF4 54
3.5 MD_4: 1× RNase H + $(dN.rN)_{14}$ / FF4 57
3.6 MD_5: 1× RNase H + $(dN.rN)_{14}$ / FF3 59
3.7 MD_6: 1× RNase H + $(dN.rN)_{14}$ / FF2 61
3.8 MD_7: 1× RNase H + $(dN.rN)_{14}$ / FF1 63
3.9 MD_8: 1× RNase H + $(dN.rN)_9$ / FF5 / 3PC5 66
3.10 MD_9: 1× RNase H + $(dN.rN)_9$ / FF5 / 3CP5 69
3.11 Závěr 72
.
Appendix A
Appendix B
Appendix C
Appendix D
Appendix E
Appendix F

Název práce: Molekulárně-dynamické simulace komplexů nukleových kyselin a enzymu RNase H
Autor: Tomáš Bartek
Katedra (ústav): FÚ
Vedoucí diplomové práce: RNDr. Ivan Barvík, Ph.D.
e-mail vedoucího: ibarvik@karlov.mff.cuni.cz
Abstrakt: Cílem této diplomové práce bylo studium interakcí lidské RNasy H s přirozeným a modifikovaným substrátem. Bylo provedeno celkem devět molekulárně-dynamických simulací. Pomocí několika verzí silového pole AMBER byly testovány konformační preference internukleotidových spojek s ohledem na intenzivní interakci cukrfosfátové páteře s enzymem. Dále pak důsledky vazby jedné/dvou jednotek enzymu RNase H k duplexu DNA:RNA. Pokud jde o interakce DNA vlákna s enzymem, jako nejdůležitější se jeví residua Trp93 a Ser101 v prvním DNA vazebném místě a Thr49, Arg47 ve druhém vazebném místě. Pro modifikovanou internukleotidovou spojku byla provedena reparametrizace silového pole pomocí ab initio výpočtů. Biologicky aktivní varianta modifikované internukleotidové spojky C3-O3-P-C-O5-C5 optimálně interagovala s residuem Arg47 (dokonce lépe než ve většina molekulárně-dynamických simulací s přirozenou internukleotidovou spojkou). Po celou dobu simulace trvající 10 ns zde existovaly dvě vodíkové vazby poutající oba nepáteřové kyslíky fosfonátové skupiny. Naproti tomu biologicky neaktivní varianta modifikované internukleotidové spojky C3-O3-P-C-O5-C5 brzy ztratila s residuem Arg47 kontakt.
Klíčová slova: molekulární dynamika, simulace, antisense, nukleové kyseliny

Title: MD simulations of complexes between nucleic acids and RNase H
Author: Tomáš Bartek
Department: FÚ MFF UK
Supervisor: RNDr. Ivan Barvík, Ph.D.
Supervisor's e-mail address: ibarvik@karlov.mff.cuni.cz
Abstract: The aim of this diploma thesis was to study interactions between human RNase H enzyme and a natural and modified substrate using molecular dynamics simulations (altogether 9 MD runs were produced). Conformational preferences of internucleotide linkages (undergoing contacts with the RNase H enzyme) were studied using several versions of the AMBER force field. Either one or two copies of RNase H were included into the simulated system. As the most important DNA-binding residues were recognized Trp93 and Ser101 in the first DNA binding site and Thr49 and Arg47 in the second DNA binding site. Further, the AMBER force field was re-parameterized slightly using ab initio calculations to produce force constants for the modified phosphonate internucleotide linkage. Biologically active version of the modified internucleotide linkage C3-O3-P-C-O5-C5 was able to bind Arg47 using two hydrogen bonds within the 10 ns MD run (even more efficiently than in the case of MD runs with natural internucleotide linkages). On the other hand, the biologically inactive C3-O3-C-P-O5-C5 internucleotide linkage lose contacts with Arg47 quickly.
Keywords: molecular dynamics, simulations, antisense, nucleic acids

Kapitola 1

Úvod

1.1 Nukleové kyseliny a jejich role v přírodě

1.1.1 Chemická struktura nukleových kyselin

Nukleové kyseliny jsou biopolymery sloužící k uchovávání, přenášení a využívání genetické informace živých organismů [1]. Tyto funkce plní nukleové kyseliny u všech známých forem života na zemi - od virů až po člověka. Chemická strukura nukleových kyselin umožňuje provádět výše zmíněné procesy velmi přesně a spolehlivě.

Nedá se rozhodně říci, že by nukleové kyseliny plnily v buňkách pouze roli pasivního nosiče dat. Postupně byla objevena celá řada dějů, ve kterých nukleová kyselina participuje (v některé ze svých podob) a ve kterých má např. katalytickou funkci. Nejznámější jsou v tomto směru tzv. ribozymy (RNA enzymy) a RNA složky ribosómů (makromolekul provádějících syntézu proteinů). I v samotném procesu exprese genetické informace mají nukleové kyseliny často aktivní roli. Existují například tzv. samo-se-sestříhávající mRNA. Ty obsahují introny (části nukleových kyselin nekódující genetickou informaci), které fungují jako ribozymy katalyzující sestřihávání vlastního řetězce. Významným jevem je také tzv. RNA interference, při níž hybridizuje mRNA s RNA nesoucí komplementární sekvenci bazí (antisense RNA). Antisense RNA tak reguluje expresi genu kódovaného mRNA.

Rozmanité funkce nukleových kyselin jsou možné díky unikátním strukturním vlastnostem těchto molekul. Primární struktura nukleových kyselin umožňuje vznik rozmanitých sekundárních struktur, které mají svoji roli v celkové struktuře terciální.

Primární struktura nukleových kyselin

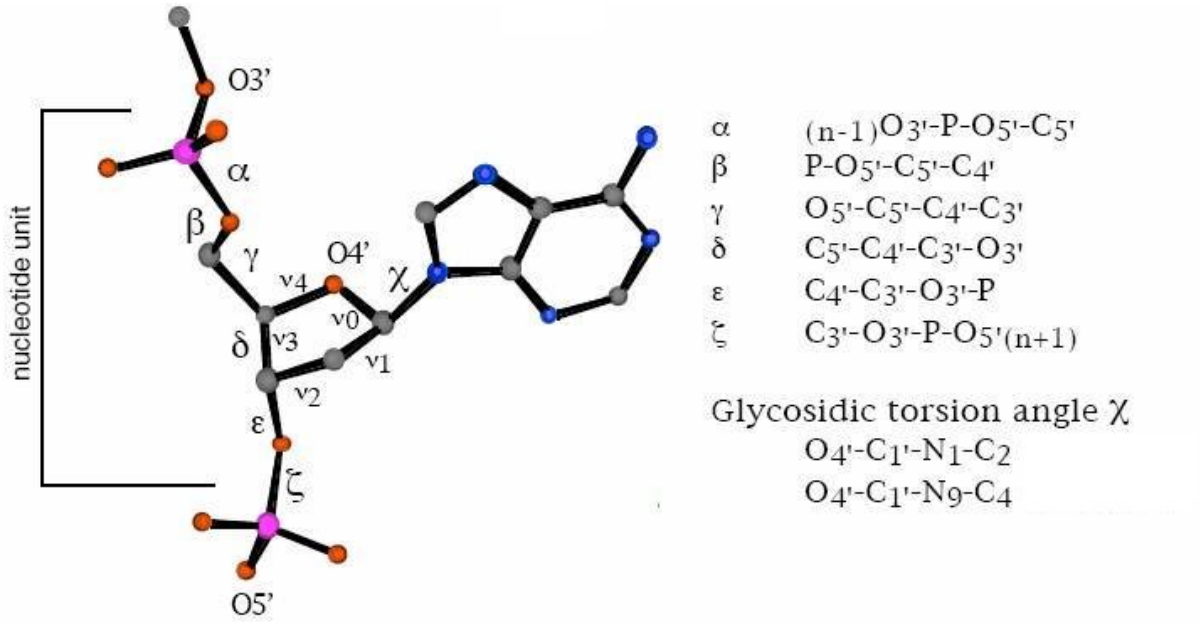
Primární strukturu nukleových kyselin tvoří lineární polymerní řetězce složené z nukleotidů. Každý monomerní nukleotid se skládá z dusíkaté heterocyklické báze, pentósového cukru a fosfátu navázaného na uhlík C5' cukru. Dva nejrozšířenější typy nukleových kyselin (DNA a RNA) se liší ve stavbě cukru a v jedné z používaných bází. DNA obsahuje 2' deoxyribosu, naproti tomu RNA obsahuje ribosu [2]. Označení a očíslování všech atomů

v nukleotidech je pevně dané.

Taktéž torzní úhly v nukleotidu mají standardní označení, jak je vidět na obrázku 1.1 [3]. Nukleotidy jsou vzájemně propojeny pomocí fosfodiesterových vazeb. Řetězec cukrů propojených fosfátovými spojkami se často označuje jako cukrfosfátová páteř nukleové kyseliny. Cukr a báze tvoří nukleosid (často se vyskytuje v biologicky významných sloučeninách jako podjednotka). Přidáním fosfátové skupiny z H_3PO_4 k nukleosidu vznikne nukleotid. Vazba báze na cukr se nazýva glykosidická vazba.

Heterocyklických dusíkatých bází je celkem pět: adenin (A), cystosine (C), guanine (G), uracil (U) a thymin (T). Můžeme je rozdělit na pyrimidinové báze odvozené od pyrimidinu, které tvoří jeden šestičlenný kruh. A na báze odvozené od purinu, které jsou tvořeny kondenzovaným pěti- a šestičlenným kruhem. Uracil vyskytující se pouze v RNA je v DNA nahrazen thyminem. Sled bází v řetězcích nukleových kyselin se nazývá sekvence.

Při syntéze vláken nukleových kyselin se v přírodě realizuje přidávání nukleotidů výhradně k 3' konci řetězce nukleové kyseliny (dle C3' uhlíku terminálního nukleotidu). Naopak zakončení vlákna nukleové kyseliny fosfátovou skupinou je obvyklé pouze na 5' konci řetězce [4]. Podle koncových skupin tak můžeme snadno rozlišovat oba dva směry podél vlákna nukleové kyseliny: 5' → 3' a 3' → 5'.



Obrázek 1.1: Nukleotid a standardní označení jeho torzních úhlů [3].

Z fyzikálních vlastností nukleových kyselin je významný záporný náboj -1 na každé z fosfátových spojek.

Sekundární a terciální struktura nukleových kyselin

Chemicko-fyzikální vlastnosti nukleových kyselin jim dovolují tvořit stabilní prostorová uspořádání: takzvanou sekundární a terciální strukturu. Sekundární strukturou je myšleno lokální uspořádání bází a cukrfosfátové páteře, které se pak kombinuje ve struktuře terciální, tedy celkovém uspořádání sekundárních strukturních motivů v prostoru.

Jednou z nejvýznamnějších sekundárních struktur je dvojitá šroubovice (double helix). Nukleové kyseliny jsou v závislosti na okolních podmínkách schopné tvořit různé typy dvojitých šroubovic, které se liší geometrickými parametry. Nejznámější jsou B-DNA, A-DNA a Z-DNA [1]. Základní rysy dvojité šroubovice zůstávají stejné. Pojí se v ní dva polymerní řetězce nukleotidů, které jsou orientované antiparalelně a jsou spletené do struktury dvojité šroubovice. Podstatné je, že báze míří směrem dovnitř dvoušroubovice a jsou spárované vzájemnými vodíkovými vazbami. Způsob párovaní je pro každou bázi pevně daný. Purinové báze se vážou na pyrimidínové a tvoří pouze dvojice A-T, G-C (v případě RNA A-U, G-C). Ostatní možné dvojice bází mezi sebou nevytvoří dostatečně silné vodíkové vazby a proto k navázání nedojde. Dvěma sekvencím bází, které výše zmíněný způsob párování umožňují říkáme komplementární. Vodíkové vazby jsou pro celkovou stabilitu dvojité šroubovice zásadní a bez dodržení komplementarity bází není dvojitá šroubovice stabilní. Právě tento mechanismus příroda využívá k uchovávání a přenášení genetické informace.

Z pohledu fyzikálních sil jsou pro stabilitu dvojité šroubovice důležité především odpudivé coulombovské interakce mezi záporně nabitými fosfátovými spojkami a přitažlivé vodíkové vazby mezi bázemi. Nejčastěji se uplatňuje takzvané Watson-Crickovo párování bazí zmíněné výše. Zde A-T páry bazí tvoří dvě vodíkové vazby a G-C páry bazí tři vodíkové vazby. Dalším faktorem je interakce mezi bázemi ležícími ve dvojité šroubovici nad sebou (tzv. stacking bazí).

V případě jiného geometrického uspořádání nukleových kyselin, například v trojité šroubovici nebo v méně pravidelných strukturách RNA, jsou možné i jiné způsoby párování bazí (například takzvané Hoogsteenovo párování bází). Vazba vláken nukleových kyselin je však v takovém případě většinou slabší.

Jednořetězcové RNA hrají celou řadu významných rolí v buněčných procesech (kupř. biologicky aktivní mRNA, tRNA, rRNA nebo snRNA). Stejně jako v DNA i v jednořetězcových RNA párují vzájemně komplementární úseky nukleotidů a dávají tak vzniknout řadě motivů z hlediska sekundární struktury. V tzv. vlásenkách (hairpins) lze rozlišovat krčky (stems), tedy úseky se spárovanými bázemi, které jsou přemostěné smyčkami (loops) sestávajícími z nespárovaných bazí [5]. Celkové prostorové uspořádání RNA, její terciální struktura, pak určuje její funkční vlastnosti. Příkladem mohou být třeba zmíněné transferové RNA (tRNA) mající jako celek tvar velkého písmene L, sestávajícího z trojlístkům podobných motivů sekundární struktury. Tyto trojlístky pak mají jako základní strukturní prvek vlásenku nebo-li krček-smyčka (stem-loop) motiv.

1.1.2 Popis konformací a geometrie nukleových kyselin

Pro kvantitativní popis struktury nukleových kyselin se používá několika parametrů, které dokážou postihnout různé typické konformace a změny mezi nimi. Případné korelace v časovém vývoji těchto parametrů mohou poskytnout lepší vhled do studovaného procesu.

Mezi nejpoužívanější strukturní parametry patří vzdálenost mezi akceptorovým a vodíkovým atomem (indikující přítomnost/absenci vodíkové vazby), torzní úhly, pseudorotační úhel u tzv. "sugar puckeringu" a RMSD (Root Mean Square Deviation).

Takzvaný puckering konformací furanózového kruhu se popisuje prostřednictvím pseudorotačního úhlu. Pseudorotační úhel určuje, který z pěti torzních úhlů ve furanosovém kruhu je v danou chvíli největší a které atomy jsou mimo rovinu cukerného kruhu [6], jak je vidět na obrázku 1.2. Jako "endo" se označuje atom, který je ve stejném poloprostoru jako báze a uhlík C5', bereme-li jako dělící rovinu procházející atomy C1', C4' a O4', viz. obrázek 1.3. V rovnici pro výpočet pseudorotačního úhlu figurují jednotlivé torzní úhly:

$$\tan P = \frac{(\nu_4 + \nu_1) - (\nu_3 + \nu_0)}{2\nu_2(\sin\frac{\pi}{5} + \sin\frac{2\pi}{5})} \tag{1.1}$$

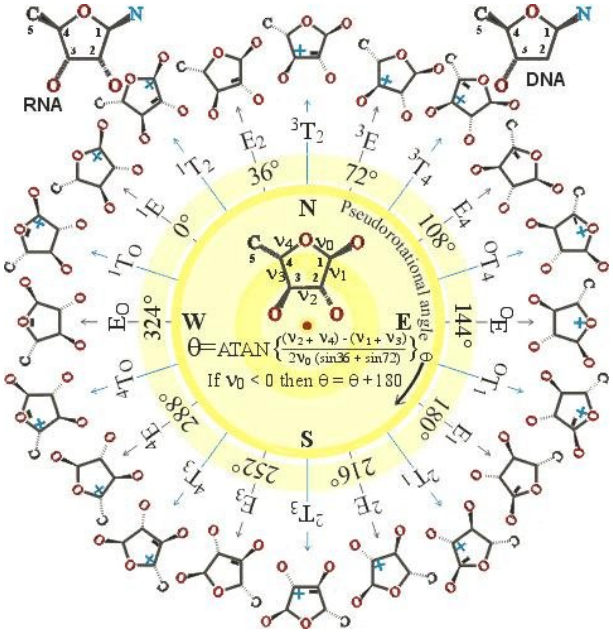
V dvojité šroubovici typu A-DNA je furanózový kruh převážne v konformaci C3'-endo, čemuž odpovídají hodnoty pseudorotačního úhlu od 0 do 18 stupňů (čistý C3'-endo). Pro B-DNA je typický puckering C2'-endo, jemuž odpovídá pseudorotační úhel od 144 do 162 stupňů (čistý C2'-endo). Z-DNA obsahuje cukry s puckeringem jak C3'-endo, tak i C2'-endo. C2'-endo konformaci se někdy říká též South (jižní, S - konformace) a C3'-endo konformaci North (severní, N - konformace).

Torzní úhly C3'-O3'-P-O5' a O3'-P-O5'-C5' ve fosfátové spojce jsou dalším důležitým parametrem pro sledování konformace nukleových kyselin. Pro jednotlivé intervaly hodnot torzních úhlů se používá označení: 0-120 stupňů *+gauche* (+g), 240-360 stupňů *-gauche* (-g) a 120-240 stupňů *trans* (t).

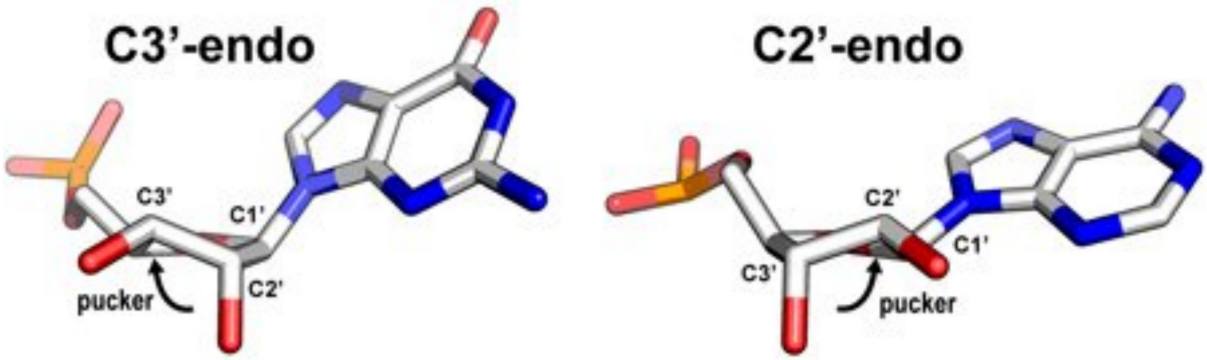
Pro popis vzájemné polohy bazí jsou k dispozici standardizované helikální parametry, dohodnuté na kongresu v Tsukubě. Jejich použití umožňuje jednoznačný popis geometrie nukleové kyseliny a čímž se předchází možným nedorozuměním a převodům z jedné sady parametrů na druhou. Helikální parametry jsou zakresleny v obrázku 1.4 [9]

Ke kvantifikaci celkové změny geometrie biomolekuly se obvykle používá hodnota RMSD (Root Mean Square Deviation). Pro vyloučení vlivu rotačního a translačního pohybu těžiště biomolekuly, se nejprve provádí tzv. RMSD fit. Tj. minimalizuje se hodnota RMSD na prostoru všech rotací a translací. Jako relevantní se pak bere hodnota RMSD oproštěná o vliv rotací a translací molekuly:

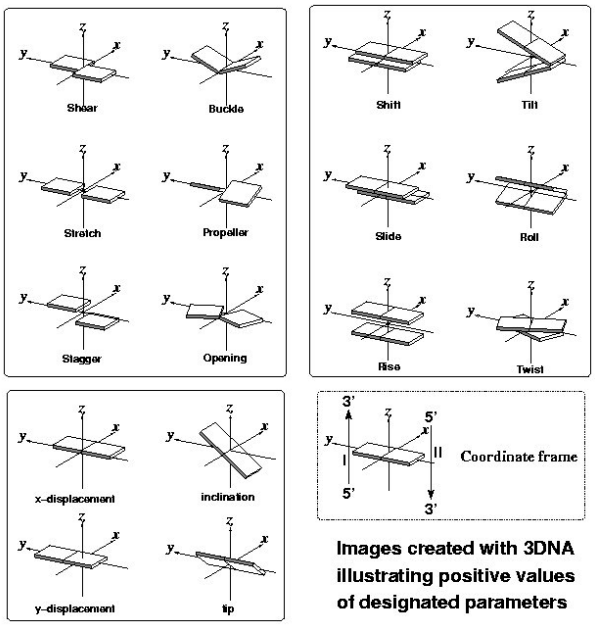
$$RMSD(\mathbf{x}_1, \mathbf{x}_2) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(x_{1,i} - x_{2,i})^2}{n}}. \tag{1.2}$$



Obrázek 1.2: Puckering a pseudorotační fázové úhly furanózového kruhu [7].



Obrázek 1.3: C2'-endo a C3'-endo konformace furanózového kruhu cukru [8].



Obrázek 1.4: Doporučovaný referenční rámec a parametry pro popis nukleových kyselin [9].

1.1.3 Genová exprese

DNA uchovává genetickou informaci, v níž je zakódována struktura proteinů. Klíčovým procesem, kterého se DNA účastní, je exprese genetické informace, jejímž výsledkem je syntéza některého z proteinů. Při přepisu genetické informace do proteinů se uplatňují dva dílčí procesy.

Nejprve se uplatňuje transkripce genetické informace. Při transkripci se na základě principu komplementarity bazí a za asistence enzymu RNA polymerázy přepisuje část DNA do jednořetězcové mRNA. Fragment genetické informace kopírovaný z DNA a kódující jednu samostatnou funkční jednotku (protein nebo RNA), se nazývá gen. V případě, že gen kóduje protein, mRNA se po určitých úpravách distribuuje k ribozómům. Na ribozómech následně dochází k procesu translace. Výše zmíněný mezikrok v expresi genetické informace (tvorba mRNA) má celou řadu důsledků. Jedním je možnost bezpečného uchovávání genetické informace v jádře. Dalším možnost regulace exprese genetické informace na úrovni mRNA.

Translace genetické informace funguje opět na principu komplementárních bazí [1]. Příroda tento proces implementuje jako zobrazení trojic bází (64 různých trojic - tak zvaných kodonů) na 20 druhů standardních aminokyselin. Těmto pevně daným pravidlům přepisu genetické informace z DNA do proteinů se říká genetický kód. Pro signalizaci začátku translace je používán startovní kodon AUG, standardně kódující methionine. Pro signalizaci ukončení translace se v sekvenci mRNA používají takzvané stop kodony: UAA,

UGA, UAG nekódující žádné aminokyseliny. Genetický kód se uplatňuje u všech genů (s výjimkou mitochondriálních) u všech organismů (výjimku tvoří například stop kodony u některých bakterií).

K provedení translace je nezbytná transferová RNA (tRNA). Tato molekula se třemi nukelotidy, takzvanými antikodony, komplementárně váže na kodon. Na svém 3' konci má tRNA kovalentně navázanou příslušnou aminokyselinu. O vznik vzájemné vazby se stará vysoce specifický enzym aminoacyl tRNA syntetáza, který používá jako substrát "nenabitou" tRNA a příslušnou aminokyselinu. Výsledkem celého procesu translace je propojení aminokyselin do nově vznikajícího polypeptidového nebo proteinového řetězce, který se již při své syntéze postupně sbaluje do výsledné terciální struktury proteinu.

1.1.4 Replikace DNA

Dalším důležitým procesem, kterého se DNA účastní, je její replikace [2]. Při replikaci DNA se genetická informace kopíruje. Tento proces probíhá v zásadě stejně u všech prokaryotických i eukaryotických organismů.

Při replikaci se dvoušroubovice DNA na specifickém místě (zvaném počátek replikace) částečně rozplete a ke každému z obou řetězců DNA se začne syntetizovat nový komplementární řetězec. Protože oba původní řetězce DNA obsahují stejnou genetickou informaci, jsou výsledné dva helixy totožné. Tento proces je v eukaryotických buňkách přísně regulovaný a děje se v průběhu takzvané S fáze životního cyklu buňky.

Při replikaci vzniká útvar zvaný replikační vidlička. Jedná se o rozplétané místo DNA s navázanými enzymy a stabilizačními proteiny. Replikační vidlička postupuje podél DNA a dochází v ní k syntéze obou nových řetězců DNA. Enzymem, majícím za úkol samotnou syntézu komplementárního řetězce DNA, je DNA polymerása. Ta pracuje pouze ve směru 5' → 3' nově syntetizovaného řetězce. Proto pro řetězec DNA, který je odkrývaný v 3' → 5' směru (syntetizovaný řetězec DNA má pak směr 5' → 3'), probíhá syntéza kontinuálně ve směru postupující replikační vidličky. Pro řetězec odkrývaný v 5' → 3' směru (syntetizovaný řetězec DNA má pak směr 3' → 5') probíhá syntéza proti směru odkrývání a pohybu vidličky. Tvoří se tak menší úseky dvojité šroubovice DNA, takzvané Okazakiho fragmenty, které jsou následně spojovány DNA ligázou. Protože syntéza ve směru proti pohybu replikační vidličky má určité zpoždění, nazývá se templátový řetězec takto syntetizované DNA zpožďující se řetězec (lagging strand). Naproti tomu templát kontinuálně syntetizované dvojité šroubovice DNA se nazývá vedoucí řetězec (leading strand).

Při replikaci vedoucího řetězce DNA stačí DNA polymeráze 3'OH skupina jednoho jediného RNA primeru. Tj. malé molekuly RNA, která se na začátku replikace naváže na vedoucí řetězec DNA. V případě replikace opožďujícího se vlákna DNA je však nový RNA primer nezbytný pro každý Okazakiho fragment. O tvorbu RNA primerů a v konečném důsledku RNA/DNA hybridních duplexů sloužících jako startovní místo pro DNA polymerázu se stará enzym primása. Po dosyntetizování DNA řetězce jsou pak RNA části těchto hybridních úseků degradovány a doplněny na DNA/DNA dvoušroubovice. Posledním krokem replikace DNA je pak spojení sousedících úseků DNA kovalentní vazbou

pomocí enzymu ligása.

O degradaci původního primeru, RNA řetězce z hybridního duplexu RNA/DNA, se stará enzym RNase H [10]. Tento enzym existuje u všech žijících organismů od virů až po člověka.

1.2 Proteiny: struktura a funkce

Proteiny jsou vedle nukleových kyselin a polysacharidů hlavními biologickými makromolekulami. Jako enzymy se podílejí na katalýze téměř všech procesů v živých organismech. Jako stavební bílkoviny tvoří základ cytoskeletu (myosin, aktin). Kromě toho jsou zodpovědné i za velké množství dalších speciálních funkcí.

Primární strukturu proteinů tvoří lineární polymery sestávající z dvaceti druhů aminokyselin, které jsou navzájem spojené amidovými (peptidovými) vazbami. Peptidový řetězec má svůj N- a C-konec. Sekvence aminokyselin se uvádí v orientaci od N- k C-konci. Existují peptidy složené z 40 ale i 10 000 aminokyselin, přičemž průměrná hmotnost aminokyselinového zbytku je asi 110Da [11].

Ze dvou existujících enantiomerů aminokyselin jsou v přírodě užívané pouze L-enantiomery. Pro toto omezení však neexistuje žádný fyzikálně-chemický důvod a v umělých proteinech lze kombinovat jak L- tak D-formu aminokyselin [12].

Aminokyseliny lze podle vlastností jejich postranních řetězců dělit do skupin: aromatické, hydrofobní, alifatické, polární, positivní a negativní. Tato různorodost zajišťuje rozdílné vlastnosti proteinů a jejich částí.

V případě sekundární struktury proteinů rozeznáváme několik motivů: α helix, β skládaný list, 3_{10}-helix a další méně časté struktury jako jsou π-helix, kolagenový helix nebo poly-L-prolinový helix.

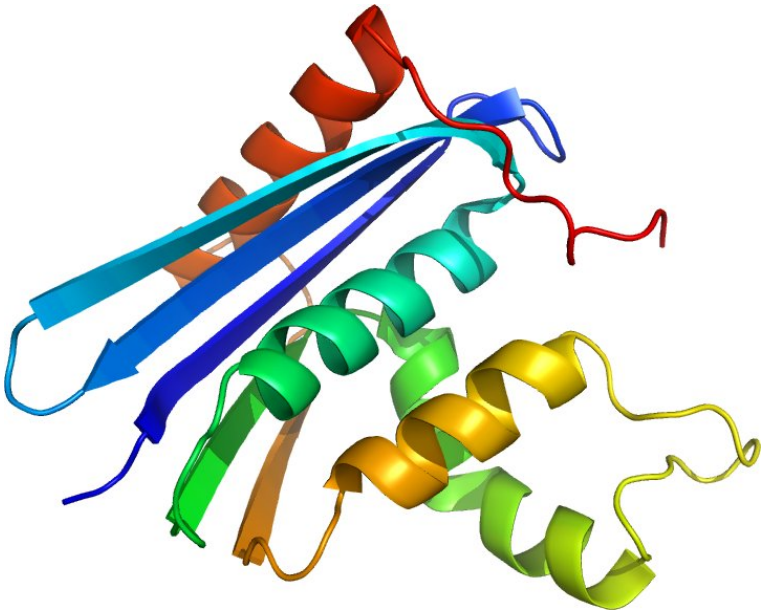
Části proteinů s definovanou sekundární strukturou se v proteinech kombinují do složitějších motivů. Ty se mohou, ale také nemusejí vázat ke konkrétní funkci. Příkladem jsou například motivy helix-turn-helix nebo tzv. EF ruka. Mezi složitější uspořádání patří β-α-β motiv nebo tzv. řecký klíč.

Z hlediska terciální struktury proteinu je základní jednotkou takzvaná doména. Ta je definována jako část polypeptidového řetězce, která je schopna samostatného sbalení do stabilní struktury. V konkrétním proteinu má každá doména většinou specifickou funkci.

1.3 RNase H enzym

1.3.1 Enzymatická funkce RNasy H

RNasa H (EC 3.1.26.4) je enzym (obrázek 1.5), který patří do širší skupiny ribonukleas - enzymů štěpících RNA na menší fragmenty. Organismy obsahují mnoho různých druhů RNas, což potvrzuje, že odbourávání RNA je velmi důležitý a také evolučně starý proces.

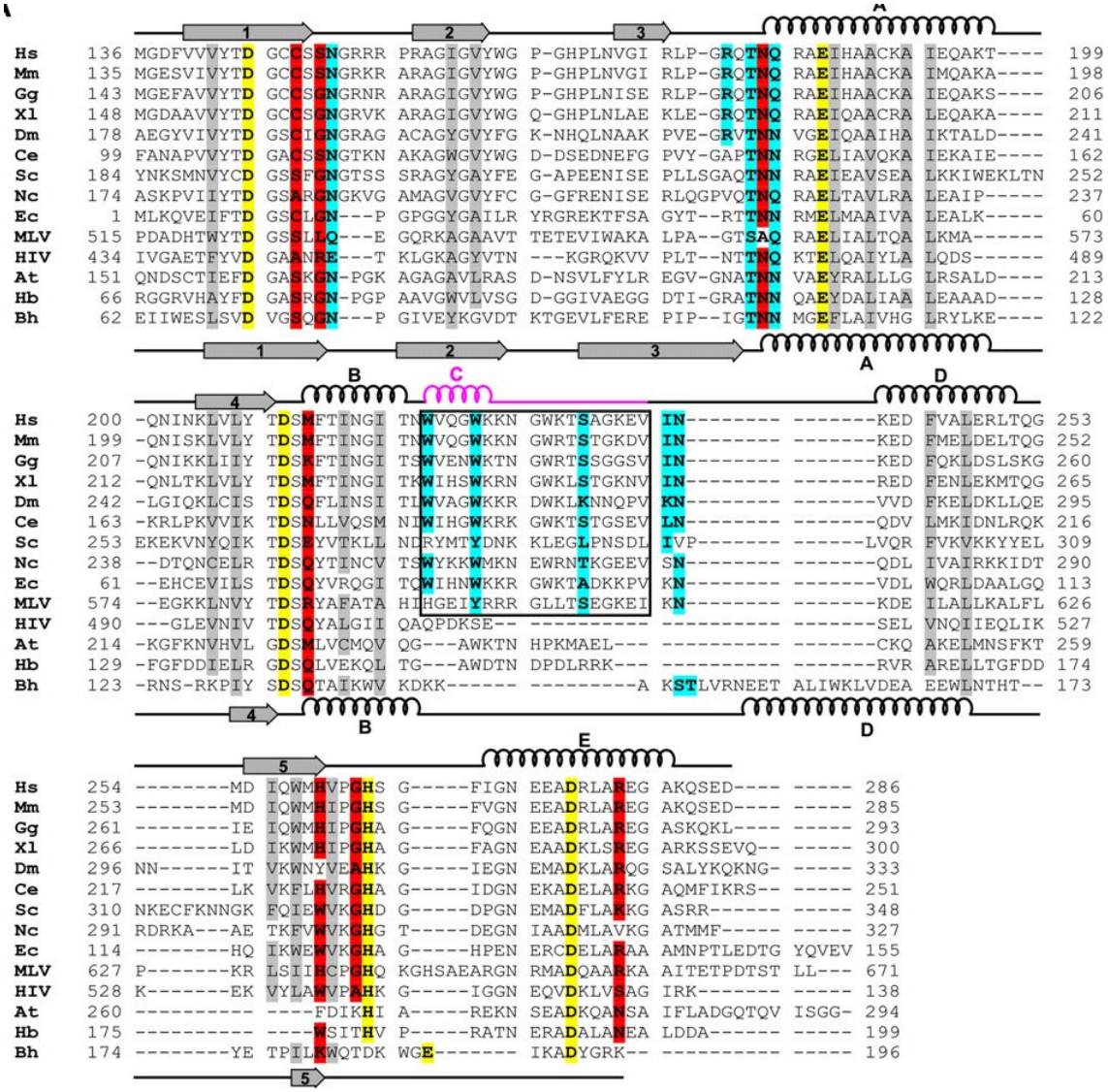


Obrázek 1.5: Prostorové uspořádání enzymu RNase H [13].

Jako RNasy H se označují endonukleásy, které specificky hydrolyzují RNA řetězec hybridního duplexu RNA/DNA. V minulosti byly identifikovány dva typy tohoto enzymu označované jako RNase H1 a RNase H2. Vzájemně se liší preferencemi pokud jde o substrát a konfigurací v aktivním místě enzymu [14]. Sdílejí však v mnoha ohledech podobné sbalení hlavního řetězce.

Hydrolýza RNA řetězce probíhá na vazbě C3'-O3'-P-O5' za vzniku 3' -hydroxylové a 5 -fosfátové koncové skupiny. Enzymatická aktivita je podmíněna přítomností divalentních metalových iontů jako jsou Mg^{2+} nebo Mn^{2+}. Aktivita enzymu je přitom výrazně vyšší za přítomnosti Mg^{2+} iontů. V aktivních místech RNas H je obvykle přítomný tzv. DDED motiv [15].

RNasa H2 se vyskytuje pouze v jádře, kdežto RNasa H1 je přítomna v celé cytoplasmě buňky. Proto se může účastnit degradace mRNA řetězců v rámci takzvané antisense terapie. V rámci ní je do buňky vpraven krátký fragment DNA komplementární k některé mRNA. Hybridizací s cílovou mRNA je možné dosáhnout selektivní inhibice exprese genetické informace. Následná degradace hybridního helixu DNA:RNA RNasou H zvyšuje účinnost antisense terapie. RNasy H1 jsou přítomé u velmi široké skupiny organismů. Vyskytují se mezi viry, bakteriemi a také u vyšších organismů jako jsou myši nebo i člověk. Svou katalytickou aktivitou zřejmě přispívají i k dalším buněčným procesům v závislsti



Obrázek 1.6: Sekvenční alignment RNas H z různých organismů. Žlutě jsou zvýrazněny vysoce konzervovaná residua v aktivním místě, tzv. DEDD motiv. Červeně residua účastnící se vazby na DNA, bledě modře vazby na RNA. Šedě podbarvená residua tvoří hydrofobní jádro enzymu. Boxem orámované partie tvoří tzv. "Basic protrusion" - klastr basických residuí [15].

na typu organismu. U lidí RNasa H s největší pravděpodobností odstraňuje RNA primery z Ozkazakiho fragmentů který tuto aktivitu vykazuje. Dále se RNasa H účastní modulace iniciace replikace prostřednictvím zpracovávání tzv. R-smyček a obnovováním topologie DNA . Naproti tomu u retrovirů je RNasa H samostatnou doménou enzymu reversní transkriptázy (RT) [16], [17], [18]. To činí z RNase H domény HIV RT enzymu důležitý terč inhibitorů. Je však nezbytné zajistit specificitu inhibitorů vůči HIV RNase H. Tj. je třeba se vyhnout inhibici lidské RNasy H. Studie ukazují , že delece RNasy H u jednobuněčných živočichů pouze zpomalují jejich množení, kdežto myš s knokautovanou RNasou H zemřela už při embryogenezi v důsledku selhání replikace mitochondriální DNA. To vede k domněnce, že inhibice RNasy H u lidí by měla rovněž fatální následky.

Terciální struktura RNasy H je typická pro enzymy fosfát transerázové superrodiny. Fold RNasy H byl poprvé rozpoznán u E. coli RNase H v roce 1990. Ukázalo se, že podobný fold sdílí celá řada dalších enzymů účastnících se zpracování nukleových kyselin. Jedná se o transposasy, integrasy, Holliday junction enzymy a enzymy Argonaute v RISC komplexu. Postupně se podařilo rozřešit X-ray struktury řady dalších RNas H. Ať už jako samostatných enzymů nebo domén (RNase H doména HIV reverzní transkriptázy). V posledních letech se podařilo vykrystalizovat a určit i komplexy RNasy H a substrátu - hybridního duplexu DNA:RNA, například katalytické domény RNasy H bakterie Bacillus Halodurans [19].

1.3.2 Lidská RNasa H - aktivní místo

Aktivní místo lidské RNasy H tvoří čtyři aminokyselinové postranní řetězce: D132, D71, E109 a D192 [14]. Všechny tyto aminokyseliny se podílejí na štěpení vazby C3'-O-P-O5'. Napomáhají jim v tom dva divalentní ionty a atakující molekula vody. Experimentálně zjištěné aktivity enzymu RNasy H v roztocích iontů Mg, Mn a Ca ukazují silnou specificitu ve prospěch iontů Mg.

Přibližná geometrická konfigurace aktivního místa je známa již delší dobu. Ionty se do aktivního místa vážou na relativně přesně dané pozice ve vzájemné vzdálenosti asi 4A tak, že jsou spolu se dvěma karboxylovými kyslíky residua D71 v jedné rovině. Označení iontu blíže D192 a E188 je A, označení iontu bližšího D132 a E109 je B. Residuum D71 se váže jedním kyslíkem na každý iont. Vzdálenost mezi oběma ionty je zhruba půlena spojnicí D171 a fosfátu štěpené vazby. V této konfiguraci ionty tvoří koordinační vazby se zmíněnými aminokyselinami aktivního místa, s kyslíky na štěpené fosfátové spojce a s molekulou vody, která se na štěpení podílí - jedná se o hydrolýzu.

Koordinační geometrie iontů Mg umožňuje takzvaný "two-metal-ion" katalytický mechanismus [15]. Ve výše popsané konfiguraci pak A iont koordinuje molekulu vody, která je natočena tak, že může atakovat fosfát Sn2 mechanismem. Iont B je pak zodpovědný za stabilizaci transitního stavu a aktivní místo opouštějícího fragmentu RNA. Předpokládá se, že dle podobného mechanismu probíhá katalýza u dalších enzymů - všech DNA a RNA polymerás a velkého množství nukleás.

Uvedený mechanismus však nebyl v úplném souladu s některými biochemickými ex-

perimenty, a proto bylo přistoupeno k dalším difrakčním experimentům. Ty umožnily zachytit enzym v komplexu s meziprodukty a produkty reakce [14]. Z vypozorovaného pohybu iontů v průběhu reakce se předpokládá, že iont A svým pohybem k iontu B asistuje nukleofilnímu ataku tím, že nukleofilní hydroxidový iont (vzniklý z atakující molekuly vody) přibližuje ke štípané fosfátové skupině. Za druhé, iont B přechází z nepravidelné koordinace v komplexu se substrátem do více pravidelné koordinace v komplexu s produktem. Vysoká citlivost Mg iontu na koordinační okolí pravděpodobně destabilizuje enzym substrátový komplex a snižuje tak energetickou bariéru pro tvorbu produktu. Jako poslední byl učiněn předpoklad o pravděpodobném uvolnění iontu A z aktivního centra jako nutné podmínky pro uvolnění produktu. Toto pak může být inhibováno buď vysokou koncentrací divalentních iontů v roztoku, nebo mutací asistující aminokyseliny v aktivním centru [14].

1.3.3 Lidská RNasa H - struktura proteinu

Struktura lidské varianty RNasy H (dále jen RNasa), je vysoce sekvenčně podobná (homologní) s dalšími RNasami a nukleotid transferázami. Spolu se všemi eukaryotickými RNasami obsahuje menší vazebnou doménu pojmenovanou HBD (Hybride Binding Domain) o přibližně 55 aminokyselinách. Ta je spojena flexibilní spojkou (o asi 60 residuech) s katalytickou doménou enzymu (Hs RNAse H cd, cca. 150 residuí) na C-konci proteinového řetězce. Struktura vazebné [20] a katalytické domény [15] byly rozřešeny pomocí rentgenové difrakce. Struktura flexibilní spojovací části zatím není známa.

Katalytická doména Hs RNasy H má terciální fold typický pro tento typ enzymů s několika specifickými detaily. Jednak to jsou dvě flexibilní a strukturně nepříliš dobře určené smyčky na povrchu enzymu. Dále je to přítomnost klastru basických residuí (takzvaného "Basic Protrusion") v místě mezi alfa helixy B a D. Porovnání sekvencí s dalšímy RNasami ukazuje velkou rozmanitost této oblasti, která hraje důležitou roli ve vazbě na nukleovou kyselinu. Zajímavé je, že obdobná pasáž se např. u RNasové domény HIV reversní transkriptasy nenachází [16]. Proto je příslušná oblast velmi zajímavá z hlediska vývoje nových léčiv selektivně inhibujících pouze HIV RT.

Jelikož se postupem času podařilo vykrystalizovat vazebnou a katalytickou doménu lidské RNasy H (dokonce i se substrátem), máme poměrně detailní informace o navázání nukleové kyseliny na enzym [15]. Katalytická doména na svém povrchu vytváří žlábek (tzv. Phosphate binding channel), kterým váže DNA řetězec hybridního duplexu DNA:RNA. V něm hrají důležitou roli residua Trp89 a Ser101 v jedné jeho části. Na druhém konci pak žlábek končí v místě označovaném jako "Phosphate binding pocket", ve kterém se navázaná dvoušroubovice nukleové kyseliny stáčí a jednou ze svých fosfátových skupin je do něj zaklesnuta. RNA řetězec je pak navázán k enzymu pomocí 2'-OH hydroxylových skupin a kopíruje jeho povrch v poněkud mělčí prohlubni končící v aktivním místě. Některé aminoskupiny se váží také k bazím nukleové kyseliny.

RNasa H se váže na dvoušroubovice RNA:RNA a DNA:RNA. Vazba na hybridní duplex DNA:RNA je preferována. Důvodem je nejspíše geometrie fosfát vážící kapsy

(Phospahate binding pocket), do které druhý RNA řetězec optimálně nezapadne. Další možností je ne zcela optimální navázání na pozitivně nabitá residua z oblasti klastru basických residuí.

1.4 Antisense technologie

Tzv. antisense strategie při tvorbě léků využívá interakci mRNA s komplementárními sekvencemi do buňky dodaných krátkých oligonukleotidů. Antisense oligonukleotidy zabraňují přepisu genetické informace z mRNA do podoby proteinu. Jako první tuto metodu navrhl Zamecnik a Stephenson [21] v roce 1978 v souvislosti s inhibicí virové RNA. Možné použití je však značně širší. Antisense oligonukleotidy v podstatě umožňují regulaci genů na úrovni mRNA. V poslední době je zkoumáno například uplatnění antisense oligonukleotidů při léčbě rakoviny (regulace exprese onkogenů).

Podle konkrétního mechanismu účinku dělíme antisense technologie do tří skupin. První z nich využívá antisense deoxyoligonukleotidy, které po hybridizaci s cílovou mRNA vyvolávají její degradaci RNasou H. V tomto případě je antisense deoxyoligonukleotid znovu použitelný pro další cílovou mRNA. Antisense oligonukleotidy mohou mít učinek i v případě, že aktivitu RNasy H nevyvolávají. A to v důsledku prostého stérického bránění ribozomům v pohybu podél vlákna mRNA.

Druhou skupinu antisense strategií tvoří využití ribozymů nebo DNA enzymů přímo degradujících cilovou mRNA [22].

Třetí možností je použití krátkých molekul RNA (tzv. small interfering RNA, siRNA) aktivujících buněčný RISC komplex, což v konečném důsledku vede opět k degradaci cílové mRNA molekuly [23].

Antisense oligonukleotidy (ASO) jako léčebné látky jsou velmi slibné zejména svojí vysokou specificitou, širokým použitím a relativně nenáročným vývojem. Existuje však řada problémů, které je potřeba pro uspěšný vývoj ASO léčiva překonat. Kromě problému při transportu přes buněčnou membránu [24]) je to hlavně stabilita ASO v buněčném prostředí, kde je vystaven působení buněčných nukleáz a podléhá velmi rychle degradaci. Z těchto důvodu bylo vyvinuto velké množství chemických modifikací přirozených oligonukleotidů, za účelem zlepšení jejich vlastností při použití v antisense terapii.

Prní generací modifikovaných ASO, jejímž představitelem je i zatím jediný schválený ASO preparát Vitraven, jsou fosforothioátové oligonukleotidy. V nich je jeden z nevazebných kyslíků fosfátové spojky nahrazen atomem síry. Přes některé pozitivní výsledky je přetrvávajícím problémem toxicita v důsledku interakce s některými buněčnými proteiny. Druhou generaci ASO tvoří oligonukleotidy s alkylovou modifikací na uhlíku C2'. Třetí generaci ASO tvoří velké množství různorodých analog nukleových kyselin s modifikacemi fosfátových spojek nebo ribóz. Někdy je dokonce celý furanósový kruh nahrazen jinou chemickou skupinou.

Mezi analoga nukleových kyselin, řadící se k slibným látkám z hlediska použití v antisense strategiích, patří i fosfonátová analoga s isopolární modifikací fosfodiesterové

spojky, syntetizovaná v Ústavu organické chemie a biochemie Akademie věd České Republiky (UOCHB AV ČR). Vlastnosti těchto fosfonátových analog nukleových kyselin byly zkoumány pomocí metody molekulární dynamiky v diplomové práci Diany Pavlové [24], na níž svojí diplomovou prací navazuji. Díky relativně nově rozřešené krystalové struktuře komplexu lidské RNasy H s hybridním duplexem DNA:RNA [15], která v dřívějších molekulárně-dynamických simulacích ještě nemohla být využita, jsem mohl vycházet z lepšího startovního modelu. Na základě kvantově chemických výpočtů jsem také reparametrizoval silové pole pro modifkovanou fosfonátovou spojku tak, aby bylo možné postihnout jemné rozdíly v interakci biologicky aktvivní/neaktivní varianty fosfonátové spojky s enzymem.

Kapitola 2

Metody

2.1 Molekulárně dynamické simulace

2.1.1 Metoda klasické molekulární dynamiky

Metoda klasické molekulární dynamiky (MD) je simulační metoda založená na numerické integraci klasických pohybových rovnic systému částic. Interakční potenciál uvažujeme nejčastěji jako spojitou funkci $U(\mathbf{r_1}, \mathbf{r_2}, ..., \mathbf{r_N})$ závisející obecně na polohách všech částic systému a případně i na vnějším poli. Při vyšetřování dynamiky systému mnoha částic jsme odkázáni na numerické metody řešení obyčejných diferenciálních rovnic. Pohybové rovnice totiž nemají obecné analytické řešení a systém vykazuje chaotické chování.

Tvar pohybových rovnic vyplývá ze zákonů klasické mechaniky, zapsaných pomocí Hamiltonova, Liouvilleova [25] nebo Newtonova formalismu. Při simulacích biomakromolekul se nejčastěji používá právě Newtonův formalismus. V něm je síla působící na částici i dána vztahem:

$$F_i = -\frac{\partial U(\mathbf{r_1}, \mathbf{r_2}, ..., \mathbf{r_N})}{\partial \mathbf{r_i}}, \quad i = 1, ..., N \tag{2.1}$$

Časový vývoj systému částic je pak popsán soustavou 3N obyčejných diferenciálních rovnic druhého řádu:

$$\ddot{\mathbf{r}}_\mathbf{i} = \frac{F_i}{m_i}, \quad i = 1, ..., N \tag{2.2}$$

Nalezené řešení (funkce $\mathrm{r}_i,\ i = 1, ..., N$) se nazývá trajektorie systému. Ve své podstatě se jedná o problém řešení obyčejných diferenciálních rovnic s počáteční podmínkou. Třída vhodných numerických algoritmů (integrátorů) je omezena povahou problému, především velkou časovou náročností výpočtu vzájemného silového působení [25]. Tím se v praxi výběr integrátoru zužuje na variace Verletova nebo Gearova algorit [26].

Diferenční rovnice rychlostního Verleta algoritmu vypadají takto:

$$\vec{r}(t + \Delta t) = \vec{v}(t) + \vec{v}(t)\Delta t + \frac{1}{2}\vec{a}(t)(\Delta t)^2$$

$$\vec{v}(t+\Delta t) = \vec{v}(t) + \frac{1}{2}(\vec{a}(t) + \vec{a}(t+\Delta t))\Delta t$$

Jako počáteční podmínky se zadávají souřadnice a rychlosti všech částic systému. V případě molekulárně dynamických simulací biomolekul se počáteční souřadnice atomů čerpají z tzv. proteinové databanky, kam jsou ukládány výsledky rentgenových difrakčních experimentů (v současné době je zde k dispozici téměř 60.000 struktur). Počáteční rychlosti atomů se vzorkují z Maxwell-Boltzmanova rozdělení. Velký nárůst rozřešených rentgenových struktur proteinů v posledních deseti letech umožnil široké uplatnění metody molekulární dynamiky jako nástroje pro vyšetřování vlastností biomolekul.

Zásadní význam v kontextu metody molekulární dynamiky má tzv. ergodická hypotéza. Tedy tvrzení, že se časová střední hodnota statistické veličiny v limitě shoduje se střední hodnotou statistické veličiny počítanou přes konfigurační prostor systému. Matematickou teorií ergodické hypotézy a podmínkami její platnosti se zabývá ergodická teorie (např. [27]), motivovaná zprvu hlavně statistickou fyzikou a chováním dynamických systému z hlediska jejich časového vývoje na dlouhých časových škálách [27]. Za předpokladu platnosti ergodické hypotézy můžeme časové střední hodnoty veličin spočítané z dostatečně dlouhé molekulárně-dynamické trajektorie použít pro výpočet termodynamických veličin pomocí standardních metod statistické fyziky.

Pro simulace biologických makromolekul mají význam i samotná strukturní data získaná z trajektorie jako funkce času (vzdálenosti mezi atomy, torzní úhly atd.). Ty mohou vypovídat o strukturně funkčních vlastnostech například enzymů.

Obecně se metoda molekulární dynamiky používá pro simulace rozmanitých systémů od atomů až po planety či galaxie. Alternativu představuje například metoda Monte Carlo. Volba konktrétní simulační metody pak závisí na povaze simulovaného systému a otázkách, které chceme simulací zodpovědět. Zajímáme-li se o vývoj simulovaného systému v čase, bývá podstatně jednodušší problém formulovat jako molekulárně-dynamickou simulaci. Na druhou stranu metoda Monte Carlo má také řadu výhod. Například jednodušší implementaci simulace v NVT souboru atd. [26]. Dalším problematickým momentem metody molekulární dynamiky je časová škála, kterou je možné takto postihnout. Ta je limitovaná vlastnostmi fyzikálního systému, zvoleným integrátorem, respektive chybou numerické metody a dostupnými výpočetními prostředky. Při molekulárně-dynamických simulacích biomakromolekul jsou dnes běžně získávány trajektorie o délce několika nanosekund. Při použití extrémně výkonné výpočetní techniky jsou dosažitoelné řádově mikrosekundy fyzikálního času. I to je pro některé molekulární jevy nedostatečné (např. pro protein folding sbalování proteinového řetězce do nativní konformace apod.) I když se v této oblasti dosahuje pokroků nejrůznějšími prostředky třeba pomocí superpočítačů s procesory navrženými speciálně pro molekulárně-dynamické simulace molekul [28], či užitím vícekrokových algoritmů [29]), problém v principu přetrvává.

Výše uvedené pohybové rovnice se často modifikují (například při simulacích v statistických soubornech NVT, NPT). V případě tzv. Langevinovy dynamiky se fyzikální systém modeluje pomocí rovnic, ve kterých jsou obsaženy i stochastické členy:

$$m\ddot{r} = -\nabla U(r) - \gamma m\dot{r} + \sqrt{2\gamma k_B T m}R(t) \ ,$$

kde m je hmotnost, $U(\mathbf{r})$ interakční potenciál, γ tlumící konstanta, k_B Boltzmanova konstanta, T teplota a $R(t)$ delta korelovaný stacionární Gaussovský proces se středováním na nulu:

$$\langle R(t) \rangle = 0$$
$$\langle R(t)R(t') \rangle = \delta(t - t')$$

Vždy je potřeba dosadit do pohybových rovnic vhodný tvar interakčního potenciálu. Ve většině případů se používá předem parametrizovaný analytický tvar potenciálu. Existují ale i přístupy, kdy se potenciál počítá za běhu simulace pomocí kvantové mechaniky. Další možností je, že se v průběhu simulace potenciál na zvolený analytický tvar fituje [25], případně se alespoň modifikuje (tzv. collective variables v softwarovém balíku NAMD).

Analytický tvar interakčního potenciálu (tzv. silové pole) je možné modelovat různými způsoby. Molekula je modelována jako systém kuliček spojených pružinami s různou tuhostí v závislosti na typu atomu. Cílem vždy je, aby se simulované výsledky přibližovaly experimentálním výsledkům popř. datům získaným prostřednictvím kvantově chemických výpočtů. Na správné parametrizaci analytických funkcí do značné míry závisí kvalita simulace.

Největší množství molekulárně dynamických simulací biologických systému bylo provedeno s použitím silových polí druhé generace (vyvinutých v 80. a 90. letech 20. století). Ty mají obecný tvar dvoučásticového potenciálu jak pro nevazebné interakce (Coulombické a VdW) tak pro popis vazeb mezi atomy prostřednictvím harmonických oscilátorů. Vazebné interakce jsou popsány několika členy postihujícími změny energie při deformaci vazeb, úhlů mezi vazbami a při rotaci skupin atomů kolem torzních úhlů. Jako ilustrační příklad je zde uvedena analytická formulka používaná v případě silového pole AMBER ff94:

$$\begin{aligned} E_{\text{total}} = & \sum_{\text{bonds}} K_r(r - r_{eq})^2 \\ & + \sum_{\text{angles}} K_\theta(\theta - \theta_{eq})^2 \\ & + \sum_{\text{dihedrals}} \frac{V_n}{2}[1 + \cos(n\phi - \gamma)] \\ & + \sum_{i<j} \left[\frac{A_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{R_{ij}^{6}} + \frac{q_i q_j}{\epsilon R_{ij}} \right] \end{aligned} \tag{2.3}$$

2.1.2 Numerické řešení pohybových rovnic

Tento oddíl shrnuje základní numerické algoritmy používané v molekulárně dynamických simulacích, jejich hlavní možnosti a omezení.

Základním (a poměrně intuitivním) přístupem je použití takzvané metody konečných diferencí (finite difference method - FDM). Diferenciální rovnice se aproximují pomocí diferenčních rovnic. Řešení je hledáno v diskrétním tvaru, postupným dopočítáváním nových

hodnot. Hlavním představitelem aplikace metody konečných diferencí v oblasti molekulární dynamiky je Verletova metoda [30]. Do oblasti molekulární dynamiky ji v roce 1967 zavedl Loup Verlet. V jiném kontextu se používala již dříve [31]. Přes svoji jednoduchost vykazuje Verletova metoda relativně dobrou numerickou stabilitu (nárůst chyby v průběhu výpočtu) a často dostačující přesnost trajektorie. Především ve srovnání s Eulerovou integrací diferenciálních rovnic vykazuje Verletův algoritmus mnohem lepší vlastnosti. Existuje několi variant základního Verletova algoritmu. Především to jsou tzv. rychlostní Verletův algoritmus a pak metoda žabího skoku (Leap Frog). Všechny varianty Verletova algoritmu jsou navzájem ekvivalentní, ve smyslu shodnosti vypočtené trajektorie. Rychlosti se však, pokud jsou vůbec počítány, mohou lišit.

Další třídou algoritmů pro numerické řešení obyčejných diferenciálních rovnic jsou metody typu prediktor-korektor. Ty do oblasti molekulární dynamiky zavedl Gear. Proto se v této souvislosti nazývají Gearovy integrátory. Jedná se opět o aplikaci metody konečných diferencí, avšak v porovnání s Verletovým algoritmem pracují s mírně komplikovanějším schématem výpočtu. To vede k přesnějšímu výpočtu trajektorie a jinému chování pokud jde o numerickou stabilitu.

Výše zmíněné dvě třídy algoritmů jsou nejpoužívanějšími integrátory pohybových rovnic v klasické molekulové dynamice. Může za to především fakt velké časové náročnosti výpočtu sil (až 95% výpočetního času) v rovnicích molekulární dynamiky. To diskriminuje metody provádějící výpočet sil více než jednou v daném časovém kroku. Jedná se například o metody Rungeho-Kutty, jinak velmi používanou třídu metod pro řešení obyčejných diferenciálních rovnic [32].

V praxi je používána celá řada postupů a aproximací, které se do numerických algoritmů včleňují a mají za úkol výpočet zrychlit. Rutinně používanou je například metoda molekulární dynamiky s tuhými vazbami. Některé z pohybů jsou při ní fixovány. Metoda vícenásobných kroků započítává některé málo se měnící interakce pouze jednou za určitý počet časových kroků atd.

Odvození Verletova algoritmu:

Newtonovy rovnice jsou časově reversibilní. Pokud v nich obrátíme znaménko času a jako počáteční čas bereme čas $t + \Delta t$, dostaneme po evoluci do času t stejnou trajektorii. Souřadnice v následujícím a předcházejícím časovém kroku je možné rozepsat pomocí Taylorovy řady:

$$\vec{x}(t + \Delta t) = \vec{x}(t) + \vec{v}(t)\Delta t + \frac{\vec{a}(t)\Delta t^2}{2} + \frac{\vec{b}(t)\Delta t^3}{6} + O(\Delta t^4) \tag{2.4}$$

$$\vec{x}(t - \Delta t) = \vec{x}(t) - \vec{v}(t)\Delta t + \frac{\vec{a}(t)\Delta t^2}{2} - \frac{\vec{b}(t)\Delta t^3}{6} + O(\Delta t^4) \tag{2.5}$$

Po sečtení obou rovnic získáme základní verzi Verletova algoritmu:

$$\vec{x}(t + \Delta t) = 2\vec{x}(t) - \vec{x}(t - \Delta t) + \vec{a}(t)\Delta t^2 + O(\Delta t^4) \tag{2.6}$$

Jak je vidět, základní varianta Verletova algoritmu nepracuje s rychlostmi. Pokud je v simulaci potřebujeme, je možné je dopočítat ze vztahu:

$$\vec{v}(t) = \frac{\vec{x}(t+\Delta t) - \vec{x}(t-\Delta t)}{2\Delta t} + O(\Delta t^2) \tag{2.7}$$

Takto však dostáváme rychlosti se zpožděním jednoho časového kroku za polohami částic. Za cenu ztráty přesnosti můžeme spočítat také aktuální rychlost ze vztahu:

$$\vec{v}(t+\Delta t) = \frac{\vec{x}(t+\Delta t) - \vec{x}(t)}{\Delta t} + O(\Delta t) \tag{2.8}$$

Velmi podobně se odvozují i další varianty Verletova algoritmu. Alternativou pro zahrnutí rychlostí je metoda rychlostního Verletova algoritmu:

$$\vec{x}(t+\Delta t) = \vec{x}(t) + \vec{v}(t)\,\Delta t + \frac{1}{2}\vec{a}(t)(\Delta t)^2 \tag{2.9}$$

$$\vec{v}(t+\Delta t) = \vec{v}(t) + \frac{\vec{a}(t) + \vec{a}(t+\Delta t)}{2}\Delta t \tag{2.10}$$

Příkladem metody, která počítá souřadnice a rychlosti ve vzájemně posunutých časech, je tzv. Leap frog varianta Verletova algoritmu:

$$\vec{r}(t+\Delta t) = \vec{r}(t) + \Delta t\vec{v}\left(t + \frac{1}{2}\Delta t\right) \tag{2.11}$$

$$\vec{v}\left(t + \frac{1}{2}\Delta t\right) = \vec{v}\left(t - \frac{1}{2}\Delta t\right) + \Delta t\vec{a}(t) \tag{2.12}$$

Pro výpočet rychlostí v časech v nichž jsou počítány souřadnice, můžeme rychlosti ve dvou následujících krocích $t + \Delta t$ a $t - \Delta t$ jednoduše zprůměrovat a brát jako rychlost v čase t. Leap Frog varianta Verletova algoritmu je implementována v řadě programů, jako je například modul sander v softwarovém balíku AMBER.

Diagram přehledně shrnuje posloupnost kroků u výše zmíněných algoritmů Verletova typu [33].

Dalším používanou numerickou metodou je Beemanův algoritmus:

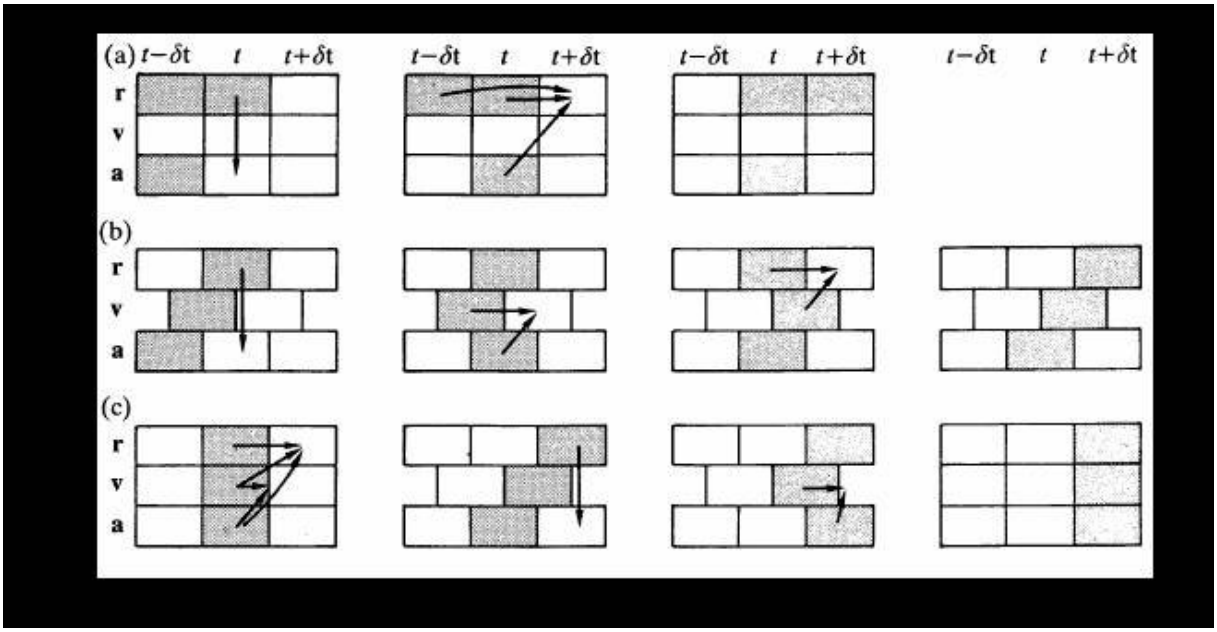
$$\vec{r}(t+\Delta t) = \vec{r}(t) + \vec{v}(t)\Delta t + \frac{2}{3}\vec{a}(t)\Delta t^2 - \frac{1}{6}\vec{a}(t-\Delta t)\Delta t^2 + O(\Delta t^4) \tag{2.13}$$

$$\vec{v}(t+\Delta t) = \vec{v}(t) + \frac{1}{3}\vec{a}(t+\Delta t)\Delta t + \frac{5}{6}\vec{a}(t)\Delta t - \frac{1}{6}\vec{a}(t-\Delta t)\Delta t + O(\Delta t^3) \tag{2.14}$$

Za cenu větší výpočetní náročnosti je dosaženo i větší přesnosti výpočtu.

Metody prediktor-korektor: Gearovy integrátory

Třída numerických integrátorů, která výpočet poloh a rychlostí provádí dvoukrokově, se v kontextu molekulárně-dynamických simulací nazývá Gearovy integrátory (jinak též metody prediktor-korektor). V prvním kroku - predikci - je na základě již spočítané trajektorie předpovězen další bod trajektorie. V kroku druhém - korekci - se této předpovědi využije k dopočítání přesnější hodnoty [26].



Obrázek 2.1: Varianty Verletova algoritmu. Na diagramech je šipkami znázorněna posloupnost výpočtů v průběhu numerické integrace pohybových rovnic. a) Základní Verletův algoritmus. b) Leap Frog varianta Verletova algoritmu. c) Rychlostní Verletův algoritmus [33].

Další techniky související s numerickým výpočtem

Při volbě časového kroku numerické metody jsme omezeni tvarem potenciální plochy, na které se pohybujeme. Proto je časový krok v molekulárně dynamických simulacích biomolekul omezen na zhruba 1fs. Prodloužení časového kroku můžeme docílit zafixováním nejrychlejších vibrací systému. To se týká zejména vodíkových atomů a nejčastěji se k tomu používají algoritmy SHAKE a RATTLE nebo algoritmus LINCS. Časový krok je pak možné zvýšit až na 2fs při zachování stability simulovaného systému v průběhu molekulárně-dynamické simulace.

2.1.3 Jednotlivé aspekty metody molekulární dynamiky

V následující části jsou popsány základní techniky používané při molekulárně-dynamických simulacích. Tvar nevazebného potenciálu pro VdW interakce (Lennard - Jonesův potenciál), metoda Ewaldovy sumace používaná při simulacích biomolekul (Particle Mesh Ewald summation, PME) k efektivnímu výpočtu dalekodosahové elektrické interakce, techniky pro provádění molekulárně-dynamických simulací v jiných termodynamických souborech než v souboru mikrokanonickém (tj. NVT, NPT namísto NVE). Stručně jsou zmíněny také nejběžnější modely molekuly vody.

Lennard-Jonesův potenciál

Pro popis interakce dvou nenabitých částic se používá aproximace ve tvaru Lennard-Jonesova (L-J) potenciálu:

$$V(r) = 4\epsilon \left[\left(\frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r} \right)^{6} \right] \tag{2.15}$$

Tvar funkce popisuje repulsi dvou atomů na krátkých vzdálenostech, která je způsobena překryvem atomových orbitalů (Pauliho vylučovací princip). Přitažlivé síly naopak působí na delších vzdálenostech. Parametr σ určující vzdálenost, ve které je potenciál nulový a parametr ϵ určující hloubku potenciálové jámy je třeba nafitovat na základě experimentálních dat nebo určit prostřednictvím kvantově chemických výpočtů. Analytický tvar repulsního členu nekoresponduje s teorií. Ve skutečností by se měl exponenciálně zmenšovat. Používaný tvar však umožňuje velmi efektivní výpočet (r^{12} je zvoleno jako druhá mocnina r^6).

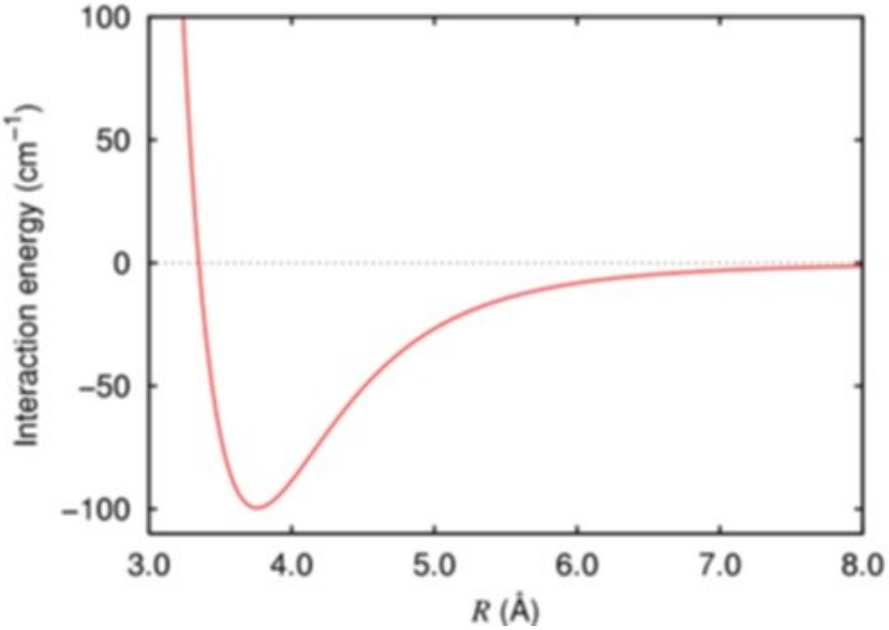
Přitažlivá část L-J potenciálu je naproti tomu zvolena tak, aby velmi přesně odpovídala Londonovským disperzním silám (dipól-dipólová interakce atomů bez stálého dipólu). Je to jediná přitažlivá síla působící mezi nepolárními atomy a je zodpovědná například za existenci kapalné fáze vzácných plynů.

L-J potenciál má nekonečný dosah, a proto se ve výpočtech používá určitá prahová vzdálenost, za kterou se tento potenciál nepočítá (takzvaný cutoff). Aby nedocházelo ke ztrátám energie v systému z důvodu oříznutí potenciálu, potenciál se od určité vzdálenosti (tzv. switching distance) interpoluje tak, aby se dostal na nulovou hodnotu v cutoff vzdálenosti.

Tvar potenciálu pro dimer argonu ilustruje obecný tvar Lennard-Jonesova potenciálu, viz obrázek 2.2.

Periodické okrajové podmínky

Pokud nezamýšlíme provádět výpočet ve vakuu, musíme stanovit určité okrajové podmínky. Velmi používanou metodou jsou takzvané periodické okrajové podmínky (PBC). Ty za cenu uměle vnesené periodicity do systému napodobují homogenní kondenzovanou fázi bez výrazných nároků na výpočetní čas. Vytvoří se dostatečně velká základní buňka simulovaného systému, která se periodicky zkopíruje v prostoru do krystalové mříže. V paměti se přitom uchovává pouze základní reprezentace každého atomu. Při výpočtu párového potenciálu dvou částic se pak dodržuje tzv. konvence nejbližšího obrazu (minimal image convention). Nebo-li pro daný atom se spočítá příspěvek pouze od toho obrazu druhého interagujícího atomu, který je k prvnímu atomu nejblíže. Tím se množství výpočtů pro daný systém přidáním PBC nezvýší. Pro správné fungování algoritmu je potřeba nastavit velikost základní buňky tak, aby byla minimálně dvakrát větší než cutoff nevazebných sil. Fungování PBC si lze představit i tak, že částici, která opustí základní buňku, nahradíme toutéž částicí, která do buňky vstoupí z opačné strany základní buňky.



Obrázek 2.2: Potenciál dimeru argonu [34].

Dlouhodosahové síly - Ewaldova sumace a PME metoda

Velmi účinným vylepšením výpočtu dlouhodosahových sil, bez zavedení cutoffu, je metoda Ewaldovy sumace (Particle Mesh Ewald, PME, viz. [35] a [36]). Zejména pro coulombickou interakci je zavedení cut offu příliš hrubým přiblížením. Pro systémy s vysokým nábojem, jako jsou nukleové kyseliny, zabraňuje aplikace PME např. rozpadu dvoušroubovic aniž by bylo třeba dodatečného přidávání umělých stabilizačních sil apod. Ve své podstatě se jedná o kombinaci dvou obecnějších metod.

První z nich je prostá Ewaldova sumace, použitelná pro periodické systémy (např. krystaly). Ewaldova sumace počítá divergující nekonečné řady dvoučásticových příspěvků pomocí Fourierovy transformace. Součet příspěvků je proveden v k prostoru s použitím rychlé Fourierovy transpormace (FFT). Potenciál je obvykle rozdělen na krátkodosahovou a dalekodosahovou část. Krátkodosahové příspěvky jsou obvykle sečteny v normálním r prostoru.

Použití FFT je umožněno particle mesh částí PME algoritmu. Ta přerozděluje náboje z jednotlivých atomů na periodickou mřížku, takže výpočet pak může být proveden efektivně na uzlových bodech této mřížky.

Nutnou podmínkou pro použití metody PME je periodicita systému a celkový nulový náboj základní periodické buňky.

Rovnice pro coulombovský potenciál rozdělený na dlouhodosahovou a krátkodosaho-

vou část spolu s korekčním členem má tvar:

$$U_{\text{Coul}} = \frac{1}{2V} \sum_{\mathbf{k}\neq 0} \frac{4\pi}{k^2} \left|\rho(k)\right|^2 e^{-k^2/4\alpha} - \left(\frac{\alpha}{\pi}\right)^{1/2} \sum_{i=1}^{N} q_i^2 + \frac{1}{2} \sum_{i\neq j}^{N} \frac{q_i q_j}{r_{ij}} \text{erfc}\left(\sqrt{a} r_{ij}\right) \ , \tag{2.16}$$

kde

$$\rho(k) = \sum_{i=1}^{N} q_i e^{-ik.r} \ , \tag{2.17}$$

vektory k jsou dány vztahem: $k = \frac{2\pi}{L} l$, volný parametr α (separation coeficient) se volí tak, aby byla konvergence v k prostoru (první člen) i v reálném prostoru (třetí člen) optimální [37]. Druhý člen představuje opravný člen na interakci nábojů se sebou samými.

Alternativou k Ewaldově sumaci je například metoda rychlého multipólového rozvoje (FMM - fast multipole method) [26].

Simulace v jiných statistických souborech

Pro simulace v jiných statistických souborech než mikrokanonickém se používá řada úprav pohybových rovnic. Ty zavádějí např. interakci s tepelnou lázní, nově definované proměnné představující imaginární píst působící na systém apod. Mezi nejpoužívanější algoritmy patří metoda Berendsenova nebo Nose-Hooverova termostatu a Berendsenova či Andersenova barostatu. Další možností je užití Langevinovy dynamiky pro simulaci srážek s částicemi tepelné lázně. Následující tovnice popisuje škálovací faktor λ pro rychlosti atomů používaný v rámci metody Berendsenova termostatu:

$$\lambda^2 = [1 + \frac{\Delta t}{\tau_T} \left(\frac{T_{\text{ext}}}{\mathcal{T}} - 1\right)] \ , \tag{2.18}$$

kde Δt je velikost časového kroku, T_{ext} cílová teplota - teplota lázně, T teplota systému a τ_T volný parametr reprezentující frekvenci srážek.

Modely vody v MD simulacích

Při molekulárně-dynamických simulacích biologických systémů jako jsou proteiny a nukleové kyseliny, je do simulovaného systému potřeba zahrnout vliv vodní obálky. Existuje řada přístupů, které vliv rozpouštědla zahrnují do pohybových rovnic implicitně. Pro přesnější (výpočetně však podstatně náročnější) molekulárně-dynamické výpočty, je žádoucí molekuly vody reprezentovat explicitně. K tomu potřebujeme vhodný model pro molekuly vody. Mezi nejpoužívanější patří modely SPC a TIP3P. Oproti implicitním přístupům skýtá explicitní zahrnutí vody do simulovaného sytému výhodu možnosti přímého pozorování dynamiky molekul vody participujících v reakcích nebo solvataci biomolekul.

2.2 Parametrizace empirických silových polí pro MD simulace

Při popisu interakcí molekulárního systému je možné buď vycházet z fundamentálních zákonů fyziky anebo přejít k menším či větším aproximacím. V kvantové chemii se nejčastěji přechází k řešení nečasové a časové Schrodingerovy rovnice (případně relativistické Diracovy rovnice) pro systém elektronů a jader (ab initio metody). Hojně se přitom používá takzvaná adiabatická aproximace, kdy se pohyb jader a elektronů separuje.

Přímé použití některých rovnic kvantové toerie v molekulárně-dynamických simulacích se obecně nazývá ab initio molekulární dynamika. Konkrétními realizacemi jsou například metody Car-Parrinelliho či Born-Oppenheimera.

Pro větší simulované systémy se od rovnic kvantové teorie upouští zcela a používají se rovnice klasické fyziky (klasická MD). Klasické rovnice mohou být doplněné o některé další (např. stochastické) členy (např. Langevinova dynamika).

Pro částice se pak zavádějí interakční potenciály tak, aby výsledky byly v co největším souladu s experimentálními daty, popřípadě s výsledky kvantově chemických výpočtů. Při navrhování interakčního potenciálu vyvstává problém, jakou analytickou funkční závislost pro potenciál zvolit. A jakým způsobem poté potenciál parametrizovat. S tím souvisí otázka, pro jaký soubor simulovaných systémů by mělo příslušné silové pole reprodukovat cílová data (výsledek experimentu nebo kvantově chemického výpočtu). Ačkoliv jsou si funkční tvary nejpoužívanějších silových polí (Amber ff94, CHARM22, MM3) podobné, v otázkách parametrizace je shoda výrazně menší. Jednotlivé skupiny autorů používají různé přístupy a neexistuje jednotný názor na nejvhodnější postup.

Obecně se dá říci, že dobré silové pole by mělo dávat uspokojivé výsledky pro většinu sloučenin ze skupiny chemických látek, pro které bylo vyvinuto. Důležitá je tedy tzv. přenositelnost parametrizace silového pole odvozeného pomocí malé množiny cílových molekul na množinu všech látek, pro které má silové pole fungovat (např. proteiny). Dalším kritériem může být jednoduchost reparametrizace v případě, že se snažíme silové pole rozšířit. Pro některá pole je potřeba provést velké množství kvantově chemických výpočtů kvůli přidání jednoho jediného atomového typu.

Při vývoji silového pole je velmi důležitý tzv. nábojový model (charge model). To je způsob, jakým jsou reprezentované a odvozované náboje pro elektrostatickou interakci. Vzhledem k velikosti elektrostatické interakce vede často zlepšení nábojového modelu k podstatně lepším výsledkům celého silového pole.

2.2.1 Přehled empirických silových polí pro MD

Pro účely molekulární dynamiky se používá celá řada molekulárně mechanických silových polí popisujících vzájemné působení mezi částicemi. Vývoj silových polí má dlouhou a bohatou historii a je předmětem aktivního výzkumu. Svoji podstatou se jedná o klíčový prvek, na kterém je kvalita simulace závislá. Interakční potenciál musí obsahovat všechny relevantní složky vzájemného působení. Tedy hlavně síly elektrostatické a Van der Waal-

sovy (repulze na krátkých vzdálenostech a přitažlivá síla na větších vzdálenostech), které jsou souhrnně označované jako nevazebné interakce. Dále pak síly představující kovalentní vazby v simulovaných molekulách, tzv. vazebné členy:

$$E_{total} = E_{bonded} + E_{non-bonded} \tag{2.19}$$

$$E_{bonded} = E_{bonds} + E_{angles} + E_{dihedrals} \tag{2.20}$$

$$E_{non-bonded} = E_{electrostatic} + E_{VanderWaals} \tag{2.21}$$

Potenciál vazeb a úhlů je často modelován Hookovým zákonem, potenciál torzních úhlů je modelován Fourierovým rozvojem příslušného potenciálu pro rotační bariéry.

Pro realističtější popis vazeb mezi atomy se někdy používá Morseho potenciál:

$$V(r) = D_e(1 - e^{-a(r-r_e)})^2 - D_e \ , \tag{2.22}$$

kde r_e je rovnovážná vzdálenost, D_e je hloubka potenciálové jámy v rovnováze, parametr a popisuje šířku potenciálvé jámy.

Kromě tvaru interakčních potenciálů je potřeba v silovém poli definovat množinu částic (tzv. atomových typů), na které toto pole působí. Ty většinou odpovídají kombinaci atomu s jeho blízkým okolím (alifatický uhlík, aromatický uhlík apod.), případně modelují více atomů najednou pomocí jedné pseudočástice (angl. united atom model), nebo neodpovídají žádnému atomu (definují interakční centrum).

Silové pole CHARMM

CHARMM (Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics) je široce rozšířené silové pole a také softwarový balík umožňující provádět molekulárně-dynamické simulace, výpočty volných energií apod. Konkrétně na simulace proteinů je zaměřeno silové pole CHARMM22 a CHARMM22/CMAP s korekcí dihedrálních úhlů a na simulace DNA, RNA a lipidů je zaměřeno silové pole CHARMM27. Tato silová pole lze i kombinovat.

Dále existuje větší množství molekul, pro která byly parametry dodatečně vyvinuty (např. cukry a sloučeniny s fluorem).

Interakční potenciál v silovém poli CHARMM má tvar:

$$\begin{aligned} E_{\text{tot}} = & \sum_{\text{bonds}} K_r(r - r_{eq})^2 \\ & + \sum_{\text{angles}} K_\theta(\theta - \theta_{eq})^2 \\ & + \sum_{\text{dihedrals}} \frac{V_n}{2}[1 + \cos(n\phi - \gamma)] \\ & + \sum_{i<j} \left[\frac{A_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{R_{ij}^{6}} + \frac{q_i q_j}{\epsilon R_{ij}} \right] \end{aligned} \tag{2.23}$$

Nábojový model silových polí CHARMM je založen na kvantově chemických výpočtech interakcí množiny modelových molekul s vodou.

Silové pole AMBER

Silové pole AMBER je další velmi používané silové pole. Jeho vznik se datuje do 80. let. Interakční potenciál má stejný tvar jako u silového pole CHARMM. Konkrétní sady atomových typů a parametrů jsou ff94, ff97, ff98, ff99SB, ff03, ff03ua. Tzv. "generalized AMBER force field" - gaff je určen pro široké spektrum malých organických molekul.

Z pohledu parametrizace silového pole AMBER je nejdůležitějším aspektem užití nábojového modelu RESP (restricted ESP) [38], používaný počínaje ff94 verzí silového pole AMBER. Tento nábojový model vychází ze starších modelů používajících kvantově mechanicky vypočtené hodnoty elektrostatického potenciálu (ESP) k nafitování parciálních nábojů na atomová centra parametrizovaných molekul. Při fitování metodou nejmenších čtverců používá hyperbolickou vazbu mezi počátečním parciálním nábojem a jeho odchylkou. Cílem je najít rozdělení nábojů, která mají pokud možno malé náboje na nepolárních uhlících. Zároveň je však třeba zachovat větší náboje na polárních místech molekuly. Model RESP navíc umožňuje tzv. multikonformační a multimolekulový fit. Při nich se provádí fit pro několik konformací nebo molekul zároveň. V prvním případě jsou náboje na odpovídajících si atomových centrech jednotlivých konformerů svázany vazbou a rovnají se. Procedura hledá minimum fitovací funkce přes všechny zadané geometrie s ohledem na příslušné hodnoty ESP napočtené prostřednictvím ab initio výpočtů. Ve druhém případě jsou společně svázany funkční skupiny dvou molekul, tak aby měly danou hodnotu náboje. To umožnuje spojovat parametrizované molekuly nebo molekulové fragmenty do větších celků.

Přes to, že takto vypočtené náboje jsou v principu reprodukovatelné, není jejich reprodukce v praxi vždy snadná. Zvláště pokud není jasné, které konformery molekuly původní autor při výpočtu použil.

Výpočty ESP jsou prováděny ve vakuu Hartree-Fockovou metodou. Ta má shodou okolností velmi podobnou velikost chyby jako chyba vzniklá zanedbáním solvatace molekuly (jejich znaménka jsou avšak opačná). Tj. v konečném důsledku jsou molekuly v tomto typu výpočtu polarizované tak, že to dobře imituje stav, kdy by se molekuly nacházely v kondenzované fázi. Optimalizace geometrií je možno provádět na jakékoliv úrovni kvantově mechanické teorie.

Pro parametrizaci dihedrálních členů v silovém poli se používají ab initio vypočtené hodnoty rotačních bariér pro malé modelové systémy. Pro rovnovážné hodnoty vazeb a úhlů se používají experimentální strukturní parametry získané např. z cambridgské databáze nebo z proteinové databanky. Při parametrizaci VdW členů se je možné vycházet např. z experimentálně naměřených hodnot sublimačních tepel.

2.3 Softwarové balíky

Hlavní část výpočtů prezentovaných v této diplomové práci byla provedena pomocí softwarových balíků AMBER8 a NAMD. Ty jsou určené pro výpočty metodou klasické molekulární dynamiky. Některé pomocné výpočty (např. parametrizace silového pole pro modifikovanou internukleotidovou spojku) byly provedeny prostřednictvím programu Gaussian03. Pro některé cvičné molekulárně-dynamické simulace v rámci osvojování metodiky byl využíván program GROMACS. Zobrazování biomolekul a část analýzy molekulárně-dynamických simulací byla prováděna s pomocí grafického programu VMD. Program Chemcraft byl užíván pro zobrazování výsledků ab initio výpočtů. Menší množství přípravných a analytických úkonů bylo prováděno s pomocí dalších programů jako Swisspdbvieweru (Deepview) a řady skriptů zmíněných v závěru této kapitoly. Pro zájemce o výpočty pomocí metody molekulární dynamiky následuje stručná charakteristika jednotlivých programů.
Většina softwarovýc balíků pro provádění MD simulací je z uživatelského hlediska velmi podobná. Není proto větším problémem mezi jednotlivými programy přecházet. Ať už z důvodu zrychlení výpočtu (některé programy jsou lépe paralizované), z důvodu dostupnosti konkrétní dílčí metody nebo verze silového pole. Samozřejmě to s sebou nese i určitá úskalí. Je potřeba vědět o implicitních nastaveních jako je škálování tzv. 1-4 interakcí (NAMD vs. AMBER) a podobně. Někdy se této skutečnosti dá i využít pro kontrolu výsledků MD výpočtů. Například při parametrizaci modifikované internukleotidové spojky byly výpočty zprvu prováděny v programech NAMD i AMBER. Přitom byla kontrolována shodnost energií jednotlivých konformačních minim.

2.3.1 AMBER

Softwarový balík Amber je historicky jeden z nejstarších kódů pro výpočty MD.Vznikl současně se vznikem silového pole Amber ff94. Je v něm naimplementováno velké množství metod, které u jiných kódů často chybí.V současnosti je k dispozici verze Amber10 a nově vytvořená suita programů pod názvem Ambertools (pod licencí GPL) soustřeďující pomocné a analytické programy. Samotný Amber se svými energetickými programy, je svojí licenční politikou velmi dostupný (nejedná se však o opensource ani freeware). Patří, spolu s programem CHARMM, k dlouhodobě nejrozšířenějším a nejvíce vyvíjeným kódům.

K jeho nevýhodám patří relativně náročnější instalace. Velká část kódu je napsána ve FORTRANU a C.V Ambertools jsou k dispozici především programy pro přípravu systému: tleap, pro parametrizaci nových molekul: antechamber a pro analyzu trajektorií: ptraj. Jejich C - kód je uvolněn pod GPL licencí a měl by uživatelům sloužit pro případné vlastní modifikace.

2.3.2 NAMD

NAMD je relativně nový program s velkým důrazem na paralelizované výpočty MD. Škáluje až do stovek procesorů a je uživatelsky velmi přijemný. Významné může být i velmi snadné spuštění prakticky na jakékoliv rozšířené platformě OS a hardwaru. Ke komunikaci používá mimo jiné TCP nebo UDP protokoly a výpočetní démoni se dají velmi snadno spustit i v jinak nevýpočetním prostředí osobních počítačů. Jeho hlavní význam je však v použití na výpočetních clusterech, kde skrz dobrou škálovatelnost dosahuje vysoké rychlosti výpočtu trajektorií. Z hledika metod je méně bohatý než Amber, obsahuje základní metody pro rovnovážné MD a některé speciálnější metody jako například Steer MD. Program je dále vyvíjen, jeho nová verze 2.7 z roku 2009 obsahuje mnoho zajímavých funkcí jako jsou například tzv. collective variables.

2.3.3 GAUSSIAN03

Pro optimalizační výpočty fosfátové spojky byl použit standardní kvantově chemický software Gaussian03, který obsahuje potřebné metody HF a MP2. Použité metody byly optimalizace v redundandních souřadnicích HF/6-31G*, výpočty single point energií MP2/6-31G*//HF/6-31G*, výpočty ESP z takto získaných minim, kontrola frekvencí a hledání transitních stavů - rotačních bariér dihedrálních úhlů spojky. Pro hledání minim byla odzkoušena i metoda AM1 (ukázala se jako velmi nevhodná) a metoda DFT s B3LYP funkcionálem, pro kontrolu výpočtu minim.

2.3.4 VMD, Chimera a Chemcraft

Tyto tři programy byly použity pro 3D zobrazování jednotlivých molekul a trajektorií. Program VMD vyniká především v manipulaci s trajektoriemy MD a obsahuje i některé funkce pro modelování a analýzu molekul. Program Chimera je dobrou volbou pro generování hezkých 3D reprezentací molekul. Alternativou je pak například používaný renderer POV3ray. Program Chemcraft je relativně kvalitní program pro visualizaci výpočtů z Gaussianů nebo Gamessu (alternativa Gaussianu), je volně dostupný.

2.3.5 Pomocné skripty

Při provádění nejrůznějších modelovacích a analytických úkolů je většinou výhodné a často nezbytné tuto činnost nějakým způsobem automatizovat pomocí skriptů nebo malých programů, ať už vlastních nebo volně dostupných na internetu. Těch volně dostupných je velké množství a je často možné si vybrat i mezi jednotlivými programovacími jazyky. Tyto skripty mohou často ušetřit čas strávený psaním vlastních nástrojů. Kromě úzce specializovaných skriptů pro přípravu simulovaných systému jsou to i široce použitelné balíčky skriptů, jako například PDB Tools pro zpracovaní pdb souborů [39].

Literatura

[1] Saenger, W., *Principles of Nucleic Acid Structure*. Springer-Verlag, 1984.

[2] Vodrážka, Z., *Biochemie*. Academia, 1996.

[3] http://www.bioc.aecom.yu.edu/labs/girvlab/nmr/course/.

[4] Alberts, B., Bray, D., Johnson, A. Lewis, J., Raff M., Roberts K., Walter P., *Základy buněčné biologie*, Espero publishing, 1998.

[5] Hannoush, R. M., Carriero , S., Min, K-L., Damha, M. J.: Selective Inhibition of HIV-1 Reverse Transcriptase (HIV-1 RT) RNase H by Small RNA Hairpins and Dumbbells, *ChemBioChem* (2004) **5**, 527-533.

[6] Bloomfield, A., V., Crothers, D., M., Tinoco, I., *Nucleic Acids: Structures, Properties, and Functions*, University Science Books, 2000.

[7] http://www.lsbu.ac.uk/water/furan.html.

[8] http://rmn.iqfr.csic.es/guide/eNMR/adn/pucker.html.

[9] http://papers.gersteinlab.org/e-print/na-geom-jmb/text.

[10] Wu, H., Lima, W. F., Crooke, S.T.: Properties of Cloned and Expressed Human RNase H1, *The Journal Of Biological Chemistry* (1999) **274**, 28270-28278.

[11] Kopecký, V. Jr., *Úvod do struktury proteinů*, studijní materiály.

[12] Sastry, M., Brown, C., Wagner, G., Clark, T.D.: Cyclic peptide helices: A hybrid beta-hairpin/beta-helical supersecondary structure, *J. Am. Chem. Soc.* (2006) **128**, 10650-10651.

[13] http://en.wikipedia.org/wiki/RNaseH.

[14] Nowotny, M., Gaidamakov, S. A., Ghirlando, R., Cerritelli, S. M., Crouch R. J., Yang, W.: Stepwise analyses of metal ions in RNase H catalysis from substrate destabilisation to product release, *EMBO Journal* (2006) **25**, 1924-1933.

[15] Nowotny, M., Gaidamakov, S. A., Ghirlando, R., Cerritelli, S. M., Crouch R. J., Yang, W., Structure of Human RNase H1 Complexed with an RNA/DNA Hybrid: Insight into HIV Reverse Transcription, *Molecular Cell* (2007) **28**, 264-276.

[16] Sarafianos, S. G., Kalyan, D., Tantillo, Ch., Clark Jr., A. D., Ding, J., Whitcomb, J. M., Boyer, P. L., Hughes, S. H., Arnold, E.: Crystal Structure of HIV-1 reverse transcriptase in complex with polypurin tract RNA:DNA, *The EMBO Journal* (2001) **20**, 1449-1461.

[17] Pari, K., Mueller G. A., DeRose, E. F., Kirby, T. W., London, R. E.: Solution Structure of the RNase H Domain of the HIV-1 Reverse Transcriptase in Presence of Magnesium, *Biochemistry* (2003) **42**, 639-650.

[18] Kern, G., Pelton, J., Marquesee, S., Kern, D.: Structural properties of the histidine-containing loop in HIV-1 RNase H, *Biophysical Chemistry* (2002) **96**, 285-291.

[19] Nowotny, M., Gaidamakov, S. A., Crouch R. J., Yang, W., Crystal Structures of RNase H Bound to an RNA/DNA Hybrid: Substrate Specificity and Metal-Dependent Catalysis, *Cell* (2005) **121**, 1006-1016.

[20] Nowotny, M., Gaidamakov, S. A., Ghirlando, R., Cerritelli, S. M., Crouch, R. J., Yang, W.: Specific recognition of RNA/DNA hybrid and enhancement of human RNase H1 by HBD, *EMBO Journal* (2008) **27**, 1172-1181.

[21] Stephenson, M., L., Zamecnik, P., C.: Inhibition of Rous sarcoma viral RNA translation by a specific oligodeoxyribonucleotide, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* (1978) **75 (1)**, 285288.

[22] Micklefield, J.: Backbone Modification of Nucleic Acids: Synthesis, Structure and Therapeutic Applications, *Current Medicinal Chemistry* (2001) **8**, 1157-1179.

[23] Gewirtz, A. M., Sokol, D. L., Ratajczak, M. Z., Nucleic Acid Therapeutics: State of the Art and Future Prospects. *Blood* (1998) **92**, 712-736.

[24] Pavlová, D.: Molekulárně-dynamické simulace analog nukleových kyselin a jejich komplexů s enzymem RNasou H, diplomová práce, 2007.

[25] Jungwirth, P.: *Klasická a kvantová molekulová dynamika*, studijní materiály.

[26] Nezbeda, I., Kolafa, J., Kotrla, M.: *Úvod do počítačových simulací. Metody Monte Carlo a molekulární dynamiky*, Karolinum, Praha, 2003.

[27] Horák, J., Krlín L.: *Vratnost a nevratnost dynamických systémů.* Academia, 2004.

[28] Shaw, D., E., et. al.: Anton, a special-purpose machine for molecular dynamics simulation, *Proceedings of the 34th annual international symposium on Computer architecture* (2007).

[29] NAMD manual: http://www.ks.uiuc.edu/Research/namd/.

[30] Verlet, L.: Computer Experiments on Classical Fluids, *PhysRev.* (1967) **159**, 98 July.

[31] Brun, V. : Carl Störmer in memoriam, *Acta Mathematica* **100**, 1-2.

[32] Vitásek, E.: *Numerické metody*, SNTL, 1987.

[33] Allen, M., P., Tildesley, D., J.: Computer simulation of liquids, *Oxford University Press*, 1990.

[34] http://commons.wikimedia.org.

[35] Abrams, C.: *Molecular Simulation*, učební text.

[36] Darden, T., Perera, L., Leping, L., Pedersen, L.: New tricks for modelers from the crystallography toolkit: The particle mesh Ewald algorithm and its use in nucleic acid simulations, *Structure* (1999) **7**, R55-R60.

[37] Hummer, G.: The numerical accuracy of truncated Ewald sums for periodic systems with long-range Coulomb interactions, *Chemical Physics Letters* (1995).

[38] Cornell W. D., Cieplak P., Bayly Ch. I., Gould I. R., Merz, Jr. K. M., Ferguson D. M., Spellmeyer D. C., Fox T., Caldwell J. W., Kollman P. A.: A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules, *Journal of American Chemical Society* (1995) **117**, 51795197.

[39] http://www.umass.edu/microbio/rasmol/pdbtools.

[40] Rejman, D., Snášel, J., Liboska, R., Točík, Z., Pačes, O., Králíková, Š., Rinnová, M., and Rosenberg, I.: Oligonucleotides with Isopolar Phosphonate Internucleotide Linkage: A New Perspective for Antisense Compounds?, *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids* (2001) **20 (4-7)**, 819-823.

[41] Barvík Jr., I., E. coli RNase HI and the Phosphonate DNA/RNA Hybrid: Molecular Dynamics Simulations, *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids* (2005) **24 (5-7)**, 435-441.

[42] Perez, A., Marchan, I., Svozil, D., Šponer, J., Cheatham III, T. E., Laughton, Ch. A., and Orozco, M.: Refinement of the AMBER Force Field for Nucleic Acids: Improving the Description of alfa/gamma Conformers, *Biophysical Journal* (2007) **92**, 3817-3829.

[43] Jurečka, P., Šponer, J., and Hobza, P.: Potential Energy Surface of the Cytosine Dimer: MP2 Complete Basis Set Limit Interaction Energies, CCSD(T) Correction Term, and Comparison with the AMBER Force Field, *J. Phys. Chem. B* (2004) **108**, 5466-5471.

[44] Freddolino, P. L., Liu, F., Gruebele, M., and Schulten, K.: Ten-Microsecond Molecular Dynamics Simulation of a Fast-Folding WW Domain, *Biophysical Journal* (2008) **94**, L75-L77.

Appendix A

Appendix B

Appendix C

Appendix D

Appendix E

Appendix F

Kapitola 3

Výsledky

3.1 Cíle práce

3.1.1 Biologická motivace – antisense oligonukleotidy

Tzv. „antisense“ oligonukleotidy slouží k selektivní inhibici exprese genetické informace. Jedná se o chemicky modifikované nukleové kyseliny, které nesou sekvenci bazí komplementární k části některé mRNA. Pokud se antisense oligonukleotid a mRNA potkají uvnitř buňky, vytvoří dvoušroubovicovitou strukturu. Tím je znemožněno ribosomům čtení genetické informace uložené v mRNA. Na této bázi je tedy možné zamezit syntéze konkrétního proteinu. Tento přístup k tvorbě léků skýtá řadu výhod oproti klasické inhibici již vysyntetizovaného proteinu prostřednictvím malých molekul cílených do jeho aktivního místa. Zejména je přitažlivé, že při použití antisense oligonukleotidů vystačíme se znalostí pouze primární struktury proteinu. Prostou záměnou sekvence bazí je pak možné inhibovat syntézu v principu libovolného proteinu. Na druhou stranu jsou zde jisté technologické problémy, které brzdí uvedení antisense oligonukleotidů do klinické praxe. Jednak buňka vnímá krátká vlákna nukleových kyselin v podstatě jako smetí a dokáže tato vlákna velmi rychle odbourat (řádově v minutách). Tomu lze čelit chemickou modifikací páteře nukleových kyselin. Další problém představuje transport krátkých nukleových kyselin (výrazně nabitých) skrze buněčné membrány. To lze řešit do jisté míry opět chemickými modifikacemi páteře nukleových kyselin. Další možností je např. konstrukce umělých částic strukturou připomínajících viry.

Pokud má chemicky modifikovaný deoxyoligonukleotid vhodnou strukturu, může po navázání na cílovou mRNA aktivovat enzym RNase H, který vlákno mRNA selektivně odbourá. Antisense oligonukleotid je pak osvobozen a může výtvořit komplex s další kopií mRNA. Celý cyklus se poté opakuje. Ačkoliv byly v minulosti vysyntentizovány stovky chemicky modifikovaných oligonukleotidů, pouze malá část chemických modifikací může být provedena po celé délce antisense oligonukleotidu, aniž by byla znemožněna aktivita enzymu RNase H. Jednou z mála světlých výjimek je neisosterní fosfonátová modifikace [40], kdy je do páteře nukleové kyseliny (namísto přirozené fosfátové spojky C3‘-O3‘-P-O5‘-C5‘) vložena modifikovaná spojka C3‘-O3‘-P-C-O5‘-C5‘. V případě, že přirozené a výše zmíněným způsobem modifikované spojky alternují v páteři antisense oligonukleotidu, je aktivita RNase H zachována.

Zajímavé je, že strukturně velmi podobná chemická modifikace C3‘-O3‘-C-P-O5‘-C5‘ je biologicky neaktivní.

3.1.2 Molekulárně-dynamické simulace komplexů enzymu RNase H a antisense oligonukleotidů

Molekulárně-dynamické simulace jsou ideální nástroj pro zkoumání komplexů nukleových kyselin a proteinů. V principu umožňují interpretovat na atomární úrovni výsledky experimentů. V tomto konkrétním případě (molekulárně-dynamických simulací komplexů enzymu RNase H a dvoušroubovic DNA:RNA) je konečným cílem přispět k optimalizaci struktury antisense oligonukleotidů. Tj. dosáhnout toho, aby vazba enzym-nukleová kyselina, popř. strukturní změna v aktivním místě enzymu RNase H v důsledku chemické modifikace antisense oligonukleotidu korelovala s biochemickými daty. Ideální by bylo, pokud by bylo možné „in silico“ predikovat, zda chemická modifikace naruší vazbu hybridního dvoušroubovicovitého komplexu k RNase H. Tj. zda chemicky modifikované vlákno DNA by mohlo být biologicky aktivní jako antisense oligonukleotid selektivně inhibující expresi genetické informace vazbou k mRNA s komplementární sekvencí bazí a iniciující její degradaci enzymem RNase H.

Podnětem pro zde prezentované molekulárně-dynamické simulace komplexů chemicky modifikovaných nukleových kyselin a enzymu RNase H bylo výše zmíněné zjištění, že jedna z fosfonátových internukleotidových spojek aktivuje enzym RNase H, kdežto jiná jí velmi podobná chemická modifikace ne. Ve své práci jsem navazoval na dřívější úsilí [41, 24]. Na počátku byl vytvořen počítačový model komplexu E. Coli RNase H a nukleové kyseliny [41]. Na jeho základě byl posléze vytvořen homologní model komplexu lidské varianty enzymu RNase H a nukleové kyseliny [24]. Jako templát pro homologní modelování byly použity tehdy dostupné krystalové struktury enzymu E. coli RNase H. Ty však obsahovaly pouze samotný enzym, nikoliv nukleovou kyselinu. Krystalová struktura komplexu lidské varianty enzymu RNase H a nukleové kyseliny je dostupná teprve krátce [15]. Porovnáním této krystalové struktury a výše zmíněných počítačových modelů jsem zjistil, že ačkoliv sekvenční alignment nebyl úplně optimální. Mnoho podstatných rysů vazby nukleové kyseliny a enzymu bylo postiženo správně. Celková vzájemná poloha nukleové kyseliny a enzymu (obr. 3.1), geometrie aktivního místa (obr. 3.2) a vazba DNA vlákna do dvou vazebných míst (obr. 3.3-3.7).

Přesto předchozí MD simulace komplexů enzymu RNase H a nukleových kyselin s fosfonátovou modifikací přinesly výsledky spíše v rozporu s biochemickými daty. S Thr-DNA vazebným místem (obr. 3.7) interagovala lépe „neaktivní“ varianta fosfonátové spojky. Je zde několik možných vysvětlení, která jsem se pokusil prověřit v této diplomové práci.

1) V krystalové struktuře [15] komplexu lidské varianty enzymu RNase H a nukleové kyseliny (obr. 3.1) bylo vyrafinováno tzv. fosfát vážící místo (zde nazýváno Thr-DNA vazebné místo viz. obr. 3.7). Jako podstatná se jeví interakce s argininovým residuem (obr. 3.7 a,c), jehož postranní řetězec v krystalových strukturách bez substrátu (které byly použity jako vzor pro homologní modely a následné molekulárně-dynamické simulace [24]) mířil na opačnou stranu. V molekulárně-dynamických simulacích s modifikovanou fosfonátovou spojkou se proto argininové residuum nemohlo podílet na stabilizaci. Tzv. Thr-DNA vazebné místo je přitom klíčové, neboť se nachází jenom dvě pozice od aktivního místa (a druhým směrem opět dvě pozice od Trp-DNA vazebného místa).

2) Dosavadní vývoj v oblasti počítačového modelování biomolekul ukazuje, že je poměrně problematické naparametrizovat silová pole tak, aby páteře proteinů správně preferovaly pro různé sekvence aminokyselin alfa-helikální či beta-sheetové uspořádání. Extrémně dlouhé molekulárně-dynamické simulace nukleových kyselin pak ukázaly [42], že v důsledku kumulace artefaktů v konformacích internukleotidových spojek v páteři nukleových kyselin může dojít třeba i k rozpletení dvoušroubovicovitých struktur. Interakce nukleové kyseliny a proteinu může tyto konformační přechody potenciálně podnítit tak, že kumulace artefaktů se odehraje již na časové škále zde prezentovaných molekulárně-dynamických simulací. Proto jsem v rámci diplomové práce testoval několik verzí silového pole AMBER [38].

3) Pokud je parametrizace silového pole pro popis přirozené nukleové kyseliny stále ne zcela dořešená záležitost, pak ještě svízelnější je to v případě chemicky modifikovaných nukleových kyselin s prodlouženou fosfonátovou spojkou. Zde se totiž internukleotidová spojka prodlužuje o jednu vazbu. Modelový systém C-O-P-C-O-C obsahuje tři torzní úhly (COPC, OPCO, PCOC) se třemi energetickými minimy pro každý z nich. V konečném důsledku je třeba vzít do úvahy celkem 27 konformací (tedy 3x3x3 konformací). Mojí ambicí bylo proto dosáhnout toho, aby pro tento modelový systém v kvantově-chemickém a klasickém výpočtu vznikal rozdíl max. 1 kcal/mol pro relativní energie jednotlivých konformerů.

3.1.3 Provedené MD simulace

Celkem bylo v rámci diplomové práce provedeno devět molekulárně-dynamických simulací komplexů nukleových kyselin a enzymu RNase H. V sedmi případech se jednalo o komplex enzymu a nemodifikované nukleové kyseliny. Ve dvou případech byla do páteře nukleové kyseliny vložena fosfonátová spojka.

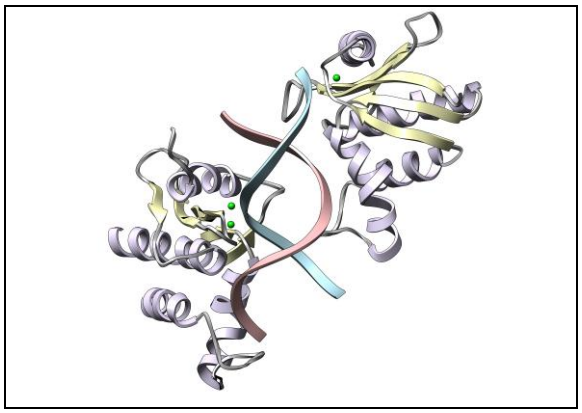
Z hlediska simulovaného systému se jednalo v případě simulací 1-3 o komplexy se dvěma jednotkami enzymu RNase H uspořádanými tak (obr. 3.1 a,b), jak to bylo pozorováno v krystalové struktuře [15]. Takové uspořádání by se mohlo vyskytovat i

v buňce. Případná interakce obou jednotek enzymu RNase H může přispívat k aktivitě. Nebo naopak může mít inhibiční účinek.

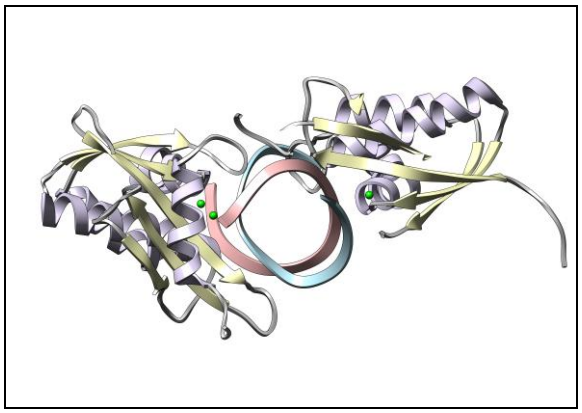
Dále v případě simulací 4-7 byla simulována interakce jednoho enzymu RNase H a přirozené nukleové kyseliny (obr. 3.1 c). Tento simulovaný systém vznikl odstraněním jedné kopie enzymu RNase H z krystalové struktury. Nukleová kyselina byla ponechána v původní délce, aby bylo možné sledovat její relaxaci z konformace vnucené ji interakcí s odstraněnou kopií enzymu RNase H. To umožnilo sledovat výskyt výše zmíněných artefaktů v konformačních preferencích internukleotidových spojek při větší strukturní změně celé dvoušroubovice.

U simulací 8-9 se jednalo o postihnutí interakce enzymu RNase H s chemicky modifikovaným vláknem. Opět byla ponechána pouze jedna jednotka enzymu RNase H. Dvoušroubovice nukleové kyseliny byla oproti krystalové struktuře zkrácena, aby se molekulárně-dynamické simulace zrychlily. Cílem bylo sledovat, zda je chemicky modifikovaná spojka schopna realizovat všechny interakce ve fosfát vážícím Thr-DNA vazebném místě. Popř. zda dojde k ovlivnění vazby RNA vlákna do aktivního místa a DNA vlákna do Trp-DNA vazebného místa.

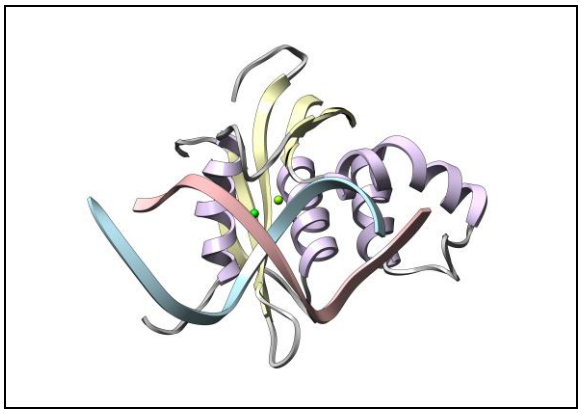
Provedené molekulárně-dynamické simulace byly kvantitativně vyhodnoceny. Byl monitorován časový vývoj iterakce aminoskupin s fosfátovými skupinami v páteři nukleové kyseliny a geometrie aktivního místa. U nukleových kyselin byl sledován časový vývoj konformačních preferencí internukleotidových spojek, deoxyribos a ribos a Watson-Crickovského párování bazí.



-a-

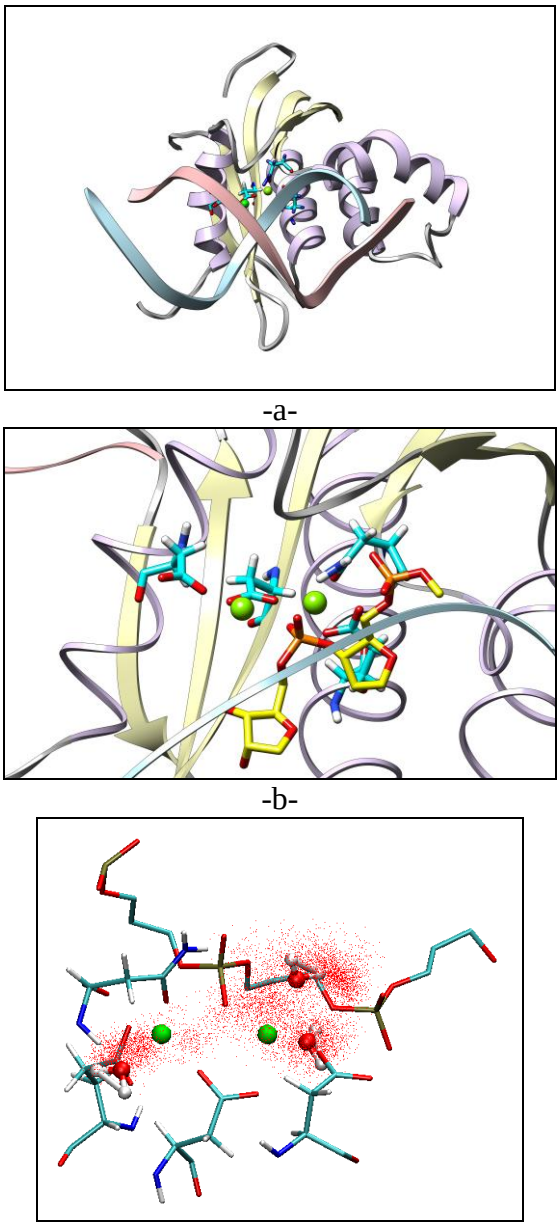


-b-



-c-

Obrázek 3.1: a) Komplex dvou katalytických domén lidské RNasy H navázaných na hybridní duplex DNA:RNA (simulace MD_1 až MD_3). V aktivních centrech obou domén RNase H jsou vykresleny hořčíkové iony Mg^{2+} (zelená barva). Dva hořčíkové ionty se nacházejí v aktivním místě první domény RNase H a pouze jeden v aktivním místě druhé domény RNase H. RNA řetězec je obarven světle modře, DNA řetězec červeně. b) Pohled podél osy duplexu DNA:RNA. Patrné je umístění Mg^{2+} iontů ve „vidličce" tvořené dvěma paralelními *beta*-sheety. c) Komplex jedné katalytické domény lidské RNasy H a duplexu DNA:RNA (simulace MD_4 až MD_9). V pravé části obrázku je vidět nepravidelná smyčka proteinu (zbarvena šedě) skládající se z basických aminokyselin, tzv. „basic protrusion".

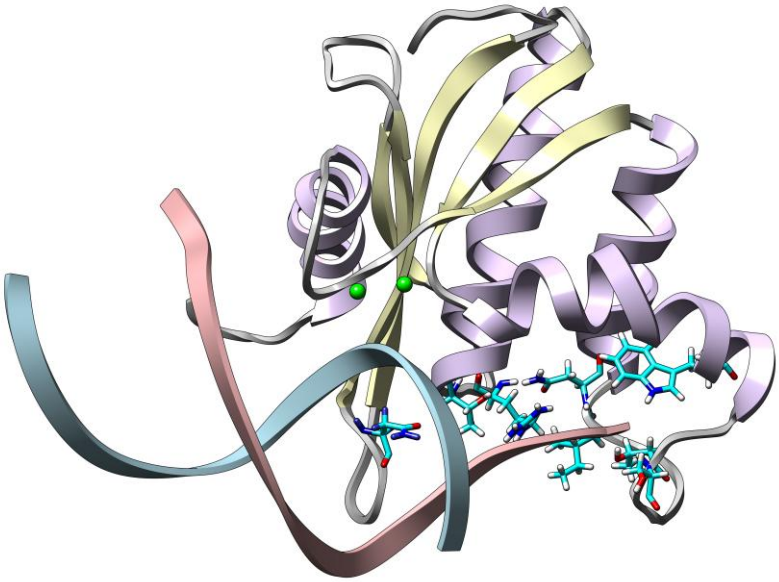


-a-

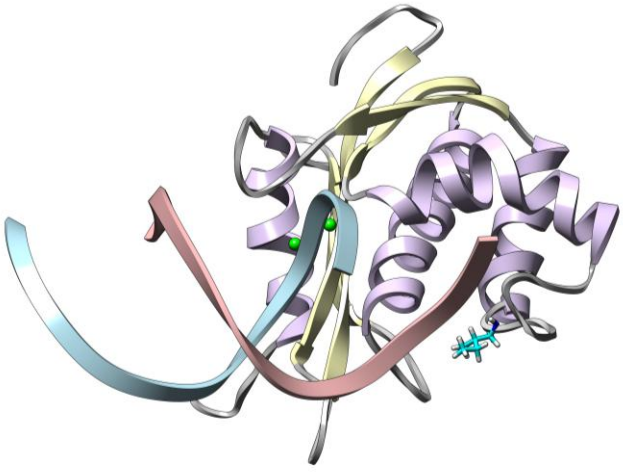
-b-

-c-

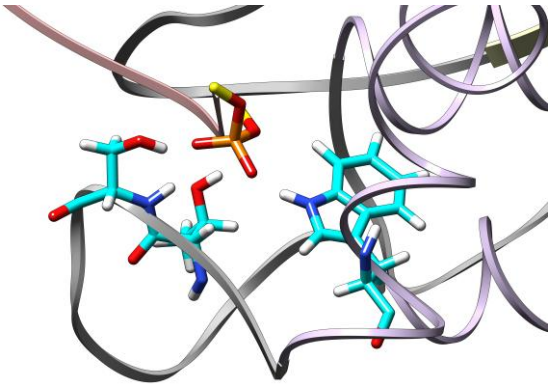
Obrázek 3.2: Aktivní místo katalytické domény lidské RNasy H: residua *Asp13, Glu54, Asn78, Asp142* tvoří evolučně konzervovaný motiv DEDD (zobrazena explicitně na atomární úrovni). Mg^{2+} ionty jsou vykresleny zeleně. a) Celkový pohled na katalytickou doménu lidské RNasy H, v popředí je zakreslen duplex DNA/RNA (DNA - červená stuha, RNA – světle modrá stuha). b) Detail aktivního místa se štěpenou fosfátovou spojkou. Dva furanózové kruhy cukrfosfátové páteře přímo sousedíci s fosfátem štěpené vazby jsou zvýrazněny žlutě. c) Solvatace aktivního místa. Obláčky sestávající z červených bodů představují polohy atomů kyslíku z molekul vody během MD simulace a identifikují místa, kde se molekuly vody v aktivním centru preferovaně zdržují. Pro názornost jsou zakresleny tři molekuly vody představující stabilní solvatační vrstvu. Molekula vody ležící nejblíže fosfátové skupině (na obrázku nahoře) je v pozici umožňující atakovat a v konečném důsledku přeštípnout fosfátovou spojku.



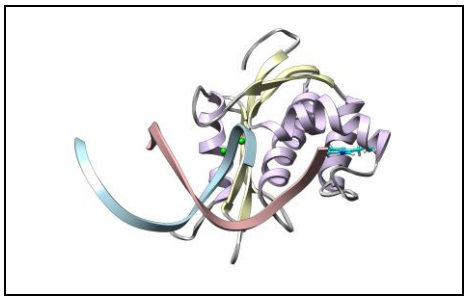
Obrázek 3.3: Vazba RNasy H na DNA vlákno (červená stuha) duplexu DNA:RNA. Residua podílející se na vazbě jsou znázorněna modře - zprava doleva: (*Trp93, Thr101, Ser100 tvořící Trp-DNA vazebné místo), Ile107, (Asn108, Arg47, Thr49 tvořící Thr-DNA vazebné místo) a Asn19*. Všechna tato residua jsou lokalizována v oblasti *alfa*-helixů B, C a D stranou od aktivního místa. Spoluvytvářejí žlábek na povrchu enzymu, který je zakončený na jedné straně oblastí zvanou „basic protrusion" (klastr basických residuí), kde se nachází i residua *Thr101, Ser100*). Na straně druhé vazebným místem vázajícím fosfát v tzv. „phosphate binding pocket".



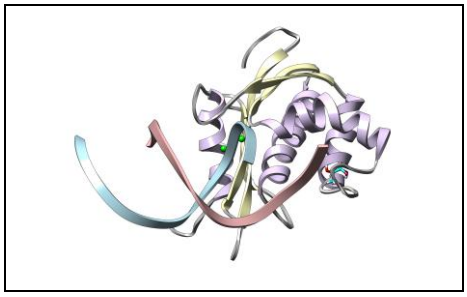
Obrázek 3.4: Residuum Ile107 nacházející se mezi Thr-DNA a Trp-DNA vazebnými místy**.** Ile107 tvoří vodíkové vazby s kyslíky ve fosfátových skupinách v internukleotidových spojkách vlákna DNA.



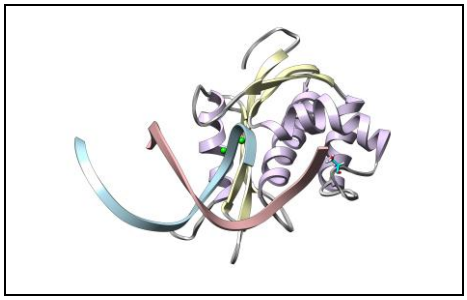
Obrázek 3.5: Trp-DNA vazebné místo tvořené residui v oblasti „basic protrusion“ (šedá smyčka nalevo od fosfátové spojky, kde fosfor je znázorněn oranžovou barvou). Zvýrazněná residua *Trp 93*, *Ser101*, *Thr100* tvoří vodíkové vazby s fosfátovou spojkou. Řetězec DNA je vykreslen jako červená stuha zakončená vazebným fosfátem.



-a-

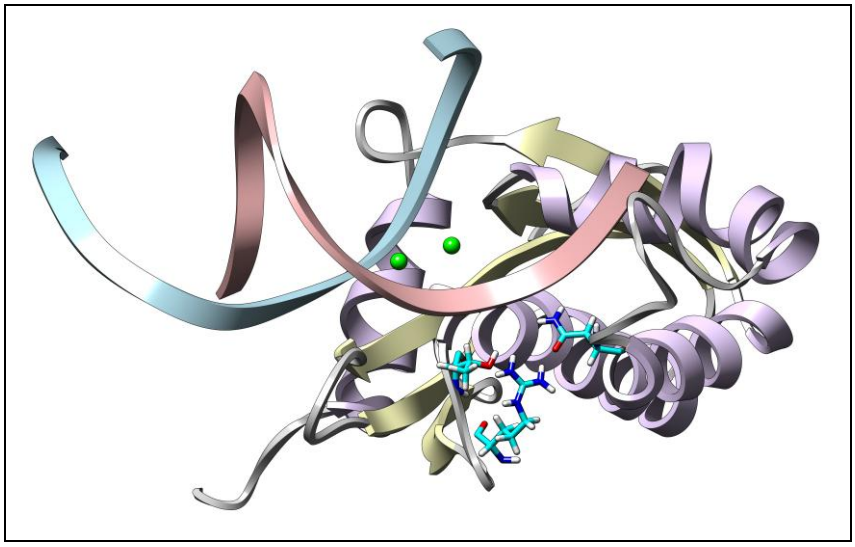


-b-

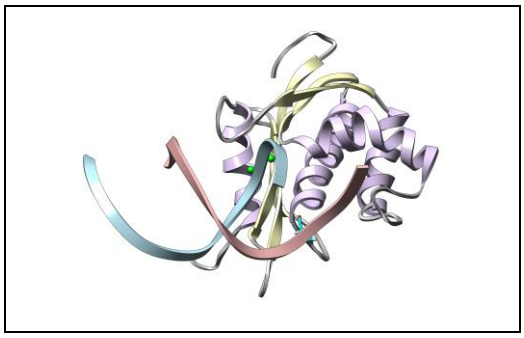


-c-

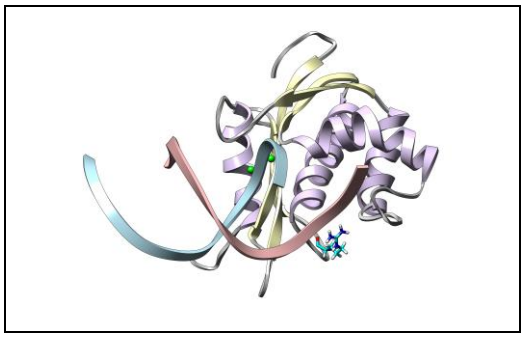
Obrázek 3.6: Vazba RNasy H na DNA: a) Trp93, b) Thr100, c) Ser101.



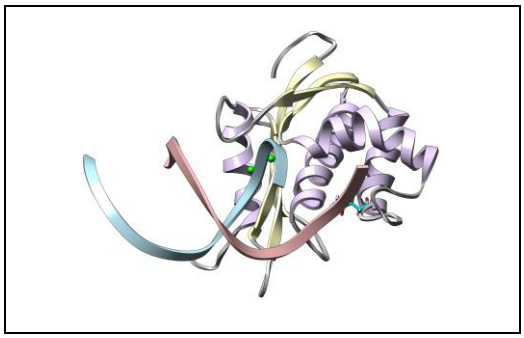
-a-



-b-

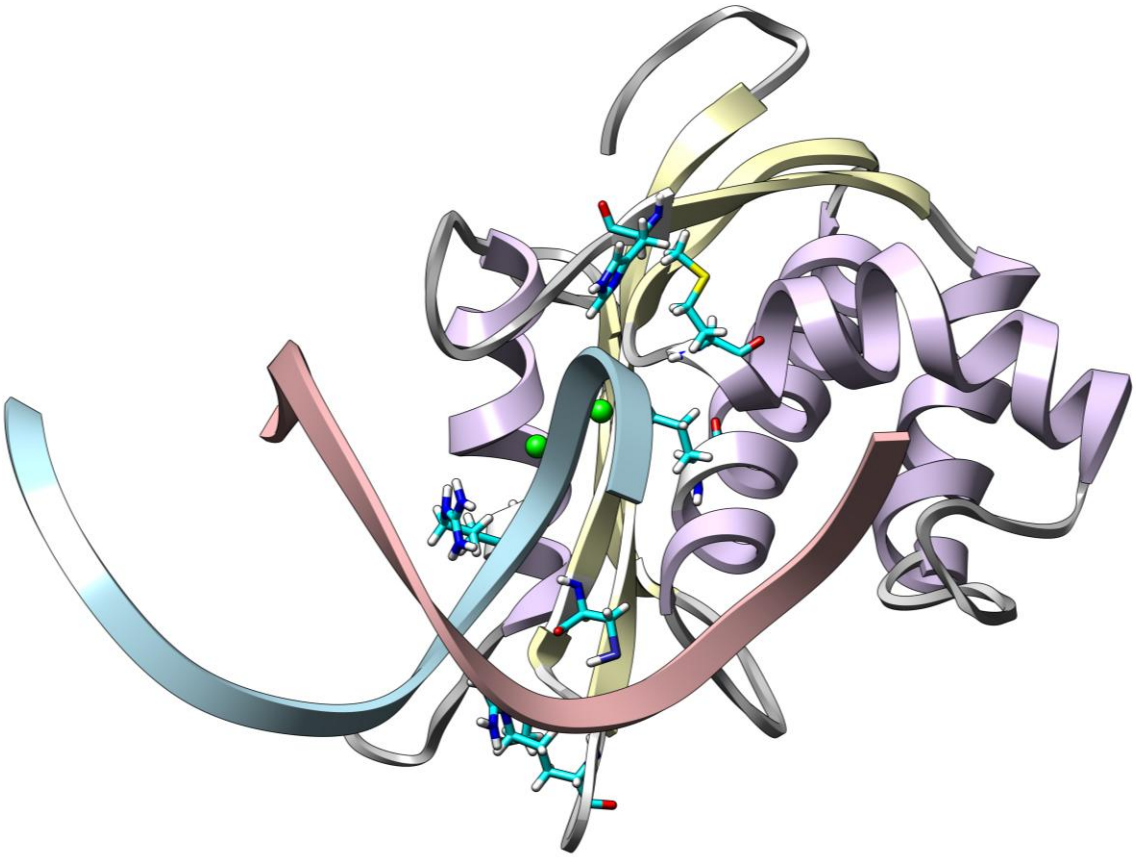


-c-

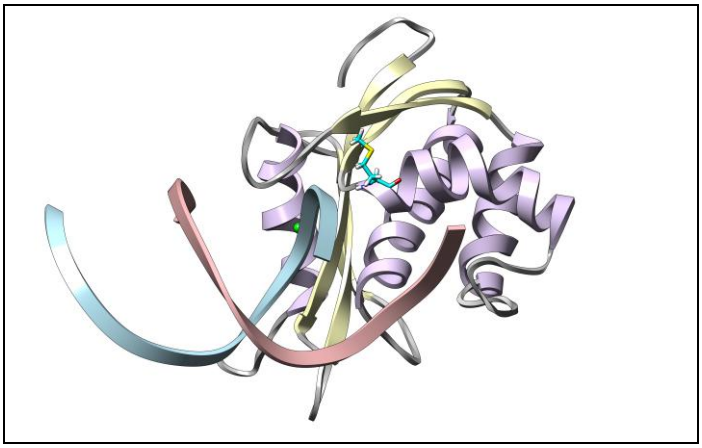


-d-

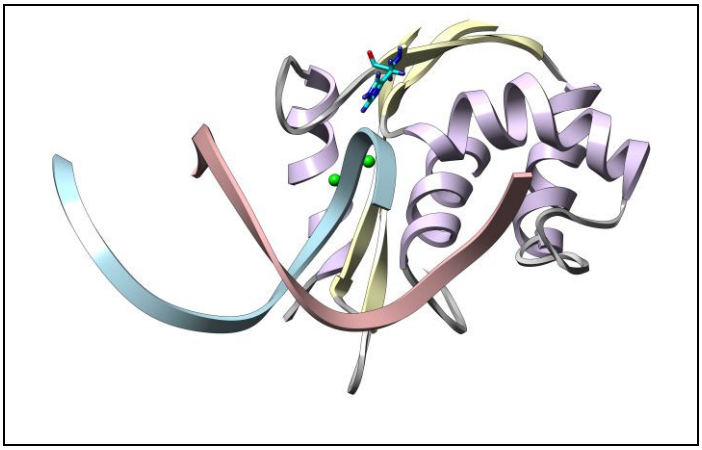
Obrázek 3.7: Thr-DNA vazebné místo (phosphate binding pocket) RNasy H. a) Celkový pohled na residua tvořící vazebné místo - zleva doprava: Thr49, Arg47, Asn108. Detail vazby na b) Thr49, c) Arg47, d) Asn108. DNA řetězec je vykreslen červeně, RNA řetězec modře.



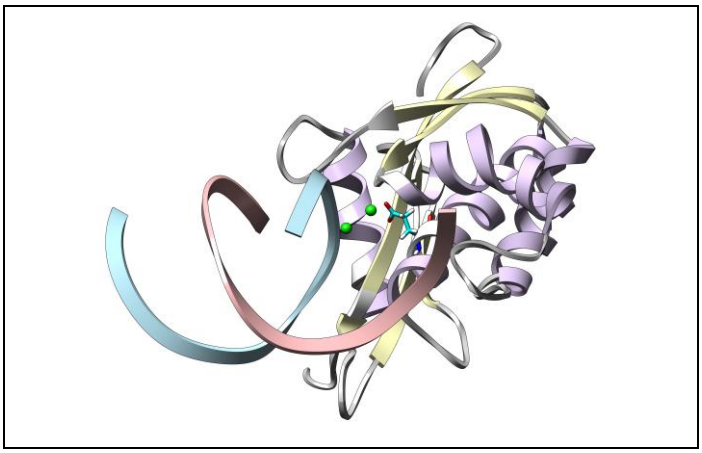
Obrázek 3.8: Vazba RNasy H na RNA řetězec (modrá stuha) z duplexu DNA:RNA**.**



-a-

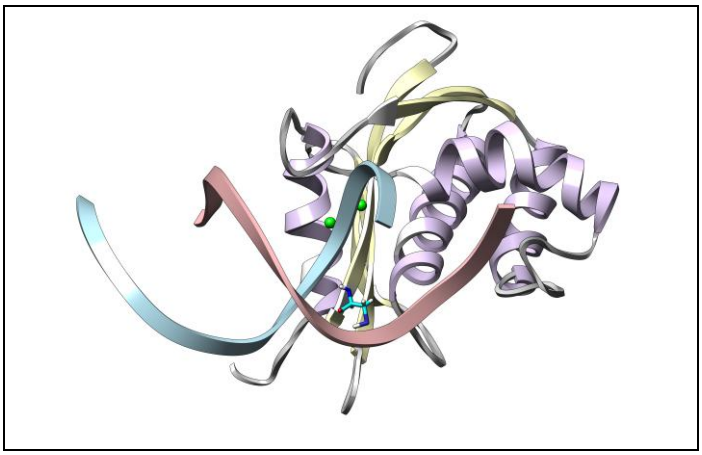


-b-

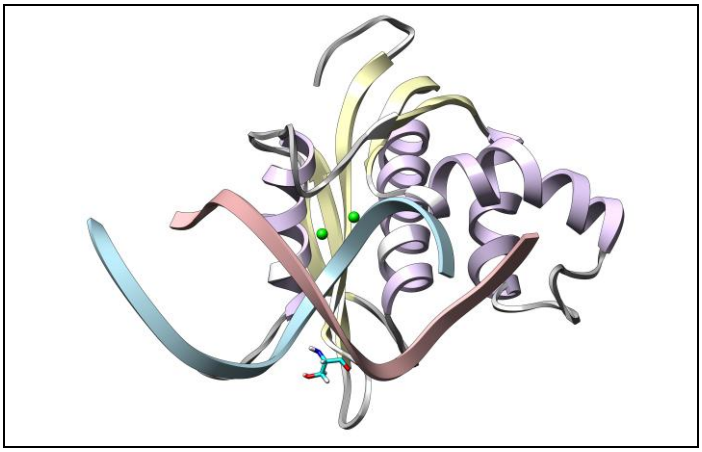


-c-

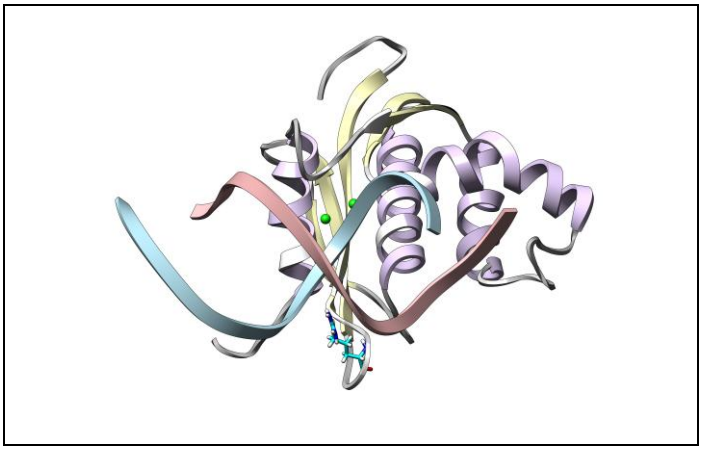
Obrázek 3.9: Vazba RNasy H na RNA řetězec z duplexu DNA:RNA: a) Met80, b) His128, c) Glu54.



-a-



-b-



-c-

Obrázek 3.10: Vazba RNasy H na RNA řetězec z duplexu DNA:RNA: a) Cys16, b) Ser16, c) Arg21.

3.2. Silová pole

3.2.1 Silová pole použitá pro fosfátové spojky

Tzv. „silová pole“ či „forcefieldy“ popisující interakci atomů v klasických molekulárně-dynamických simulacích obsahují poměrně korektní silové konstanty zodpovědné za popis dalekodosahových interakcí. V důsledku toho klasický výpočet poskytuje výsledky v až překvapivě dobrém souladu s kvantově-chemickými výpočty i pro takové jevy, jako je tzv. stacking bazí nukleových kyselin [43]. Jedním z přetrvávajících problémů je však dobrý popis konformačních preferencí páteří biomolekul - nukleových kyselin a proteinů.

U proteinů, přestože zaujímají celou řadu prostorových uspořádání, lze konformace jejich páteře popsat dvěma torzními úhly. Příslušné silové konstanty jsou reparametrizovány takřka kontinuálně (viz. celá řada variant silového pole AMBER z posledních 15 let). K tomu jsou používány kvantově-chemické výpočty se stále většími modelovými systémy (např. tripeptidy). Přesto např. v molekulárně-dynamických simulacích foldingu krátkých peptidů (usimulovatelné jen prostřednictvím nejvýkonějších superpočítačů) se může ukázat, že výsledné prostorové uspořádání neodpovídá nativně se vyskytující konformaci [44].

Ještě problematičtější je situace v případě páteře nukleových kyselin, jenž obsahuje ve srovnaní s proteiny více vazeb a tedy více rotovatelných torzních úhlů. Pro zde prezentované molekulárně-dynamické simulace komplexu enzymu RNase H a přirozené nukleové kyseliny byl inspirací článek [42], kde bylo ukázáno, že současná silová pole popisující nukleové kyseliny obsahují artefakty. V důsledku toho extrémně dlouhé simulace na časové škále desítek až stovek ns vedou k rozpadu prosté dvoušroubovice B-DNA. Internukleotidové spojky přeskakují občas do nestandardních konformací, tyto změny se v čase kumulují a v konečném důsledku vedou k narušení Watson-Crickovského párování bazí. Autoři navrhli reparametrizaci silového pole, která je primárně založena na zvýšení bariéry pro torzní úhel C3’-C4’-C5’-O5’. Autoři připouštějí, že se jedná o poměrně hrubou záplatu. Plně korektní reparametrizace silového ple by si vyžádala řadu kvantově-chemických výpočtů pro modelový systém a následnou modifikaci řady silových konstant. V důsledku toho vyvstává otázka, zda přirozená konformace fosfátové internukleotidové spojky není v důsledku výše zmíněné korekce silového pole „přestabilizována“. To může vést k artefaktům při simulacích komplexů nukleových kyselin a proteinů. V případě komplexů enzymu RNase H a nukleové kyseliny se totiž některé internukleotidové spojky nacházejí v jiných než obvyklých konformacích (zejména se jedná o bezprostřední okolí aktivního místa a kruciální Thr-DNA vazebné místo).

Pro molekulárně-dynamické simulace komplexů enzymu RNase H a nukleové kyseliny s přirozenými fosfátovými spojkami jsem proto použil čtyři varianty silového pole odvozeného od [38] (viz. tabulka 3.1):

1) Silové pole **FF1** [38], které v základní variantě způsobuje na velmi dlouhých časových škálách - desítky až stovky ns - přechody fosfodiesterových internukleotidových spojek do jiné než přirozené konformace.

2) Silové pole **FF2** [38] se sníženou bariérou pro rotaci torzních úhlů ve fosfodiesterové spojce. Což bylo motivováno tím, že v práci [42] byly nasimulovány extrémně dlouhé trajektorie pomocí zcela ojedinělého hardwaru (superpočítač MareNostrum v Barceloně). Tato verze silového pole měla proto zvýraznit případné artefakty tak, aby se projevily rychleji – do 10 ns nasimulovatelných pomocí mně dostupné výpočetní techniky (počítač Coupled Clusters na Katedře chemické fyziky MFF UK a výpočetní technika v univerzitním MetaCentru).

3) Silové pole **FF3** [42] se zvýšenou bariérou pro torzní úhel C3'-C4'-C5'-O5'.

4) Silové pole **FF4** modifikující silové pole [38] tak, aby byla znevýhodněna – **gauche/gauche** konformace (tj. cca. -60/60 deg. u torzních úhlů C3'-O3'-P-O5' a O3'-P-O5'-C5') u přirozené internukleotidové spojky. Energie této konformace byla totiž podhodnocena, což přispívá k artefaktům pozorovaným v [42].

3.2.2 Silové pole pro modifikovanou fosfonátovou spojku

V případě chemicky modifikované internukleotidové spojky jsem napočítal ab initio energie (prostřednictvím softwarového balíku Gaussian 03 a metody MP2/6-31G*) pro 27 konformerů modelového systému CH3-O-PO2-CH2-O-CH3. Jejich srovnání s relativními energiemi získanými pomocí molekulárně-mechanického výpočtu pro stejný modelový systém ukázalo (viz. tabulka 3.2, kde jsou pro přehlednost vynechány symetrické konformery se stejnou energií), že silové pole použité v předchozích molekulárně-dynamických simulacích [24] dávalo shodu do 1 kcal/mol v případě pouze poloviny konformerů. V případě molekulárně mechanického výpočtu, kdy byly použity nulové silové konstanty příslušející torzním úhlům, vyplynulo, že rozpor s kvantově-chemickým výpočtem nastává u konformerů 7, 9, 10, 11 a 14. Tyto konformery měly přitom torzní úhel COPC v poloze trans. Z toho vyplynula úprava silových konstant, kterou jsem dosáhnul toho, že s výjimkou konformeru 9 poskytuje zde použité silové pole relativní energie s přesností do 1 kcal/mol (viz. tabulka 3.2).

FF1) Silové pole [38]

FF2) Silové pole [38] s redukovanou bariérou u *-O-P-* torze

```
< X -OS-P -X    3      0.75       0.0              3.         original
> X -OS-P -X    3      0.00       0.0              3.         bartek
```

FF3) Silové pole [42] s bariérou u torzního uhlu C3'-C4'-C5'-O5'

```
> CT-CT-CI-OS   1      1.178    190.977           -1.0        gamma
> CT-CT-CI-OS   1      0.092    295.633           -2.0        gamma
> CT-CT-CI-OS   1      0.963    348.095            3.0        gamma
```

FF4) Silové pole [38] s penalizovanou konformací -gg u fosfátové internukleotidové spojky

```
< CT-OS-P           100.0      120.50                        original
> CT-OS-P           100.0      112.50                        bartek

< OS-P -OS-CT   1     0.25       0.0             -3.         original
< OS-P -OS-CT   1     1.20       0.0              2.         original

> OS-P -OS-CT   1    -0.25       0.0             -3.         bartek
> OS-P -OS-CT   1     1.80     180.0              1.         bartek
```

FF5) Silové pole [38] s doplněnou parametrizací pro modifikovanou fosfonátovou spojku

```
> CT-P              186.0        1.846                       bartek
> OS-P -CT           45.0      102.60                        bartek

> P -CT-HC           50.0      110.00                        bartek
> P -CT-OS           50.0      110.00                        bartek
> O2-P -CT          100.0      108.23                        bartek
> HC-CT-OS           50.0      110.00                        bartek

> X -CT-P -X    3     1.20       0.0              3.         bartek
> CT-P -OS-CT   1     1.00     180.0              1.         bartek
```

Tabulka 3.1: Silová pole použitá pro jednotlivé molekulárně dynamické simulace. Přehled modifikací provedených v silovém poli FF1 [38].

	MP2_abs. (a.u.)	**MP2_rel.** (a.u.)	**MP2_rel.** (kcal/mol)	**FF_old** (kcal/mol)	**FF_zero** (kcal/mol)	**FF_5** (kcal/mol)
K_01 ggg	-759.72638	0.00203	1.27	1.08	-0.16	0.60
K_02 ggmg	-759.72513	0.00328	2.06	2.04	2.39	2.73
K_03 gmgg	-759.72282	0.00559	3.51	2.46	2.89	3.85
K_04 mggg	**-759.72841**	**0.00000**	**0.00**	**0.00**	**0.00**	**0.00**
K_05 ggt	-759.72060	0.00781	4.90	4.42	2.59	4.12
K_06 gtg	-759.72459	0.00382	2.40	0.15	2.19	2.39
K_07 tgg	-759.72684	0.00157	0.99	0.00	-0.47	1.24
K_08 gtt	-759.71955	0.00886	5.56	3.51	5.49	5.75
K_09 tgt	-759.70730	0.02111	13.25	2.71	2.55	4.27
K_10 ttg	-759.72486	0.00355	2.23	0.15	0.39	1.84
K_11 ttt	-759.71949	0.00892	5.60	3.53	3.64	5.09
K_12 gmgt	-759.72308	0.00533	3.35	2.71	2.52	2.75
K_13 gtmg	-759.72465	0.00376	2.36	-0.06	1.91	2.16
K_14 tgmg	-759.72550	0.00291	1.83	3.70	0.64	2.36

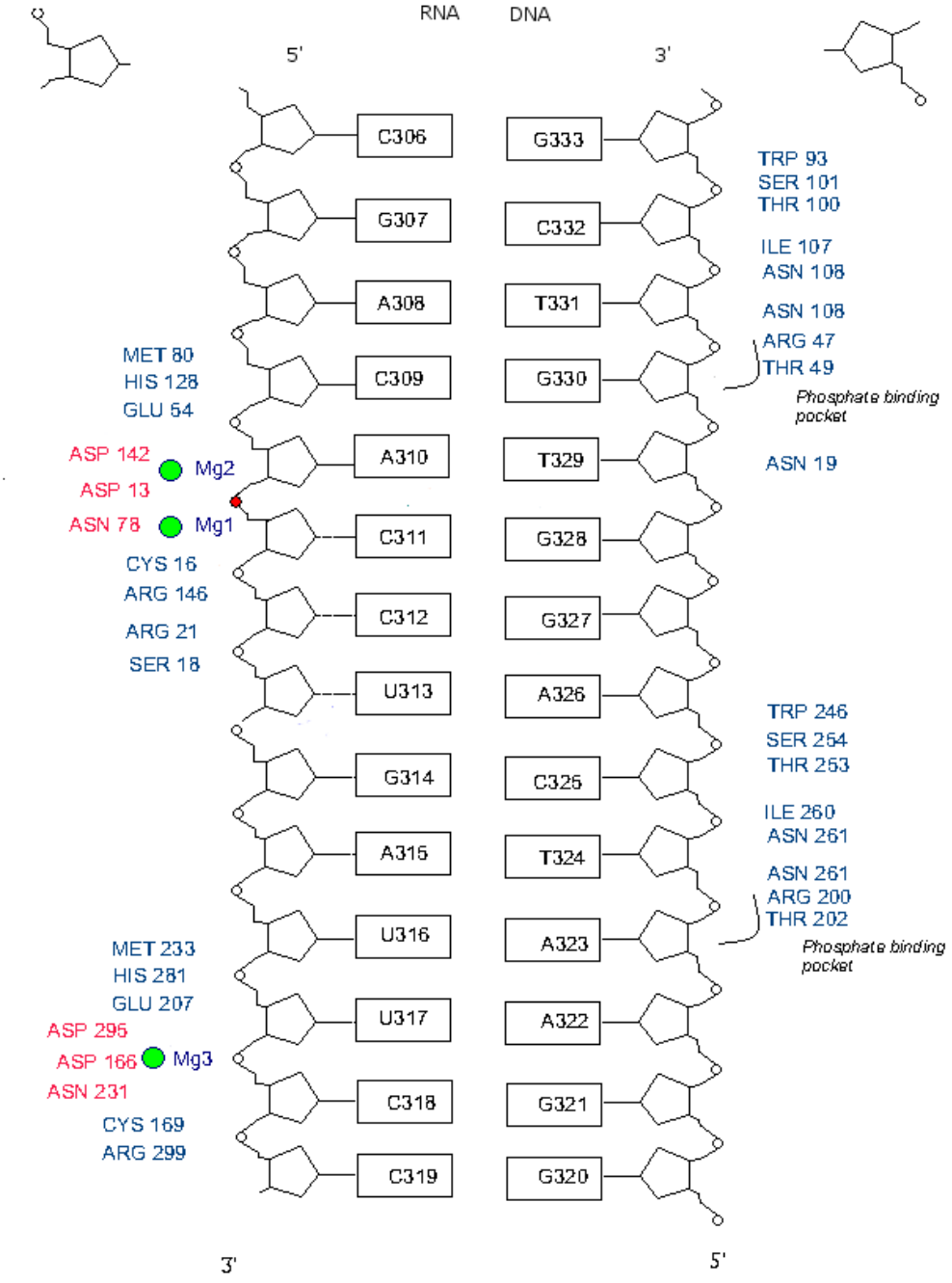
FF_zero

> X -CT-P -X	3	**0.00**	0.0	3.	bartek
> CT-P -OS-CT	1	**0.00**	0.0	1.	bartek

FF_5

> X -CT-P -X	3	**1.20**	0.0	3.	bartek
> CT-P -OS-CT	1	**1.00**	180.0	1.	bartek

Tabulka 3.2: Parametrizace silového pole FF5 použitého pro molekulárně-dynamické simulace s modifikovanou fosfonátovou spojkou. Srovnání relativních energií jednotlivých konformerů modelového systému CH3-O-PO2-CH2-O-CH3 vypočtených ab initio (MP2) a s různými verzemi silového pole (FF_old – stará parametrizace [24], FF_zero – vynulované silové konstanty pro torzní úhly, FF_5 – nová parametrizace použitá v MD simulacích 8,9 v této diplomové práci).



Obrázek 3.11: Diagram vazeb mezi duplexem RNA:DNA a RNasou H. Model se dvěma jednotkami RNasy H - simulace 1, 2, 3.

3.3 MD_1: 2x RNase H + $(dN.rN)_{14}$ / FF2

a) Simulovaný systém: sestával ze dvou kopií enzymu RNase H (obr. 3.11), na něž byla navázána jedna dvoušrobovice DNA:RNA o délce 14 párů bazí - r(CGACACCUGAUUCC) .d(GCTGTGGACTAAGG). V aktivním místě prvního enzymu RNase H se nacházely dva hořčíkové ionty a v aktivním místě druhého enzymu RNase H jeden hořčíkový iont. Obě vlákna nukleové kyseliny byla přirozená, nenesla chemické modifikace. Po zahrnutí vodní obálky do simulovaného systému sestával tento z 53832 atomů. Délka výsledné molekulárně-dynamické simulace byla 10 ns.

b) Silové pole: V molekulárně-dynamické simulaci MD_1 bylo použito silové pole FF2 [38] s redukovanou silovou konstantou pro *-O-P-* torzní úhel (* značí libovolný atom) (viz. tabulka 3.1). Cílem této redukce bylo snížit energetické bariéry oddělující jednotlivé konformery přirozené fosfodiesterové spojky. V důsledku toho byla zvýšena pravděpodobnost pozorovat případné artefakty v konformačních preferencích internukleotidových spojek na časových škálách do 10 ns. Otázkou bylo mimo jiné to, zda výskyt takových artefaktů bude díky interakci s enzymem významně zvýšen.

c) Internukleotidové spojky (viz. graf A1) v celé řadě případů preferovaly jinou než přirozenou -g-g konformaci (tj. konformace -gauche u torzních úhlů C3'-O3'-P-O5' a O3'-P-O5'-C5'). U RNA vlákna se jednalo o residua R307, R309, R310, R311, R312, R316 a R318. Tedy o internukleotidové spojky situované v místech poblíž aktivních míst obou kopií enzymu RNase H. V případě DNA vlákna se jednalo o residua D332, D330, D328, D327, D323, D322, D321. Tedy o internukleotidové spojky nacházející se poblíž DNA vazebných a aktivních míst.

d) Watson-Crickovské párování bazí (viz. graf B1) v hybridním duplexu DNA.RNA bylo významně narušeno pouze v terminálním páru bazí R306-D333. Určitá destabilizace některé z vodíkových vazeb byla pozorována též v páru bazí R308-D331 (poblíž vazebného místa pro DNA s residuem Thr49) a R312.D327 (v části nukleové kyseliny nacházející se mezi oběma kopiemi enzymu RNase H).

e) Sugar Puckering (viz. graf C1) v RNA vlákně vykazoval atypické chování (tj. preference konformace C2'-endo namísto C3'-endo) pouze u terminálního residua R306 tvořícího Watson-Crickovský pár s D333 (u nichž bylo pozorováno narušení vodíkových vazeb). Dále byl atypický sugar puckering pozorován u druhého terminálního residua R319. Naproti tomu v DNA vlákně bylo narušení sugar-puckeringu pozorováno spíše u vnitřních residuí (v tomto případě šlo o realizaci konformace C3'-endo namísto obvyklé konformace C2'-endo). Jednalo se o residua D332 a D331 ležící mezi vazebnými místy pro DNA s residui Trp93 a Thr49 (resp. o

residua D325 a D324 nacházející se mezi vazebnými místy pro DNA s residui Trp246 a Thr202).

f) Interakce DNA-RNase H (viz. graf D1) se realizovala zejména ve čtyřech vazebných místech (ve dvou u každé kopie enzymu RNase H). U první/druhé kopie enzymu RNase H se na stabilizaci podílela v prvním vazebném místě zejména residua Trp93, Ser101/Trp246, Thr253, Ser254 a residuum Thr49/Thr202 ve druhém vazebném místě. V tomto vazebném místě byla též velmi významná interakce s residui Arg47, Asn108/Arg200, Asn261. Tyto interakce v grafech nepůsobí na první pohled tak stabilně ve srovnání s residui zmíněnými výše. Je to způsobené tím, že residua Asn108/Asn261 v průběhu molekulárně-dynamické simulace střídavě interagovala se dvěmi sousedními internukleotidovými spojkami. Argininová residua pak mohou interagovat pomocí celkem pěti vodíkových atomů se čtyřmi kyslíkovými atomy ve fosfátové skupině. Z dvaceti možných způsobů interakce jsou přitom v grafech zachyceny pouze dva. Z nich je zřejmé, že původní způsob interakce residua Arg47 s DNA vláknem se obnoví zhruba v polovině simulace a pak již zůstane stabilní.

g) Interakce RNA-RNase H (viz. graf E1) se odehrává především v oblasti aktivního místa. Kromě toho v případě první kopie enzymu RNase H byla zaznamenána významná interakce s residui His128, Glu54, Cys16, Arg146. V případě druhé kopie enzymu RNase H (s pouze jedním hořčíkovým iontem v aktivním místě) byla interakce s RNA vláknem chudší. Stabilní vodíková vazba byla pozorována pouze v případě residua Met233.

h) Interakce v aktivním místě (viz. graf F1) byly podrobně sledovány pouze v aktivním místě se dvěma hořčíkovými ionty. Je zřejmé, že geometrie aktivního místa byla po větší část simulace narušena, nakonec se však obnovilo původní uspořádání. Načasování konformačních přechodů v aktivním místě koreluje s konformačním přechodem internukleotidové spojky R310. Jakmile tato internukleotidová spojka opustila přirozenou konformaci -g-g, byla narušena interakce fosfátové skupiny s ionty a též interakce s residuem Glu54. V tomto případě nemělo u větší části trajektorie smysl zabývat se hledáním molekuly vody, která by mohla potenciálně atakovat fosfátovou skupinu, neboť štípaná fosfodiesterová spojka R310 nebyla díky výše zmíněné konformační změně orientována tak, aby vazba C3'-O3' mohla být efektivně atakována. Nicméně na počátku a na konci simulace, kdy byla geometrie aktivního místa správná, se na pozici atakující molekuly vystřídalo relativně velké množství molekul vody:

```
WAT    351      0-1.75 ns
WAT   8167   1.75-2.25 ns
WAT  15685   2.25-2.75 ns
WAT   3683   2.50-2.75 ns
WAT   2967   7.59-8.75 ns
WAT  10539   8.11-9.2  ns
WAT  11176   9.27-9.98 ns
```

3.4 MD_2: 2x RNase H + $(dN.rN)_{14}$ / FF3

a) Simulovaný systém: sestával ze dvou kopií enzymu RNase H (obr. 3.11), na něž byla navázána jedna dvoušrobovice DNA:RNA o délce 14 párů bazí - r(CGACACCUGAUUCC) .d(GCTGTGGACTAAGG). V aktivním místě prvního enzymu RNase H se nacházely dva hořčíkové ionty a v aktivním místě druhého enzymu RNase H jeden hořčíkový iont. Obě vlákna nukleové kyseliny byla přirozená, nenesla chemické modifikace. Po zahrnutí vodní obálky do simulovaného systému sestával tento z 53832 atomů. Délka výsledné molekulárně-dynamické simulace byla 10 ns.

b) Silové pole: V molekulárně-dynamické simulaci MD_2 bylo použito silové pole [42] s modifikovanými silovými konstantami, zejména se zvýšenou energetickou bariérou pro torzní úhel C3‘-C4‘-C5‘-O5‘ (viz. tabulka 3.1). Cílem této modifikace bylo stabilizovat přirozenou konformaci internukleotidové spojky tak, aby při velmi dlouhých simulacích nedocházelo k přechodům internukleotidových spojek do konformací, jež v případě nakumulování mohou vést i k destabilizaci dvoušroubovicovité struktury. Otázkou bylo mimo jiné to, zda internukleotidové spojky nebudou v důsledku výše zmíněné modifikace „přestabilizované“. Tj. zda nedojde k přechodům do přirozených -g-g konformací i u internukleotidových spojek, kde v důsledku interakce s enzymem se v krystalové struktuře realizovala jiná než obligátní -g-g konformace (tj. konformace -gauche u torzních úhlů C3’-O3’-P-O5’ a O3’-P-O5’-C5’).

c) Internukleotidové spojky (viz. graf A2) preferovaly jinou než přirozenou -g-g konformaci pouze zřídka (ve srovnání s předchozí simulací MD_1). V případě RNA vlákna se jednalo o residua R309 a R311. Tedy o internukleotidové spojky situované v místech poblíž aktivního místa enzymu RNase H se dvěma atomy hořčíku. V případě DNA vlákna se jednalo o residua D330 a D323, D322, D321. Tedy o internukleotidové spojky nacházející se poblíž DNA vazebných míst s residui Thr49/Thr202.

d) Watson-Crickovské párování bazí (viz. graf B2): V hybridním duplexu DNA.RNA byly do jisté míry destabilizovány některé z vodíkových vazeb v párech bazí R308-D331 (poblíž vazebného místa pro DNA s residuem Thr49) a R311.D328, R312.D327 (v části nukleové kyseliny nacházející se mezi oběma kopiemi enzymu RNase H).

e) Sugar Puckering (viz. graf C2) v RNA vlákně vykazoval atypické chování (tj. preference konformace C2’-endo namísto C3’-endo) pouze u terminálního residua R319. Naproti tomu v DNA vlákně bylo narušení sugar-puckeringu pozorováno spíše u vnitřních residuí (v tomto případě šlo o realizaci konformace C3‘-endo namísto obvyklé konformace C2’-endo). Jednalo se o residua D332 a D331 ležící mezi vazebnými místy

pro DNA s residui Trp93 a Thr49 (resp. o residua D325 a D324 nacházející se mezi vazebnými místy pro DNA s residui Trp246 a Thr202). Tedy o residua identická s těmi, u nichž bylo narušení sugar puckeringu pozorováno i v předchozí molekulárně-dynamické simulaci MD_1.

f) Interakce DNA-RNase H (viz. graf D2) se realizovala zejména ve čtyřech vazebných místech (ve dvou u každé kopie enzymu RNase H). U první/druhé kopie enzymu RNase H se na stabilizaci podílela v prvním vazebném místě zejména residua Trp93, Thr100, Ser101/Trp246, Thr253 a residuum Thr49, Asn19/Thr202 ve druhém vazebném místě. V tomto vazebném místě byla též velmi významná interakce s residui Arg47, Asn108/Arg200, Asn261. Tyto interakce v grafech nepůsobí na první pohled tak stabilně ve srovnání s residui zmíněnými výše. Je to způsobené tím, že residua Asn108/Asn261 v průběhu molekulárně-dynamické simulace střídavě interagovala se dvěmi sousedními internukleotidovými spojkami. Argininová residua pak mohou interagovat pomocí celkem pěti různých vodíkových atomů se čtyřmi kyslíkovými atomy ve fosfátové skupině. Z dvaceti možných vodíkových vazeb jsou přitom v grafech zachyceny pouze dvě. Z nich je patrné, že s výjimkou prvních dvou ns je původní interakce residua Arg47 s DNA vláknem stabilní, v případě residua Arg200 to platí pouze o první polovině simulace.

g) Interakce RNA-RNase H (viz. graf E2) se odehrává především v oblasti aktivního místa. Kromě toho v případě první kopie enzymu RNase H byla zaznamenána významná interakce s residui Met80, Glu54, Ser18. V případě druhé kopie enzymu RNase H (s pouze jedním hořčíkovým atomem v aktivním místě) byla interakce s RNA vláknem chudší, stabilní vodíková vazba byla pozorována pouze v případě residua Met233.

h) Interakce v aktivním místě (viz. graf F2) byly podrobně sledovány pouze v aktivním místě se dvěma hořčíkovými ionty. Je zřejmé, že geometrie aktivního místa byla po celou dobu simulace stabilní. V pozici umožňující efektivní atak vazby C3'-O3' se opět vystřídalo relativně volké množství molekul vody:

```
WAT 351        0-3.7  ns
WAT 10399   3.71-3.88 ns
WAT 9087    3.88-5.19 ns
WAT 14896   5.43-9.56 ns
WAT 16270   9.66-9.72 ns
WAT 748     9.78-9.98 ns
```

3.5 MD_3: 2x RNase H + $(dN.rN)_{14}$ / FF4

a) Simulovaný systém: sestával ze dvou kopií enzymu RNase H (obr. 3.11), na něž byla navázána jedna dvoušrobovice DNA:RNA o délce 14 párů bazí - r(CGACACCUGAUUCC) .d(GCTGTGGACTAAGG). V aktivním místě prvního enzymu RNase H se nacházely dva hořčíkové ionty a v aktivním místě druhého enzymu RNase H jeden hořčíkový iont. Obě vlákna nukleové kyseliny byla přirozená, nenesla chemické modifikace. Po zahrnutí vodní obálky do simulovaného systému sestával tento z 53832 atomů. Délka výsledné molekulárně-dynamické simulace byla 8 ns.

b) Silové pole: V molekulárně-dynamické simulaci MD_3 bylo použito silové pole FF4 [38] s modifikovanými silovými konstantami pro úhel CT-OS-P a torzní úhel OS-P - OS-CT (viz. tabulka 3.1). Cílem této modifikace silového pole bylo penalizovat atypickou konformaci iternukleotidové spojky -gg a v konečném důsledku stabilizovat konformaci přirozenou. Tj. dosáhnout jinými prostředky než v silovém poli FF3 [42] toho, aby při velmi dlouhých simulacích nedocházelo k přechodům internukleotidových spojek do konformací, jež v případě nakumulování mohou vést i k destabilizaci dvoušroubovicovité struktury. Otázkou bylo opět to, zda internukleotidové spojky nebudou v důsledku výše zmíněné modifikace silového pole „přestabilizované“. Tj. zda nedojde k přechodům do přirozených -g-g konformací i u internukleotidových spojek, kde v důsledku interakce s enzymem se v krystalové struktuře realizovala jiná než obligátní -g-g konformace.

c) Internukleotidové spojky (viz. graf A3) preferovaly jinou než přirozenou -g-g konformaci pouze zřídka (ve srovnání se simulací MD_1). Atypické konformační preference byly téměř shodné s předchozí simulací MD_2. V případě RNA vlákna se jednalo o residua R309 a R311. Tedy o internukleotidové spojky situované poblíž aktivního místa enzymu RNase H se dvěma atomy hořčíku. V případě DNA vlákna se jednalo o residua D332, D330 a D323, D322, D321. Tedy o internukleotidové spojky nacházející se poblíž DNA vazebných míst s residui Thr49/Thr202.

d) Watson-Crickovské párování bazí (viz. graf B3): V hybridním duplexu DNA.RNA byly do jisté míry destabilizovány některé z vodíkových vazeb v párech bazí R308-D331 (poblíž vazebného místa pro DNA s residuem Thr49) a R311.D328, R312.D327 (v části nukleové kyseliny nacházející se mezi oběma kopiemi enzymu RNase H).

e) Sugar Puckering (viz. graf C3) v RNA vlákně vykazoval atypické chování (tj. preference konformace C2’-endo namísto C3’-endo) pouze u terminálního residua R319. Naproti tomu v DNA vlákně bylo narušení sugar-puckeringu pozorováno spíše u vnitřních residuí (v tomto případě šlo o realizaci konformace C3‘-endo namísto obvyklé konformace C2’-endo). Jednalo se o residua D332 a D331 ležící mezi vazebnými místy

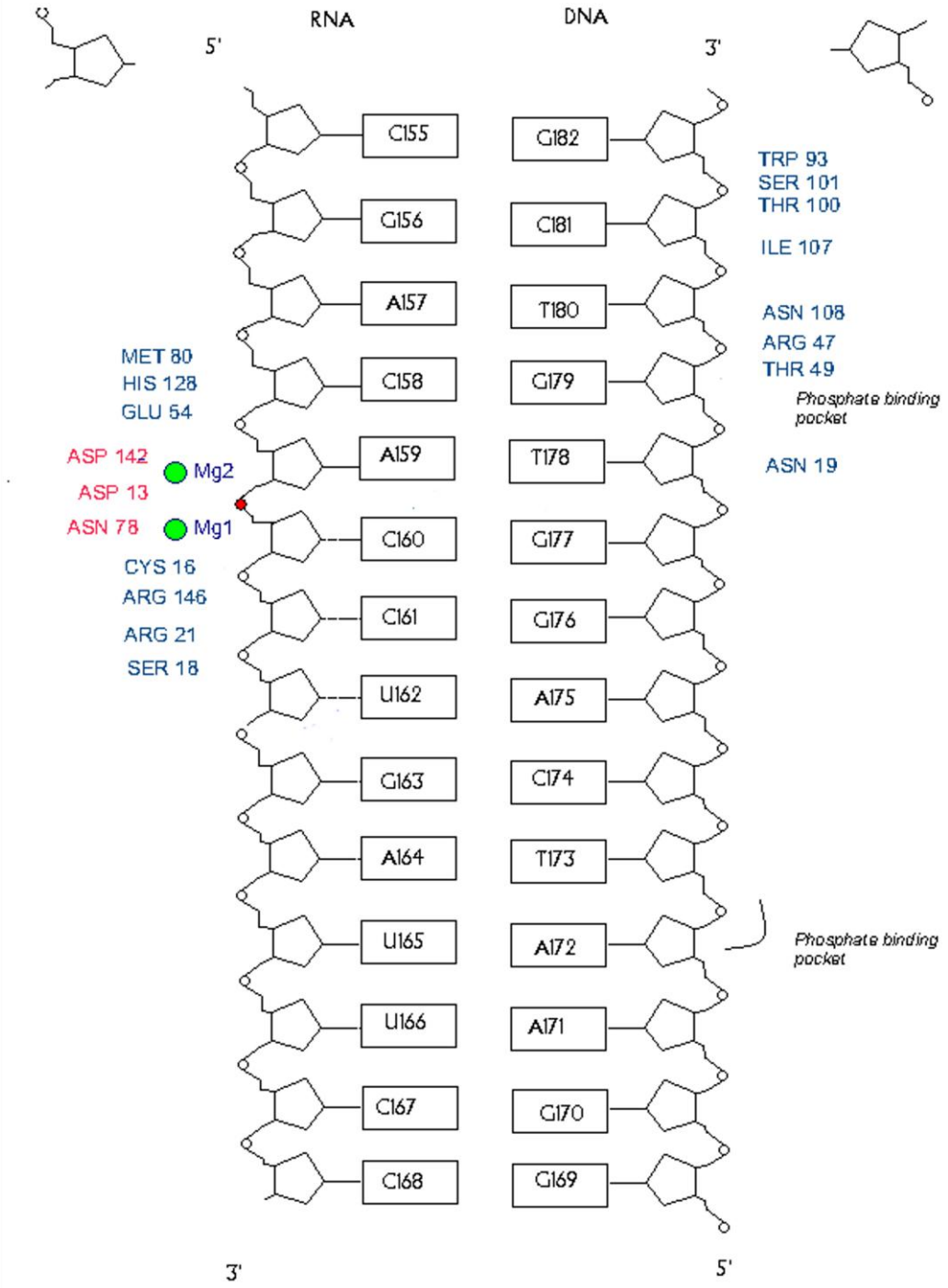
pro DNA s residui Trp93 a Thr49 (resp. o residua D325 a D324 nacházející se mezi vazebnými místy pro DNA s residui Trp246 a Thr202). Tedy o residua identická s těmi, u nichž bylo narušení sugar puckeringu pozorováno i v předchozích molekulárně-dynamických simulacích MD_1 a MD_2.

f) Interakce DNA-RNase H (viz. graf D3) se realizovala zejména ve čtyřech vazebných místech (ve dvou u každé kopie enzymu RNase H). U první/druhé kopie enzymu RNase H se na stabilizaci podílela v prvním vazebném místě zejména residua Trp93, Ser101/Trp246, Ser254, Ile260 a residuum Thr49, Asn19 ve druhém vazebném místě. Zcela ojediněle se na stabilizaci tentokrát nepodílelo residuum Thr202. V tomto vazebném místě byla též velmi významná interakce s residui Arg47, Asn108/Arg200, Asn261. Tyto interakce v grafech nepůsobí na první pohled tak stabilně ve srovnání s residui zmíněnými výše. Je to způsobené tím, že residua Asn108/Asn261 v průběhu molekulárně-dynamické simulace střídavě interagovala se dvěmi sousedními internukleotidovými spojkami. Argininová residua pak mohou interagovat pomocí celkem pěti různých vodíkových atomů se čtyřmi kyslíkovými atomy ve fosfátové skupině. Z dvaceti možných způsobů interakce jsou přitom v grafech zachyceny pouze dva. Z nich je patrné, že s výjimkou prvních 3 ns je původní interakce residua Arg47 s DNA vláknem stabilní, v případě residua Arg200 se způsob interakce mění po celou dobu simulace.

g) Interakce RNA-RNase H (viz. graf E3) se odehrává především v oblasti aktivního místa. Kromě toho v případě první kopie enzymu RNase H byla zaznamenána významná interakce s residuem Glu54. V případě druhé kopie enzymu RNase H (s pouze jedním hořčíkovým atomem v aktivním místě) byla interakce s RNA vláknem chudší. Stabilní vodíková vazba byla pozorována pouze v případě residua Met233 a Cys169.

h) Interakce v aktivním místě (viz. graf F3) byly podrobně sledovány pouze v aktivním místě se dvěma hořčíkovými ionty. Je zřejmé, že geometrie aktivního místa byla po celou dobu simulace narušena, ačkoliv se internukleotidová spojka R310 nacházela v přirozené konformaci -g-g. Nicméně hořčíkový iont B se brzy po začátku simulace posunul o cca. 1A. Přesto se v blízkosti atomu fosforu na pozici umožňující atak štípané fosfodiesterové spojky prostřídalo během simulace několik molekul vody:

```
WAT 7935    0.75-0.84 ns a  1.2-1.97  ns
WAT 5277    0.95-1.22 ns
WAT 14296   2.57-3.41 ns
WAT 2155    3.25-4.35 ns a  5.42-5.82 ns
WAT 12306    6.0-6.67 ns
WAT 13833    7.3-7.98 ns
WAT 7333    7.30-7.4  ns
```



Obrázek 3.12: Diagram vazeb mezi duplexem RNA:DNA a RNasou H. Model s jednou jednotkou RNasy H - simulace 4, 5, 6 , 7.

3.6 MD_4: 1x RNase H + $(dN.rN)_{14}$ / FF4

a) Simulovaný systém: V molekulárně-dynamické simulaci MD_4 sestával simulovaný systém (obr. 3.12) z jedné kopie enzymu RNase H, na níž byla navázána jedna dvoušrobovice DNA:RNA o délce 14 párů bazí - r(CGACACCUGAUUCC) .d(GCTGTGGACTAAGG). V aktivním místě enzymu RNase H se nacházely dva hořčíkové ionty. Obě vlákna nukleové kyseliny byla přirozená, nenesla chemické modifikace. Po zahrnutí vodní obálky do simulovaného systému sestával tento z 34189 atomů. Délka výsledné molekulárně-dynamické simulace byla 5 ns.

b) Silové pole: V molekulárně-dynamické simulaci MD_4 bylo použito silové pole FF4 [38] s modifikovanými silovými konstantami pro úhel CT-OS-P a torzní úhel OS-P - OS-CT (viz. tabulka 3.1). Cílem této modifikace silového pole bylo penalizovat atypickou konformaci iternukleotidové spojky -gg a v konečném důsledku stabilizovat konformaci přirozenou. Tj. dosáhnout jinými prostředky než v silovém poli [42] toho, aby při velmi dlouhých simulacích nedocházelo k přechodům internukleotidových spojek do konformací, jež v případě nakumulování mohou vést i k destabilizaci dvoušroubovicovité struktury. Otázkou bylo opět to, zda internukleotidové spojky nebudou v důsledku výše zmíněné modifikace „přestabilizované“. Tj. zda nedojde k přechodům do přirozených -g-g konformací i u internukleotidových spojek, kde v důsledku interakce s enzymem se v krystalové struktuře realizovala jiná než obligátní -g-g konformace.

c) Internukleotidové spojky (viz. graf A4) preferovaly jinou než přirozenou -g-g konformaci pouze ojediněle (ve srovnání se simulací MD_6), nicméně alespoň v RNA vlákně častěji než v předchozích simulacích se dvěma jednotkami enzymu RNase H. V případě RNA vlákna se jednalo o residua R157, R158, R160, R163 a R167. Tedy o internukleotidové spojky situované v místech interakce s enzymem RNase H. V případě DNA vlákna se jednalo o residua D179, D175 a D170. Residuum D179 je situované ve vazebném místě s Thr49. Na této pozici (obdoba D330 z předchozích simulací) došlo ke změně konformace internukleotidové spojky ve všech provedených simulacích. Konformační změna residua D175 je pravděpodobně důsledkem relaxace nukleové kyseliny po odstranění druhé kopie enzymu RNase H. Změněná konformace u residua D170 je naopak pozůstatkem po interakci s odstraněným enzymem. Sousední residua D171, D172 zrelaxovala do přirozených konformací.

d) Watson-Crickovské párování bazí (viz. graf B4): V hybridním duplexu DNA.RNA byly do jisté míry destabilizovány některé z vodíkových vazeb pouze v páru bazí R162-D175 a v terminálním páru residuí R168.D169. Porovnáním s předchozími simulacemi lze dospět k závěru, že odstranění druhé kopie enzymu RNase H uvolnilo jisté napětí v duplexu nukleové kyseliny.

e) Sugar Puckering (viz. graf C4) v RNA vlákně vykazoval atypické chování (tj. preference konformace C2'-endo namísto C3'-endo) pouze u terminálního residua R168. Naproti tomu v DNA vlákně bylo narušení sugar-puckeringu pozorováno spíše u vnitřních residuí (v tomto případě šlo o realizaci konformace C3'-endo namísto obvyklé konformace C2'-endo). Jednalo se o residua D181 a D180 ležící mezi vazebnými místy pro DNA s residui Trp93 a Thr49. Tedy o residua identická s těmi, u nichž bylo narušení sugar puckeringu pozorováno i v předchozích molekulárně-dynamických simulacích. Za pozornost stojí, že ve zbytku nukleové kyseliny relaxovaly deoxyribosy (zejména D174 a D173) do přirozených konformací.

f) Interakce DNA-RNase H (viz. graf D4) se realizovala zejména ve dvou vazebných místech. Na stabilizaci se podílela v prvním vazebném místě zejména residua Trp93, Ser101, Ile107 a residuum Thr49 ve druhém vazebném místě. V tomto vazebném místě byla též velmi významná interakce s residui Arg47, Asn108. Residuum Asn108 (na rozdíl od předchozích simulací) interagovalo pouze s jednou fosfátovou skupinou a tato interakce byla stabilní. Argininové residuum pak mohlo interagovat pomocí celkem pěti různých amidových skupin se čtyřmi kyslíkovými atomy ve fosfátové skupině. Z dvaceti možných způsobů interakce jsou přitom v grafech zachyceny pouze dva. Z nich je zřejmé, že počáteční způsob interakce Arg47 s nukleovou kyselinou zůstal zachován pouze v první polovině simulace.

g) Interakce RNA-RNase H (viz. graf E4) se odehrává především v oblasti aktivního místa. Kromě toho byla zaznamenána významná interakce s residui Met80, Cys16 a Arg146.

h) Interakce v aktivním místě (viz. graf F4): Je zřejmé, že geometrie aktivního místa byla po celou dobu simulace stabilní. Molekula vody s pořadovým číslem 199 okupovala po celou dobu simulace pozici umožňující efektivní atak fosfátové skupiny v aktivním místě.

3.7 MD_5: 1x RNase H + $(dN.rN)_{14}$ / FF3

a) Simulovaný systém: V molekulárně-dynamické simulaci MD_5 sestával simulovaný systém (obr. 3.12) z jedné kopie enzymu RNase H, na níž byla navázána jedna dvoušrobovice DNA:RNA o délce 14 párů bazí - r(CGACACCUGAUUCC) .d(GCTGTGGACTAAGG). V aktivním místě enzymu RNase H se nacházely dva hořčíkové ionty. Obě vlákna nukleové kyseliny byla přirozená, nenesla chemické modifikace. Po zahrnutí vodní obálky do simulovaného systému sestával tento z 34189 atomů. Délka výsledné molekulárně-dynamické simulace byla 5 ns.

b) Silové pole: v molekulárně-dynamické simulaci MD_5 bylo použito silové pole FF3 [42] s modifikovanými silovými konstantami (zejména se zvýšenou energetickou bariérou pro torzní úhel C3‘-C4‘-C5‘-O5‘, viz. tabulka 3.1). Cílem této modifikace silového pole bylo stabilizovat přirozenou konformaci internukleotidové spojky tak, aby při velmi dlouhých simulacích nedocházelo k přechodům internukleotidových spojek do konformací, jež v případě nakumulování mohou vést i k destabilizaci dvoušroubovicovité struktury. Otázkou bylo mimo jiné to, zda internukleotidové spojky nebudou v důsledku výše zmíněné modifikace „přestabilizované“. Tj. zda nedojde k přechodům do přirozených -g-g konformací i u internukleotidových spojek, kde v důsledku interakce s enzymem se v krystalové struktuře realizovala jiná než obligátní -g-g konformace.

c) Internukleotidové spojky (viz. graf A5) preferovaly jinou než přirozenou -g-g konformaci pouze ojediněle (ve srovnání se simulací MD_6). V případě RNA vlákna se jednalo o residua R160 a R162. V případě DNA vlákna se jednalo o residua D179, D172 a D170. Residuum D179 je situované ve vazebném místě s Thr49, na této pozici (obdoba D330 ze simulací 1-3) došlo ke změně konformace internukleotidové spojky ve všech simulacích. Změněná konformace u residuí D172 a D170 je pozůstatkem po interakci s odstraněným enzymem. Sousední residuum D171 zrelaxovalo do přirozené konformace.

d) Watson-Crickovské párování bazí (viz. graf B5): bylo v hybridním duplexu DNA.RNA narušeno v terminálním páru residuí R155.D182. Porovnáním se simulacemi 1-3 lze dospět k závěru, že odstranění druhé kopie enzymu RNase H uvolnilo určité napětí v dvoušroubovici nukleové kyseliny.

e) Sugar Puckering (viz. graf C5) v RNA vlákně vykazoval atypické chování (tj. preference konformace C2’-endo namísto C3’-endo) pouze u terminálních residuí R168 a R155, R156 (zde došlo k narušení Watson-Crickovského párování bazí). Dále bylo narušení sugar puckeringu pozorováno u residua R161, kde došlo ke konformační změně internukleotidové spojky. Naproti tomu v DNA vlákně bylo narušení sugar-puckeringu pozorováno spíše u vnitřních residuí (v tomto případě šlo o realizaci

konformace C3‘-endo namísto obvyklé konformace C2’-endo). Jednalo se o residua D181 a D180 ležící mezi vazebnými místy pro DNA s residui Trp93 a Thr49. Tedy o residua identická s těmi, u nichž bylo narušení sugar puckeringu pozorováno i v předchozích molekulárně-dynamických simulacích. Za pozornost opět stojí, že ve zbytku nukleové kyseliny relaxovaly deoxyribosy (zejména D174 a D173) do přirozených konformací.

f) Interakce DNA-RNase H (viz. graf D5) se realizovala zejména ve dvou vazebných místech. Na stabilizaci se podílela v prvním vazebném místě zejména residua Trp93, Ser101 a residuum Thr49 ve druhém vazebném místě. V tomto vazebném místě byla též velmi významná interakce s residui Arg47, Asn108. Tyto interakce v grafech nepůsobí na první pohled tak stabilně ve srovnání s residui zmíněnými výše. Je to způsobené tím, že residuum Asn108 v průběhu molekulárně-dynamické simulace střídavě interagovalo se dvěmi sousedními internukleotidovými spojkami. Argininové residuum pak mohlo interagovat pomocí celkem pěti různých amidových skupin se čtyřmi kyslíkovými atomy ve fosfátové skupině. Z dvaceti možných způsobů interakce jsou přitom v grafech zachyceny pouze dva. Z nich je patrné, že po celou dobu simulace se způsob interakce residua Arg47 s nukleovou kyselinou proměňoval.

g) Interakce RNA-RNase H (viz. graf E5) se odehrává především v oblasti aktivního místa. Kromě toho byla zaznamenána významná interakce s residui Met80 a Glu54.

h) Interakce v aktivním místě (viz. graf F5) byly podrobně sledovány pouze v aktivním místě se dvěma hořčíkovými ionty. Je zřejmé, že geometrie aktivního místa byla po celou dobu simulace stabilní. Molekuly vody s pořadovým číslem 199 a 503 se během simulace vystřídaly v pozici umožňující efektivní atak fosfátové skupiny v aktivním místě.

3.8 MD_6: 1x RNase H + $(dN.rN)_{14}$ / FF2

a) Simulovaný systém: V molekulárně-dynamické simulaci MD_6 sestával simulovaný systém (obr. 3.12) z jedné kopie enzymu RNase H, na níž byla navázána jedna dvoušrobovice DNA:RNA o délce 14 párů bazí - r(CGACACCUGAUUCC) .d(GCTGTGGACTAAGG). V aktivním místě enzymu RNase H se nacházely dva hořčíkové ionty. Obě vlákna nukleové kyseliny byla přirozená, nenesla chemické modifikace. Po zahrnutí vodní obálky do simulovaného systému sestával tento z 34189 atomů. Délka výsledné molekulárně-dynamické simulace byla 5 ns.

b) Silové pole: V molekulárně-dynamické simulaci MD_6 bylo použito silové pole FF2 [38] s redukovanou silovou konstantou pro *-O-P-* torzní úhel (* značí libovolný atom) (viz. tabulka 3.1). Cílem této redukce bylo snížit energetické bariéry oddělující jednotlivé konformery přirozené fosfodiesterové spojky. V důsledku toho byla zvýšena pravděpodobnost pozorovat případné artefakty v konformačních preferencích internukleotidových spojek na časových škálách do 10 ns. Otázkou bylo mimo jiné to, zda výskyt takových artefaktů bude díky interakci s enzymem významně zvýšen.

c) Internukleotidové spojky (viz. graf A6) preferovaly jinou než přirozenou -g-g konformaci relativně často a to zejména v RNA vlákně (podobně a možná i více než v simulaci MD_1 se stejným silovým polem). V případě RNA vlákna se jednalo o residua R157, R158, R159, R160, R161, R162, R163, R165 a R167. V případě DNA vlákna se jednalo o residua D179, D178 a D172, D171 a D170. Residuum D179 je situované ve vazebném místě s Thr49, na této pozici (obdoba D330 ze simulací 1-3) došlo ke změně konformace internukleotidové spojky ve všech simulacích. Změněná konformace u residuí D172, D171 a D170 je pozůstatkem po interakci s odstraněným enzymem.

d) Watson-Crickovské párování bazí (viz. graf B6): v hybridním duplexu DNA.RNA bylo stabilní. Porovnáním se simulacemi 1-3 lze dospět k závěru, že odstranění druhé kopie enzymu RNase H uvolnilo určité napětí v dvoušroubovici nukleové kyseliny. Svou roli mohla sehrát i plasticita cukrfosfátové páteře v důsledku použití silového pole FF2.

e) Sugar Puckering (viz. graf C6) v RNA vlákně vykazoval atypické chování (tj. preference konformace C2'-endo namísto C3'-endo) pouze u terminálních residuí R168 a R155, R156. Dále bylo narušení sugar puckeringu pozorováno u residua R162, kde došlo ke konformační změně internukleotidové spojky. Naproti tomu v DNA vlákně bylo narušení sugar-puckeringu pozorováno spíše u vnitřních residuí (v tomto případě šlo o realizaci konformace C3'-endo namísto obvyklé konformace C2'-endo). Jednalo se o residua D181 a D180 ležící mezi vazebnými místy pro DNA s residui Trp93 a

Thr49. Tedy o residua identická s těmi, u nichž bylo narušení sugar puckeringu pozorováno i v předchozích molekulárně-dynamických simulacích. Za pozornost opět stojí, že ve zbytku nukleové kyseliny relaxovaly deoxyribosy (zejména D174 a D173) do přirozených konformací.

f) Interakce DNA-RNase H (viz. graf D6) se realizovala zejména ve dvou vazebných místech. Na stabilizaci se podílela v prvním vazebném místě zejména residua Trp93, Ser101 a residuum Asn19 ve druhém vazebném místě (Thr49 poměrně neobvykle interagovalo slaběji). V tomto vazebném místě byla též velmi významná interakce s residui Arg47, Asn108. Tyto interakce v grafech nepůsobí na první pohled tak stabilně ve srovnání s residui zmíněnými výše. Je to způsobené tím, že residuum Asn108 v průběhu molekulárně-dynamické simulace střídavě interagovalo se dvěmi sousedními internukleotidovými spojkami. Argininové residuum pak mohlo interagovat pomocí celkem pěti různých amidových skupin se čtyřmi kyslíkovými atomy ve fosfátové skupině. Z dvaceti možných způsobů interakce jsou přitom v grafech zachyceny pouze dva. Z nich je zřejmé, že Arg47 residuum v některých okamžicích kontakt s fosfátovou skupinou zcela ztrácelo.

g) Interakce RNA-RNase H (viz. graf E6) se odehrává především v oblasti aktivního místa. Kromě toho byla zaznamenána významná interakce s residui Arg146 a Glu54.

h) Interakce v aktivním místě (viz. graf F6) Je zřejmé, že geometrie aktivního místa byla po celou dobu simulace narušená v důsledku konformačního přechodu štípané internukleotidové spojky R159, která díky tomu nemohla být efektivně atakována molekulami vody, kterých se v blízkosti této spojky během simulace vystřídalo několik:

```
WAT  199     0-1.2  ns
WAT 3688  2.52-4.82 ns
WAT  185  4.82-5.2  ns
```

3.9 MD_7: 1x RNase H + $(dN.rN)_{14}$ / FF1

a) Simulovaný systém: v molekulárně-dynamické simulaci MD_7 sestával z jedné kopie enzymu RNase H (obr. 3.12), na níž byla navázána jedna dvoušrobovice DNA:RNA o délce 14 párů bazí - r(CGACACCUGAUUCC) .d(GCTGTGGACTAAGG). V aktivním místě enzymu RNase H se nacházely dva hořčíkové ionty. Obě vlákna nukleové kyseliny byla přirozená, nenesla chemické modifikace. Po zahrnutí vodní obálky do simulovaného systému sestával tento z 34189 atomů. Délka výsledné molekulárně-dynamické simulace byla 5 ns.

b) Silové pole: V molekulárně-dynamické simulaci MD_7 bylo použito silové pole FF1 [38]. Při použití tohoto silového pole pro velmi dlouhé molekulárně-dynamické simulace nukleových kyselin byly pozorovány přechody internukleotidových spojek do atypických konformací [42]. V případě kumulace těchto konformačních přechodů docházelo dokonce i úplné dezintegraci dvoučroubovicovitých struktur. V případě molekulárně-dynamických simulací samotných nukleových kyselin na časové škále do 10 ns (jako ve zde prezentovaných molekulárně-dynamických simulacích) by výskyt těchto artefaktů neměl být významný. Nicméně u zde prezentovaného simulovaného systému bylo důvodné očekávat, že intenzivní interakce s enzymem může přechody do atypických konformací uspíšit.

c) Internukleotidové spojky (viz. graf A7) preferovaly jinou než přirozenou -g-g konformaci pouze ojediněle (ve srovnání se simulací MD_6). V případě RNA vlákna se jednalo o residua R160, R161 a R163. V případě DNA vlákna se jednalo o residua D179, D172, D171 a D170. Residuum D179 je situované ve vazebném místě s Thr49, na této pozici (obdoba D330 ze simulací 1-3) došlo ke změně konformace internukleotidové spojky ve všech simulacích. Změněná konformace u residuí D172, D171 a D170 je pozůstatkem po interakci s odstraněným enzymem.

d) Watson-Crickovské párování bazí (viz. graf B7): v hybridním duplexu DNA.RNA bylo stabilní. Porovnáním se simulacemi 1-3 lze dospět k závěru, že odstranění druhé kopie enzymu RNase H uvolnilo určité napětí v dvoušroubovici nukleové kyseliny.

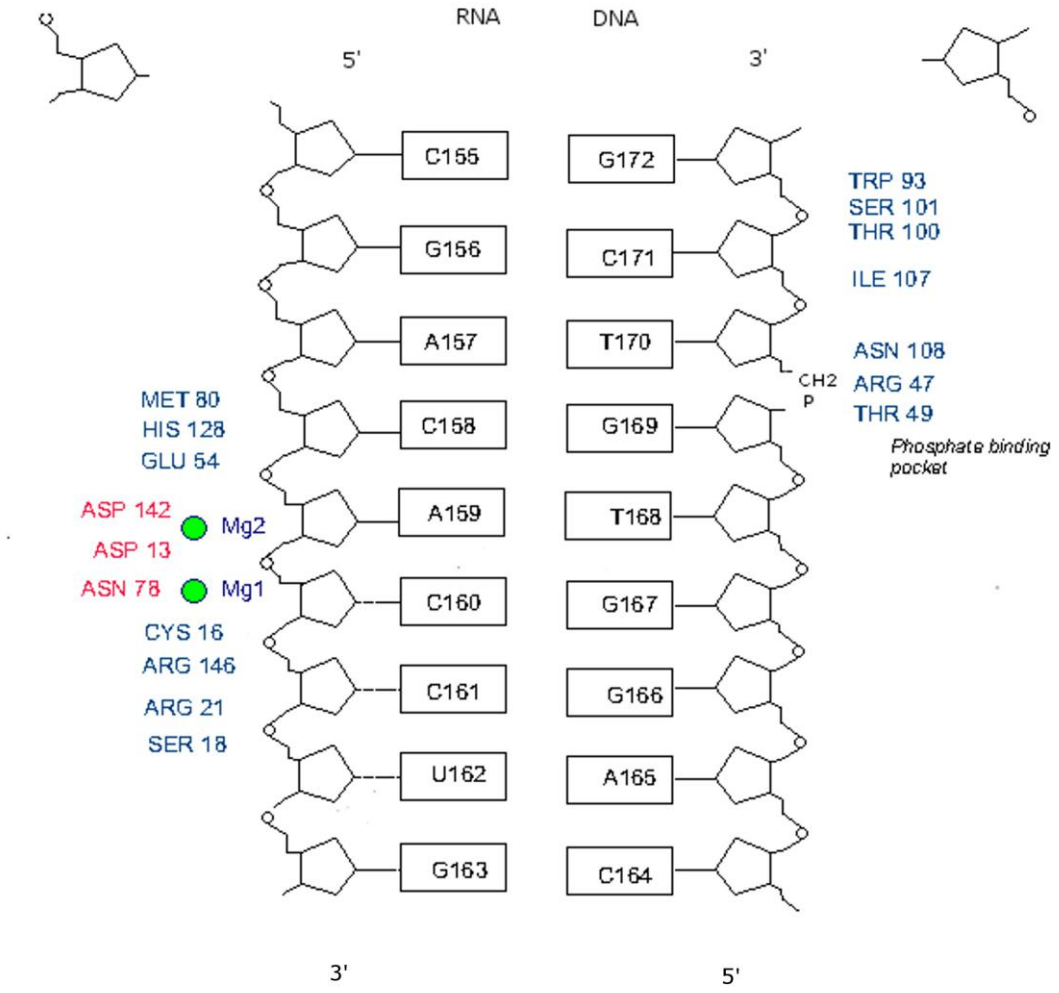
e) Sugar Puckering (viz. graf C7) v RNA vlákně nevykazoval atypické chování (tj. preference konformace C2'-endo) s výjimkou terminálního residua R168. Naproti tomu v DNA vlákně bylo narušení sugar-puckeringu pozorováno u několika vnitřních residuí (v tomto případě šlo o realizaci konformace C3'-endo namísto obvyklé konformace C2'-endo). Jednalo se o residua D181 a D180 ležící mezi vazebnými místy pro DNA s residui Trp93 a Thr49. Tedy o residua identická s těmi, u nichž bylo narušení sugar puckeringu pozorováno i v předchozích molekulárně-dynamických simulacích. Za pozornost opět stojí, že ve zbytku nukleové kyseliny relaxovaly deoxyribosy (zejména D174 a D173) do přirozených konformací.

f) Interakce DNA-RNase H (viz. graf D7) se realizovala zejména ve dvou vazebných místech. Na stabilizaci se podílela v prvním vazebném místě zejména residua Trp93, Thr100, Ser101 a residua Thr49 a Asn19 ve druhém vazebném místě. V tomto vazebném místě byla též velmi významná interakce s residui Arg47, Asn108. Na rozdíl od všech předchozích simulací byly tentokrát tyto interakce stabilní po celou dobu simulace.

g) Interakce RNA-RNase H (viz. graf E7) se odehrává především v oblasti aktivního místa. Kromě toho byla zaznamenána významná interakce s residui Met80, Glu54, Arg146 a Ser18. To znamená, že i RNA vlákno bylo stabilizováno efektivněji než v předchozích simulacích.

h) Interakce v aktivním místě (viz. graf F7): Je zřejmé, že geometrie aktivního místa byla stabilní po většinu simulace s výjimkou úvodní části. Souviselo to s konformačním přechodem internukleotidové spojky R159. Molekuly vody s pořadovým číslem 199 a 4905 se během simulace vystřídaly v pozici umožňující efektivní atak fosfátové skupiny v aktivním místě:

```
WAT  199     0-1.52 ns
WAT 4905  1.53-5.4  ns
```



Obrázek 3.13: Diagram vazeb mezi duplexem RNA:DNA a RNasou H. Model s jednou jednotkou RNasy H a 3PC5 fosfonátovou spojkou mezi residui G169-T170 - simulace 8.

3.10 MD_8: 1x RNase H + $(dN.rN)_9$ / FF5 / 3PC5

a) Simulovaný systém: v molekulárně-dynamické simulaci MD_8 sestával simulovaný systém (obr. 3.13) z jedné kopie enzymu RNase H, na níž byla navázána jedna dvoušrobovice DNA:RNA o délce 9 párů bazí r(CGACACCUG).d(GCT-5CP3-GTGGAC). V aktivním místě enzymu RNase H se nacházely dva hořčíkové ionty. RNA vlákno bylo přirozené, neneslo chemické modifikace. Do DNA vlákna byla na pozici D170-D169 vložena chemicky modifikovaná internukleotidová spojka typu C3'-O3'-**P-C**-O5'-C5'. Po zahrnutí vodní obálky do simulovaného systému sestával tento z 28745 atomů. Délka výsledné molekulárně-dynamické simulace byla 10 ns.

b) Silové pole: Vzhledem k výsledkům, které byly získány při molekulárně-dynamických simulacích komplexů enzymu RNase H a přirozených nukleových kyselin v předchozích kapitolách, bylo v molekulárně-dynamické simulaci MD_8 použito silové pole [38] do něhož byly doplněny silové konstanty tak, aby bylo možné provádět molekulárně-dynamické simulace nukleových kyselin s chemicky modifikovanými internukleotidovými spojkami typu C3'-O3'-**P-C**-O5'-C5'.

c) Internukleotidové spojky (viz. graf A8) preferovaly jinou než přirozenou -g-g konformaci pouze ojediněle. V případě RNA vlákna preferovaly všechny internukleotidové spojky konformaci -g-g po celou dobu simulace. V případě DNA vlákna byl zaznamenán přechod do atypické konformace u terminálních residuí D165, D164 (kde došlo k narušení Watson-Crickovského párování bazí). Modifikovaná internukleotidová spojka preferovala po celou dobu simulace konformaci –ggt (definovanou dle konformačních preferencí torzních úhlů: C5'-O5'-C-P, O5'-C-P-O3', C-P-O3'-C3').

d) Watson-Crickovské párování bazí (viz. graf B8): v hybridním duplexu DNA.RNA bylo stabilní s výjimkou terminálního páru R163-D164. Ke konci simulace se rozpadnul i druhý terminální pár R155-D172.

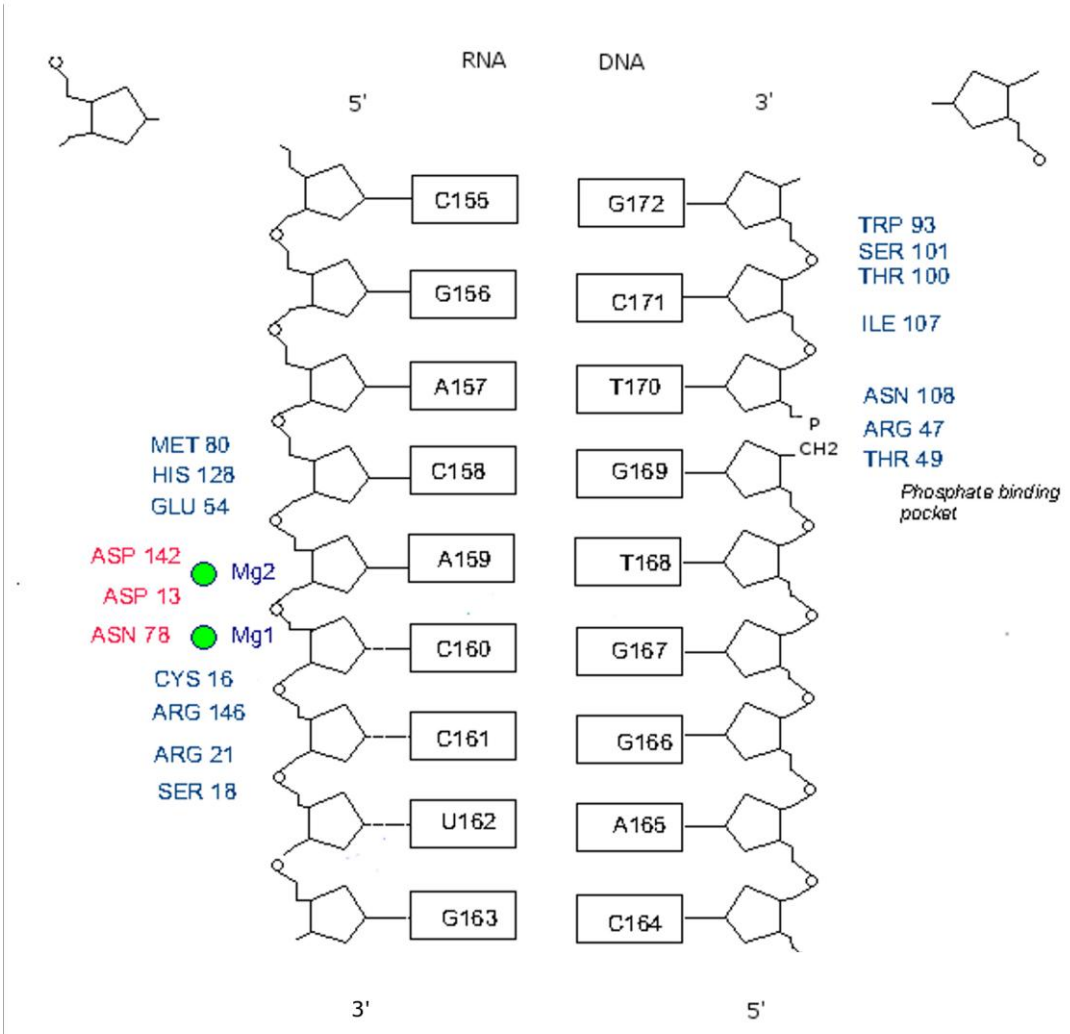
e) Sugar Puckering (viz. graf C8) v RNA vlákně vykazoval atypické chování (tj. preference konformace C3'-endo) pouze u terminálního residua R155. A to od okamžiku kdy zde došlo k narušení Watson-Crickovského párování bazí. Naproti tomu v DNA vlákně bylo narušení sugar-puckeringu pozorováno spíše u vnitřních residuí (v tomto případě šlo o realizaci konformace C3'-endo namísto obvyklé konformace C2'-endo). Jednalo se o residua D170 a D171 ležící mezi vazebnými místy pro DNA s residui Trp93 a Thr49. Tedy o residua identická s těmi, u nichž bylo narušení sugar puckeringu pozorováno i v předchozích molekulárně-dynamických simulacích. To znamená, že atypické chování deoxyribos zde zůstalo zachováno i po vnesení chemické modifikace do této části páteře nukleové kyseliny.

f) Interakce DNA-RNase H (viz. graf D8) se realizovala zejména ve dvou vazebných místech. Na stabilizaci se podílela v prvním vazebném místě zejména residua Trp93, Ser101. Dále pak residuum Thr49 ve druhém vazebném místě, s nímž interagovala chemicky modifikovaná internukleotidová spojka. V tomto vazebném místě byla též velmi významná interakce s residui Arg47, Asn108. Na rozdíl od téměř všech předchozích simulací (s výjimkou MD_7) byly tentokrát tyto interakce velmi stabilní (viz. obr. 3.15 a).

g) Interakce RNA-RNase H (viz. graf E8) se odehrává především v oblasti aktivního místa. Kromě toho byla zaznamenána významná interakce s residui Met80, Glu54, Arg146 a Ser18. To znamená, že i RNA vlákno bylo stabilizováno poměrně efektivně i přes provedenou chemickou modifikaci v DNA vlákně.

h) Interakce v aktivním místě (viz. graf F8): Je zřejmé, že vzájemná vzdálenost mezi hořčíkovými ionty v průběhu MD simulace oscilovala. Iont B během těchto fluktuací opakovaně ztrácel a obnovoval kontakt se štípanou fosfodiesterovou spojkou podobně jako v simulaci MD_6. V blízkosti štípané spojky se během simulace vystřídalo několik molekul vody:

```
WAT  175      0-0.42  ns
WAT  189   0.42-9.75  ns
WAT 6698  0.893-1.198 ns
```



Obrázek 3.14: Diagram vazeb mezi duplexem RNA:DNA a RNasou H. Model s jednou jednotkou RNasy H a modifikovanou spojkou typu 3CP5 mezi residui G169 a T170 DNA vlákna - simulace 9.

3.11 MD_9: 1x RNase H + $(dN.rN)_9$ / FF5 / 3CP5

a) Simulovaný systém: V molekulárně-dynamické simulaci MD_9 sestával simulovaný systém (obr. 3.14) z jedné kopie enzymu RNase H, na níž byla navázána jedna dvoušrobovice DNA:RNA o délce 9 párů bazí - r(CGACACCUG).d(GCT-5PC3-GTGGAC). V aktivním místě enzymu RNase H se nacházely dva hořčíkové ionty. RNA vlákno bylo přirozené, neneslo chemické modifikace. Do DNA vlákna byla na pozici D169-D170 vložena chemicky modifikovaná internukleotidová spojka typu C3'-O3'-**C-P**-O5'-C5'. Po zahrnutí vodní obálky do simulovaného systému sestával tento z 28745 atomů. Délka výsledné molekulárně-dynamické simulace byla 10 ns.

b) Silové pole: Vzhledem k výsledkům, které byly získány při molekulárně-dynamických simulacích komplexů enzymu RNase H a přirozených nukleových kyselin v předchozích kapitolách, bylo v molekulárně-dynamické simulaci MD_9 použito silové pole [38] do něhož byly doplněny silové konstanty tak, aby bylo možné provádět molekulárně-dynamické simulace nukleových kyselin s chemicky modifikovanými internukleotidovými spojkami typu C3'-O3'-C-P-O5'-C5'.

c) Internukleotidové spojky (viz. graf A9) preferovaly jinou než přirozenou -g-g konformaci pouze ojediněle. V případě RNA vákna se to týkalo residua R155 (u kterého došlo k narušení Watson-Crickovského párování bazí). V případě DNA vlákna nebyl zaznamenán přechod do atypické konformace. Modifikovaná internukleotidová spojka preferovala po téměř celou dobu simulace (s výjimkou jejího úvodu) konformaci tgg (definovanou dle konformačních preferencí torzních úhlů: C5'-O5'-P-C, O5'-P-C-O3', P-C-O3'-C3').

d) Watson-Crickovské párování bazí (viz. graf B9): v hybridním duplexu DNA.RNA bylo stabilní s vyjímkou terminálního páru R155-D172.

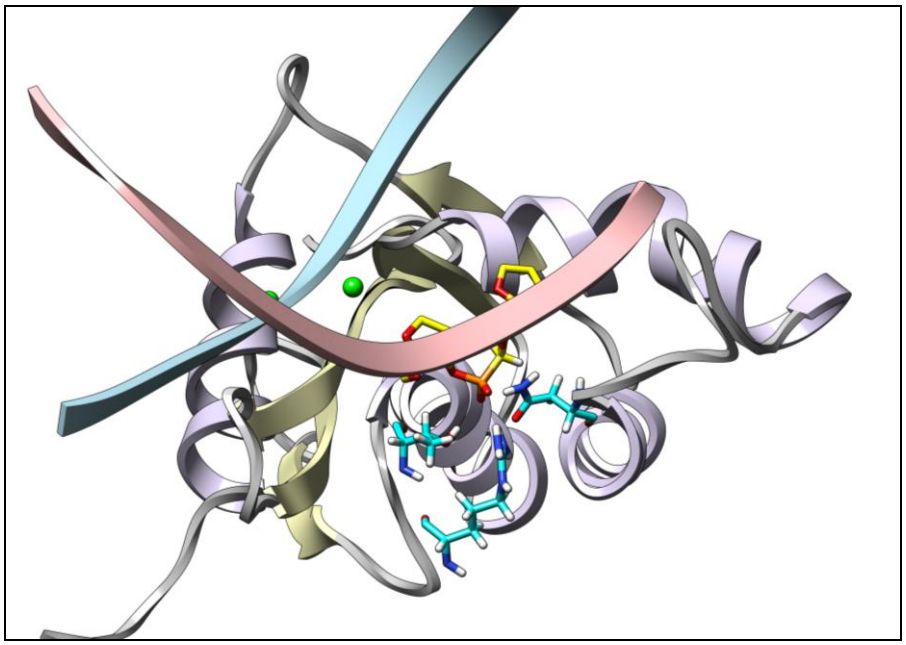
e) Sugar Puckering (viz. graf C9) v RNA vlákně vykazoval atypické chování (tj. preference konformace C3'-endo) pouze u terminálních residuí R155 a R163. Naproti tomu v DNA vlákně bylo narušení sugar-puckeringu pozorováno spíše u vnitřních residuí (v tomto případě šlo o realizaci konformace C3'-endo namísto obvyklé konformace C2'-endo). Jednalo se o residua D170 a D171 ležící mezi vazebnými místy pro DNA s residui Trp93 a Thr49. Tedy o residua identická s těmi, u nichž bylo narušení sugar puckeringu pozorováno i v předchozích molekulárně-dynamických simulacích. To znamená, že atypické chování deoxyribos zde zůstalo zachováno i po vnesení chemické modifikace do této části páteře nukleové kyseliny.

f) Interakce DNA-RNase H (viz. graf D9) se realizovala zejména ve dvou vazebných místech. Na stabilizaci se podílela v prvním vazebném místě zejména residua Trp93, Ser101. Dále pak residuum Thr49 a Asn19 ve druhém vazebném místě, s nímž

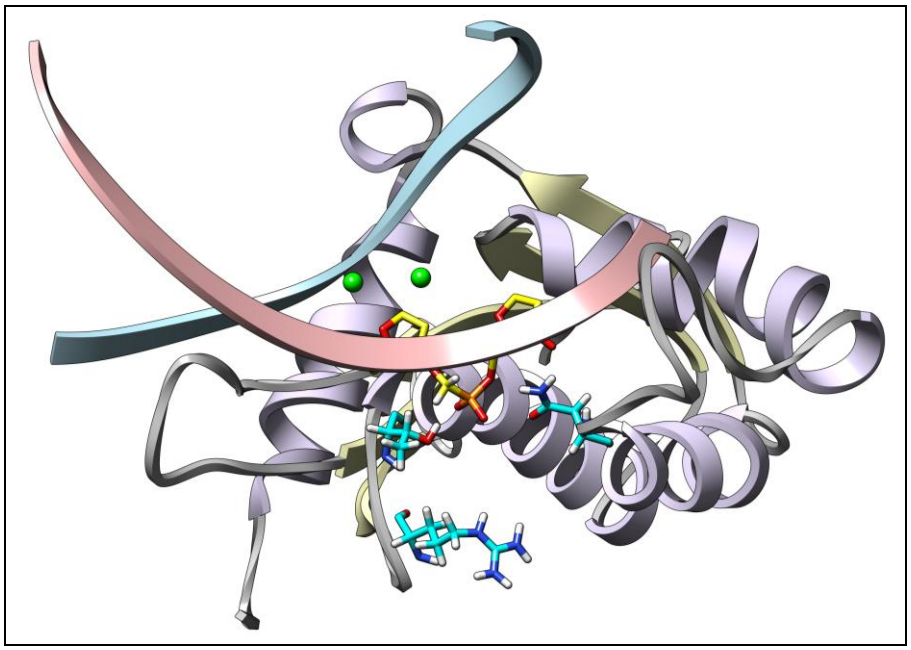
interagovala chemicky modifikovaná internukleotidová spojka. Oproti předchozí simulaci (s biologicky aktivní variantou fosfonátové spojky) v tomto případě (biologicky neaktivní varianty fosfonátové spojky) byl během simulace ztracen kontakt s residuem Arg47 (viz. obr. 3.15 b).

g) Interakce RNA-RNase H (viz. graf E9) se odehrává především v oblasti aktivního místa. Kromě toho byla zaznamenána významná interakce s residui Met80, Glu54, Arg146. To znamená, že RNA vlákno bylo stabilizováno poměrně efektivně i přes provedenou chemickou modifikaci.

h) Interakce v aktivním místě (viz. graf F9): Je zřejmé, že vzájemná vzdálenost mezi hořčíkovými ionty v průběhu MD simulace opět oscilovala (i když méně než v předchozí simulaci). Iont 2 během těchto fluktuací opakovaně ztrácel a obnovoval kontakt se štípanou fosfodiesterovou spojkou. Molekula vody s pořadovým číslem 189 byla po celou dobu simulace v pozici umožňující atak štípané vazby.



-a-



-b-

Obrázek 3.15: Trp-DNA vazebné místo – vazba na modifikovanou spojku. **a**) 3PC5 internukleotidová spojka se stabilně váže k Thr49, Asn108, Arg47. **b)** 3CP5 internukleotidová spojka ztrácí během simulace kontakt s Arg47.

3.12 Závěr

V rámci diplomové práce bylo provedeno celkem devět molekulárně-dynamických simulací. V případě simulací 1-3 a 4-7 (tedy u komplexů enzymu RNase H a přirozené nukleové kyseliny) jsem se primárně zajímal o konformační preference internukleotidových spojek s ohledem na intenzivní interakci cukrfosfátové páteře s enzymem. Dále pak o důsledky vazby jedné/dvou jednotek enzymu RNase H k duplexu DNA:RNA.

Je zřejmé, že internukleotidové spojky interagující s Thr-DNA vazebnými místy tj. D330 a D323 v simulacích 1-3, resp. D179 v simulacích 4-7 se po celou dobu nacházely v atypické konformaci –gg. Interakce s Thr-DNA vazebný místem, kde hraje dále důležitou roli Arg47 residuum, tedy vedla k tomu, že příslušná internukleotidová spojka preferovala systematicky jinou než přirozenou konformaci. To znamená, že obavy pramenící z toho, že korekce provedené v silových polích FF3, FF4 by mohly vést k tomu, že přirozená konformace internukleotidové spojky se bude realizovat i tam, kde nemá, se zde nenaplnily.

V případě navázání druhé kopie enzymu RNase H (simulace 1-3) byly atypické konformace preferované také u dalších internukleotidových spojek (tedy nejen D323 ale i D322 a D321). Zajímavé je, že po odstranění druhé kopie enzymu RNase H (simulace 4-7) došlo k částečné relaxaci této oblasti v simulacích 4-5 nikoliv však 6-7. To znamená, že ani 5 ns dlouhá molekulárně-dynamická simulace nemusí stačit na zotavení z kontaktu s enzymem. Nicméně silová pole FF3 a FF4, která nějakým způsobem podněcují přechod internukleotidové spojky do přirozené konformace -g-g (simulace 4-5), byla v tomto směru úspěšnější.

V případě RNA vlákna byl přechod internukleotidových spojek do atypických konformací markantní u simulací 1 a 6, kde bylo použité silové pole FF2 s redukovanými bariérami oddělujícími jednotlivé konformery. Na delších časových škálách by bylo tedy možné očekávat podobné jevy i v případě originálního silového pole FF1. Jednalo se zejména o celou oblast R308-R312 (tedy o místa interakce RNA vlákna s první kopií enzymu RNase H) a o internukleotidové spojky R316 a R318 v místě interakce s druhou kopií enzymu RNase H. V ostatních simulacích (2, 3, 4, 5, 7) preferovala jinou než přirozenou konformaci internukleotidová spojka R311 bezprostředně sousedící se štípanou internukleotidovou spojkou. To může mít zásadní význam pro katalytický mechanismus, neboť internukleotidová spojka R311 se podílí na stabilizaci molekuly vody atakující štípanou internukleotidovou spojku. V simulacích 4-7, zřejmě v důsledku relaxace po odstranění druhé kopie enzymu RNase H, byl pozorován konformační přechod též u spojek R162 či R163.

Jako extrémně citlivá na použité silové pole se ukázala zejména oblast aktivního místa, kde u internukleotidových spojek R310 a R311 bylo pozorováno několik kombinací jejich konformerů. Štípaná internukleotidová spojka se nacházela ve svém energetickém minimu -g-g v simulacích 2, 3, 4, 5 (tj. v simulacích kde byla v silovém

poli provedena korekce ve prospěch konformace -g-g) a po většinu simulace 7 (nikoliv však v simulacích 1 a 6). Na druhou stranu v případě simulace 4 se zřejmě naplnila obava z toho, že by přirozená konformace internukleotidové spojky mohla být přestabilizovaná. Internukleotidová spojka R311 (bezprostředně sousedící se štípanou spojkou R310) přešla do konformace -g-g a interagovala poté přímo s hořčíkovým iontem B v aktivním místě.

Watson-Crickovské párování bazí bylo ve všech simulacích nad očekávání stabilní (s výjimkou terminálních párů bazí v simulacích 1,4,5). Jisté napětí projevované nejčastěji narušením stability jedné z vodíkových vazeb stabilizujících pár bazí bylo zřejmé v oblasti aktivního místa a to zejména v simulacích se dvěma jednotkami enzymu RNase H.

Narušení konformačních preferencí ribos (tj. preference konformace C2'-endo namísto C3'-endo) a deoxyribos (tj. preference konformace C3'-endo namísto C2'-endo) v duplexu DNA:RNA mělo velmi podobný průběh ve všech molekulárně-dynamických simulacích bez ohledu na použité silové pole. V RNA vláknech se objevovalo u terminálních residuí. V DNA vláknech pak u residuí v DNA vazebných místech (tj. D332 a D331 popř. D325 a D324 v simulacích 1-3, D181 a D180 v simulacích 4-7).

Pokud jde o interakce DNA vlákna s enzymem, jako nejdůležitější se jeví residua Trp93 a Ser101 v prvním DNA vazebném místě a Thr49 ve druhém vazebném místě (a jim obdobná residua v případě přítomnosti druhé jednotky enzymu RNase H v simulovaném systému). Tyto interakce byly ve většině případů plně stabilní. Velký význam má i interakce s residui Asn108 a Arg47. Zde aminokyselina interaguje střídavě se dvěma sousedními internukleotidovými spojkami (Asn108) popř. více způsoby s jednou internukleotidovou spojkou (Arg47). V případě simulace 7 byla interakce s residuem Arg47 obzvláště stabilní. V případě RNA vlákna bylo monitorováno celkem 7 residuí – Met80, His128, Glu207, Cys16, Arg146, Ser18, Arg21 (a jim analogická residua v druhé jednotce enzymu RNase H). V různých simulacích byla významnější interakce s tím či oním residuem, nicméně jasně vyprofilovaná vazebná místa jako v případě DNA vlákna zde nejsou. Z hlediska RNA vlákna je tedy rozhodně nejdůležitější interakce s hořčíkovými ionty v aktivním místě. Relativně nejstabilnější byly interakce enzymu s RNA vláknem v simulaci 7.

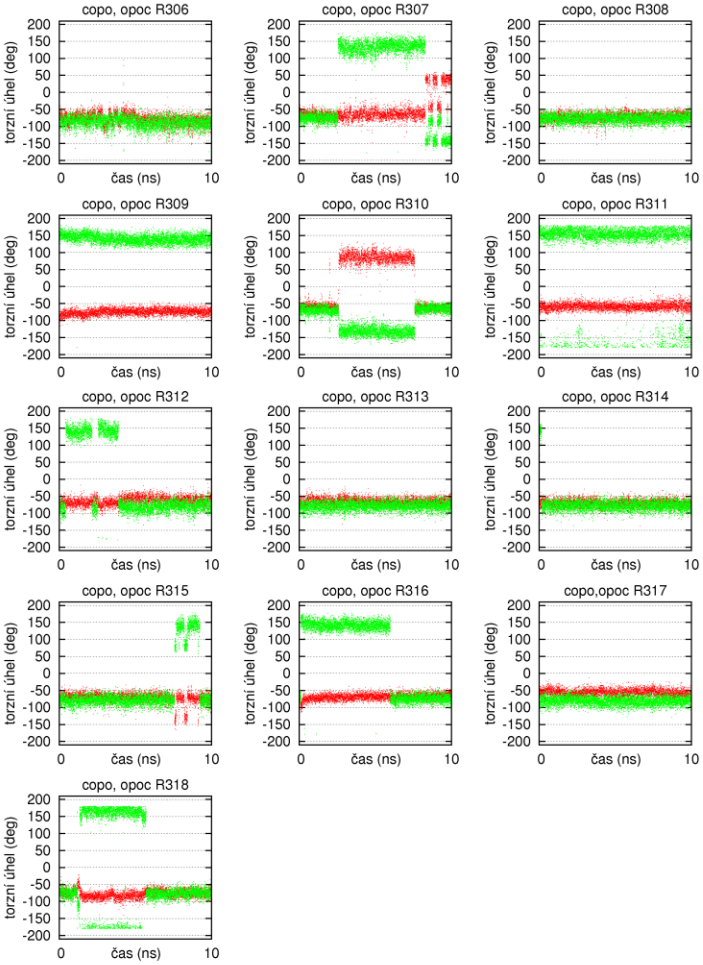
Pokud jde o uspořádání aktivního místa, kvantitativně byly vyhodnoceny vzdálenosti mezi hořčíkovými ionty A a B, atomy s nimi interagujících aminoskupin a fosfodiesterových spojek. Geometrie aktivního místa byla optimální po celou dobu v simulacích 2, 4 a 5. V simulaci 1 na počátku a konci simulace. V simulaci 7 po většinu simulace kromě počáteční fáze. V simulaci 3 a 6 byla geometrie aktivního místa narušená. Souvisí to zejména z konformačními preferencemi internukleotidové spojky R310. Ovlivněna byla zejména interakce s residuem Glu54. Pokud jde o přítomnost molekuly vody v pozici umožňující atakovat štípanou fosfodiesterovou spojku, zajímavý byl markantní rozdíl mezi simulacemi se dvěma a jednou jednotkou enzymu RNase H. V případě simulací se dvěma jednotkami enzymu RNase H se na pozici umožňující atak většinou prostřídalo během simulace větší množství molekul vody.

Naopak v případě simulací s jedním enzymem RNase H přečkala v této pozici celou dobu simulace třeba i jedna jediná molekula vody. Lze tedy spekulovat, zda uspořádání pozorované v krystalu (dvě jednotky enzymu RNase H) nemá inhibiční účinek.

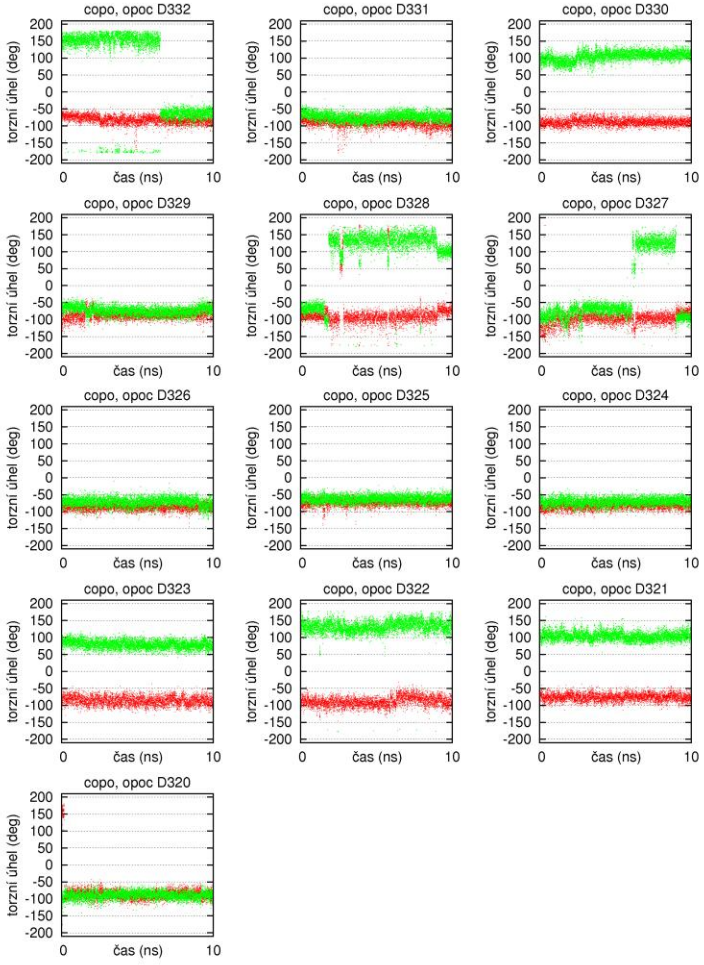
V případě molekulárně-dynamických simulací 8 a 9 jsem se primárně zajímal o vazbu modifikované internukleotidové spojky do Thr-DNA vazebného místa. Provedl jsem rafinaci silového pole tak, aby rozdíl mezi relativními energiemi různých konformerů modifikované spojky v ab initio a klasickém výpočtu byl méně než 1kcal/mol. Pro nemodifikované internukleotidové spojky jsem na základě zkušeností získaných při provádění simulací 1-7 zvolil silové pole FF1, které bylo předtím použito v simulaci 7. Ukázalo se totiž, že na časových škálách do 10 ns se případné artefakty, které by toto silové pole mohlo způsobit nestačí projevit. Nehrozí zde ani artefakty opačného druhu, jako v případě spojky R311 v simulaci 4. K mému rozhodnutí přispělo i to, že interakce mezi enzymem a vlákny nukleové kyseliny v simulaci 7 se zdála být relativně nejstabilnější (i když mohlo jít o náhodu).

Biologicky aktivní varianta modifikované internukleotidové spojky v simulaci 8 optimálně interagovala s Arg47 residuem (evidentně lépe než ve většině molekulárně-dynamických simulací s přirozenou internukleotidovou spojkou). Po celou dobu simulace trvající 10 ns zde existovaly dvě vodíkové vazby poutající oba nepáteřové kyslíky fosfonátové skupiny (obr. 3.15a). Naproti tomu biologicky neaktivní modifikovaná internukleotidová spojka v simulaci 9 brzy ztratila s residuem Arg47 kontakt (obr. 3.15b).

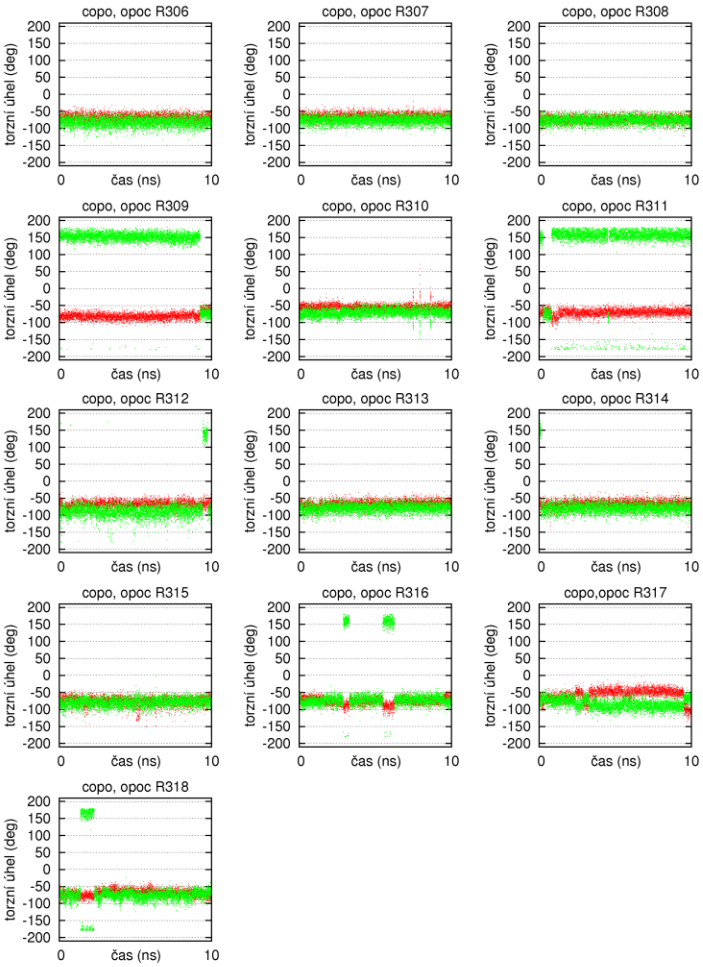
Je třeba zmínit, že „optimální“ interakce biologicky aktivní varianty fosfonátové spojky (simulace 8) s residuem Arg47 vedla k výraznější destabilizaci aktivního místa (projevované oscilacemi v poloze hořčíkového iontu B) než která byla pozorována v simulaci 9 s biologicky neaktivní variantou spojky. Je zde několik možných výkladů. Pozorovaná destabilizace aktivního místa nemusí mít nutně inhibiční efekt, naopak by mohla podnítit atak molekuly vody na štípanou internukleotidovou spojku. Na druhou stranu, i pokud by tato destabilizace inhibiční efekt měla, může to pořád být v souladu s experimentálními daty. Modifikovaná vlákna byla biologicky aktivní pouze pokud v nich alternovaly modifikované a přirozené internukleotidové spojky. Tj. vzájemná konfigurace nukleové kyseliny a enzymu ve zde prezentované simulaci může zachycovat mezifázi, kdy enzym vlákno RNA přeštípnout nedokáže, pokud se neposune o jednu pozici vpravo nebo vlevo. Podstatné však je, že biologicky aktivní varianta internukleotidové spojky dokáže i během tohoto mezikroku efektivně interagovat s Thr-DNA vazebným místem resp. s residuem Arg47.



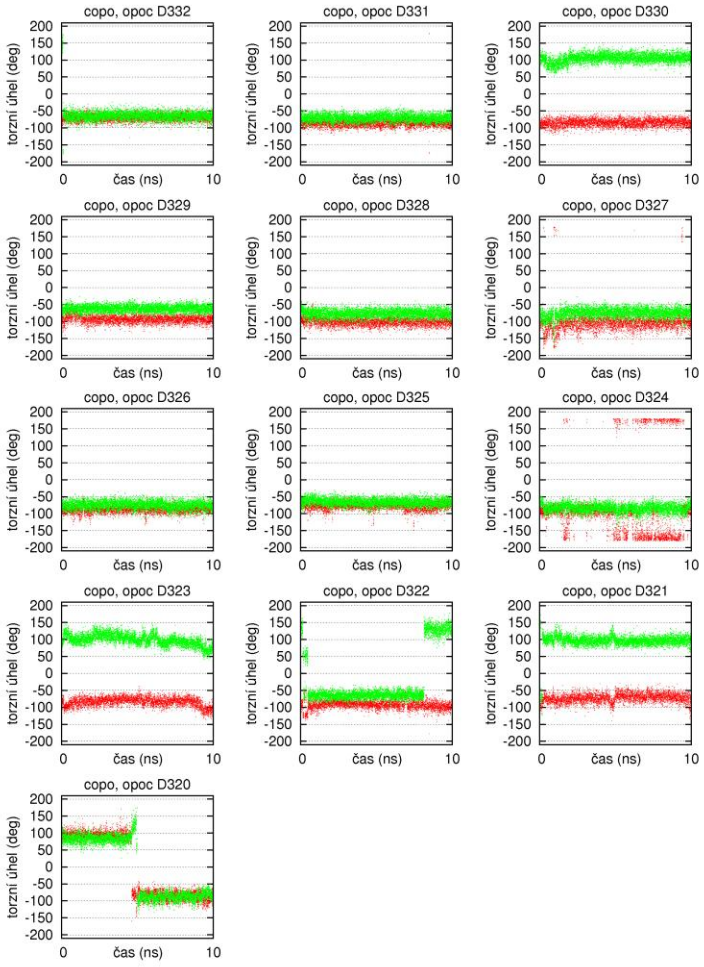
Graf A1: Torzní úhly C3'–O3'–P–O5' (červená) a O3'–P –O5'–C5' (zelená), RNA řetězec, simulace MD_1.



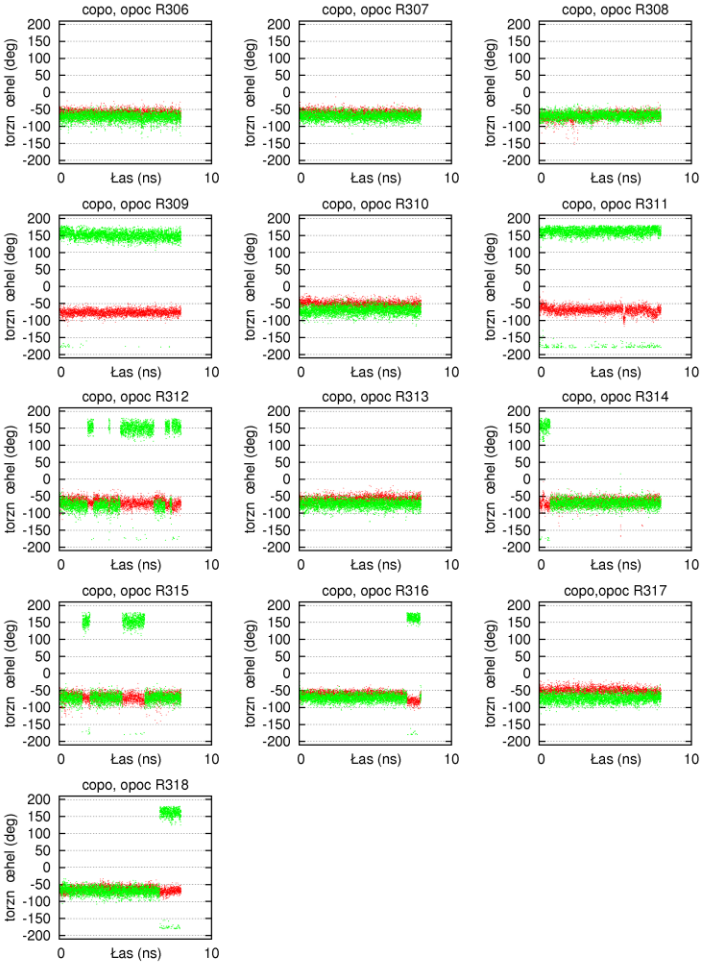
Graf A1: Torzní úhly C3'–O3'–P–O5' (červená) a O3'–P –O5'–C5' (zelená), DNA řetězec, simulace MD_1.



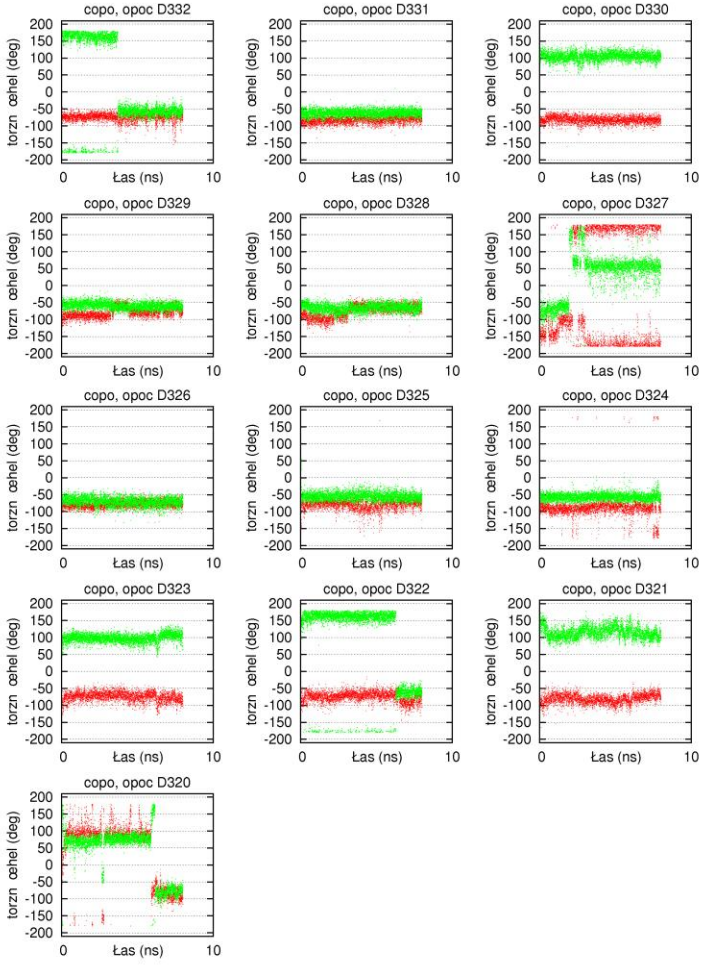
Graf A2: Torzní úhly C3'–O3'–P–O5' (červená) a O3'–P –O5'–C5' (zelená), RNA řetězec, simulace MD_2.



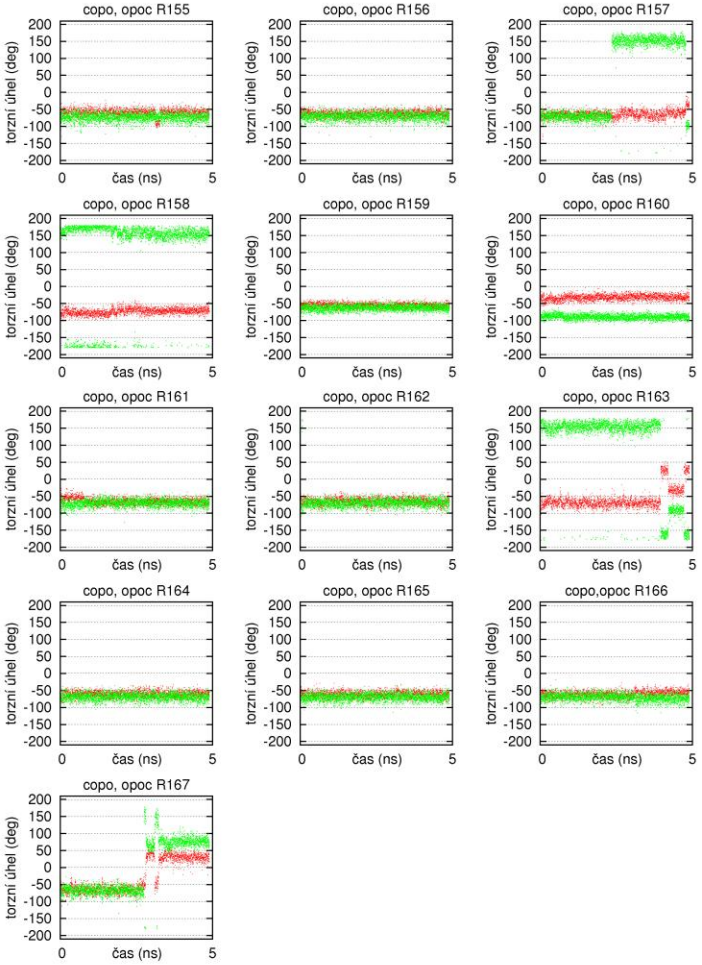
Graf A2: Torzní úhly C3'–O3'–P–O5' (červená) a O3'–P –O5'–C5' (zelená), DNA řetězec, simulace MD_2.



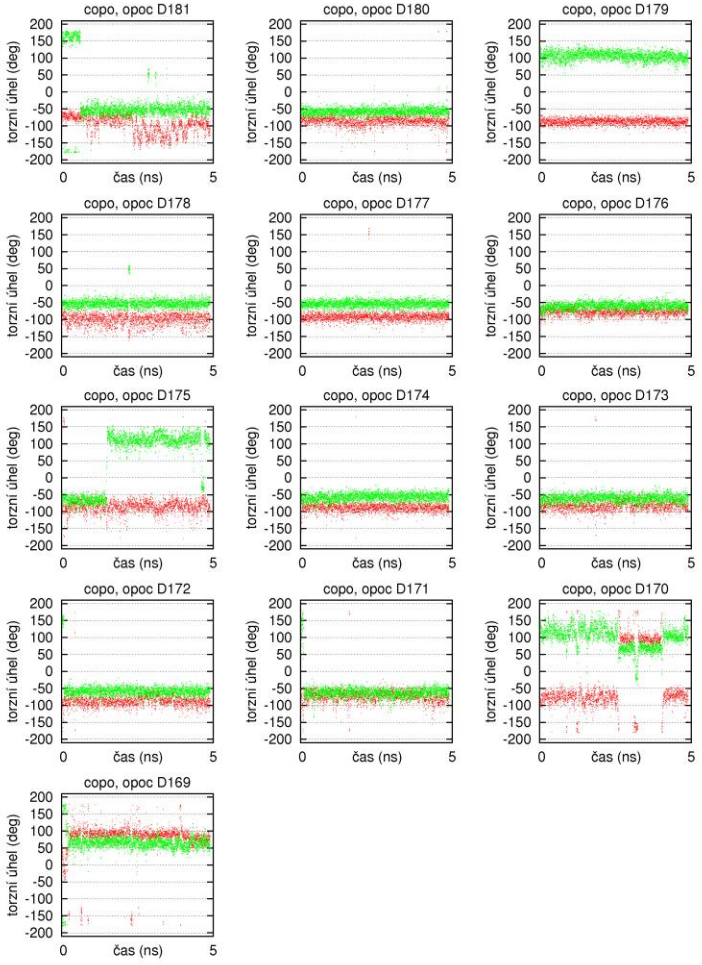
Graf A3: Torzní úhly C3'–O3'–P–O5' (červená) a O3'–P –O5'–C5' (zelená), RNA řetězec, simulace MD_3.



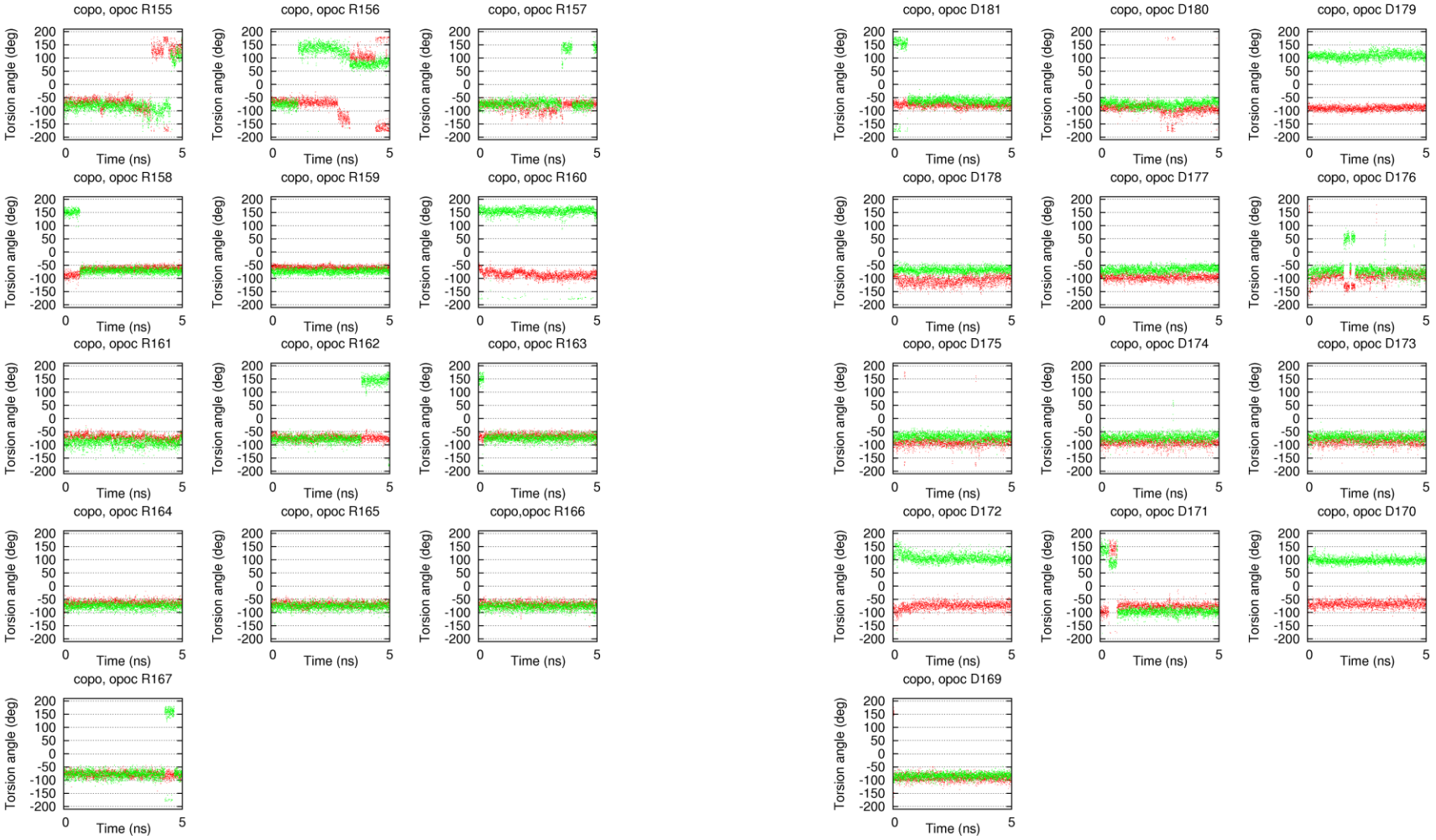
Graf A3: Torzní úhly C3'–O3'–P–O5' (červená) a O3'–P –O5'–C5' (zelená), DNA řetězec, simulace MD_3.



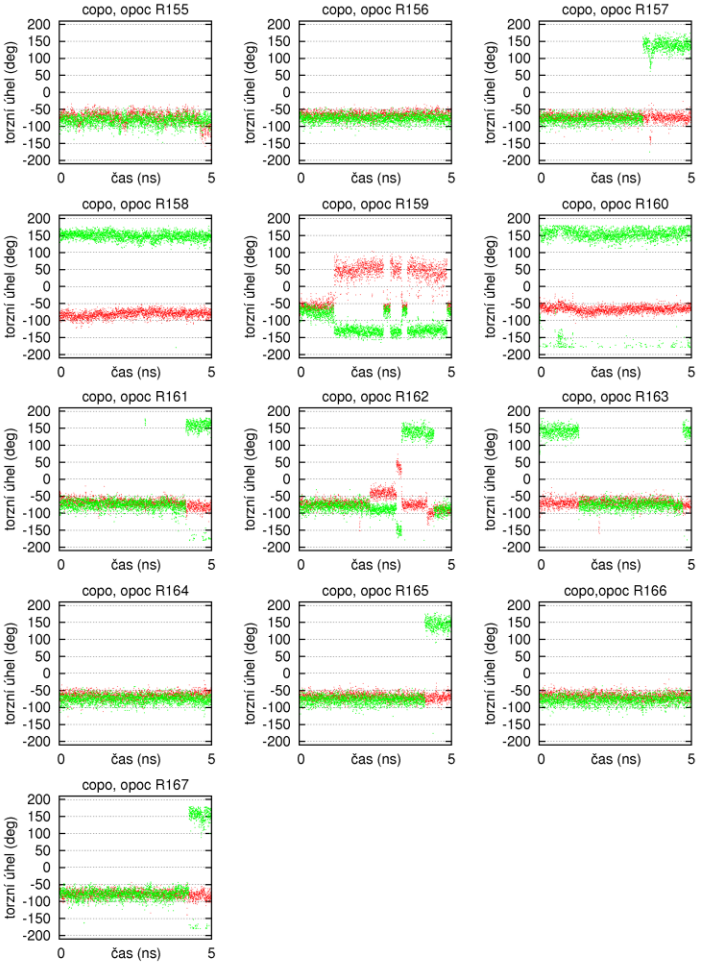
Graf A4: Torzní úhly C3'–O3'–P–O5' (červená) a O3'–P –O5'–C5' (zelená), RNA řetězec, simulace MD_4.



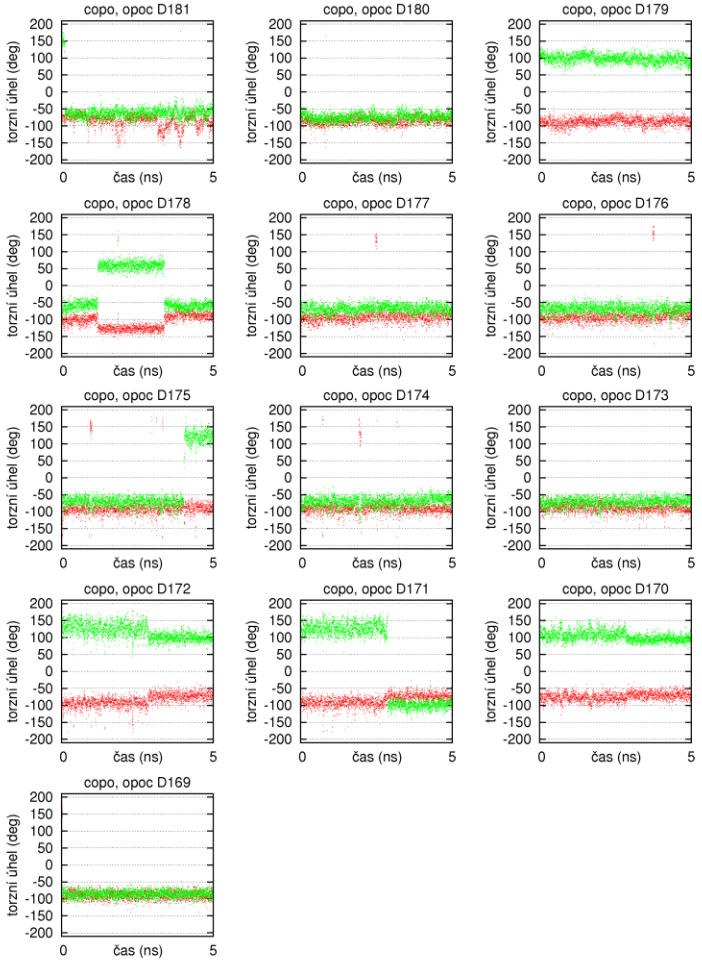
Graf A4: Torzní úhly C3'–O3'–P–O5' (červená) a O3'–P –O5'–C5' (zelená), DNA řetězec, simulace MD_4.



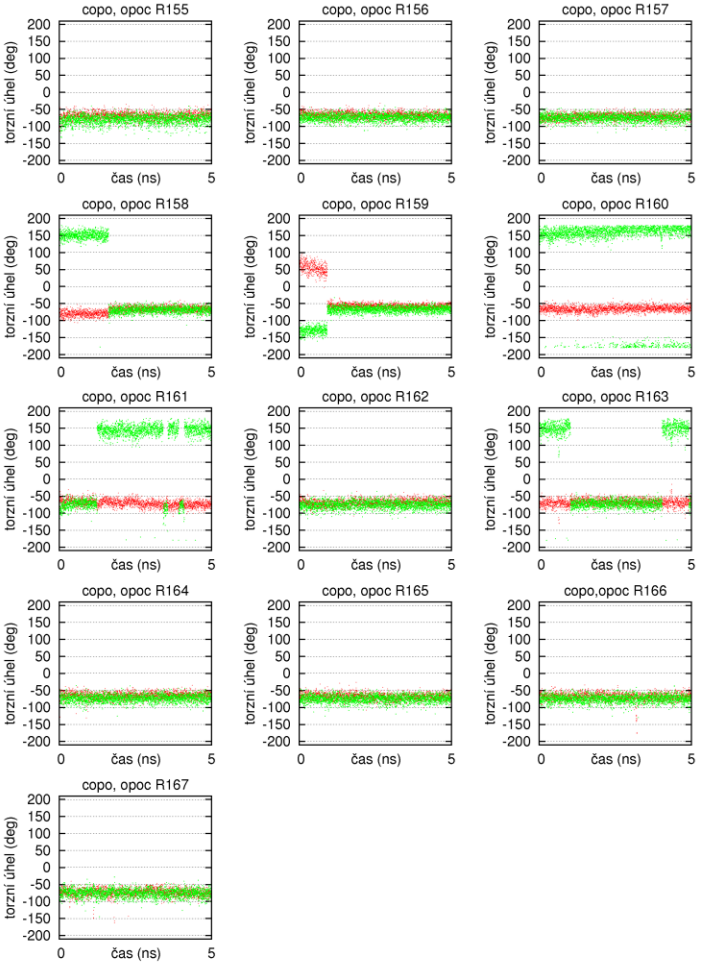
Graf A5: Torzní úhly C3'–O3'–P–O5' (červená) a O3'–P –O5'–C5' (zelená), simulace MD_5.



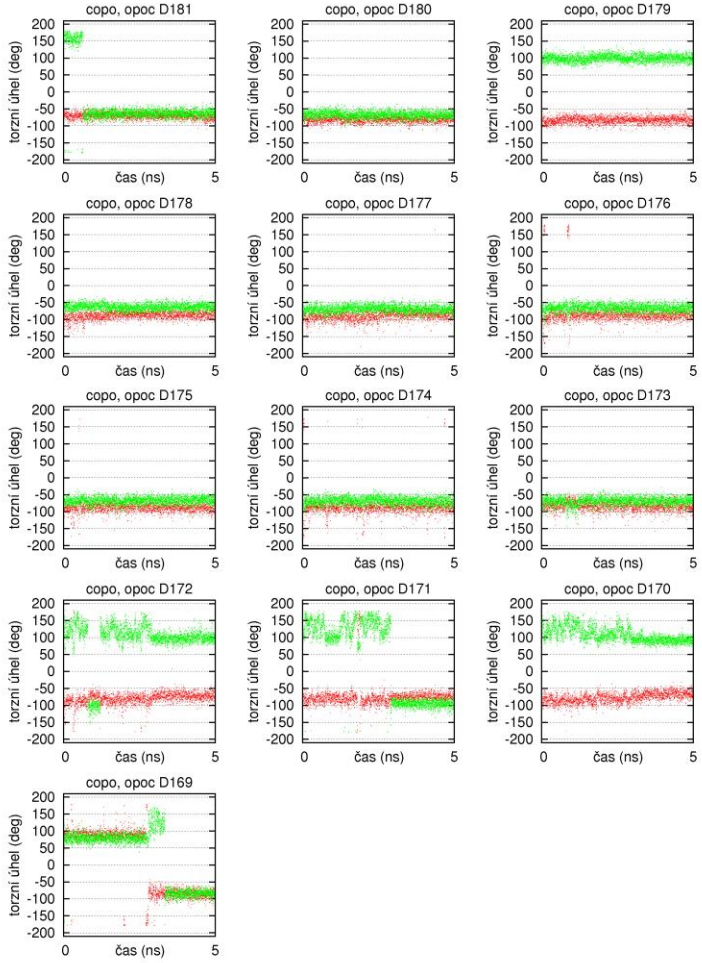
Graf A6: Torzní úhly C3'–O3'–P–O5' (červená) a O3'–P –O5'–C5' (zelená), RNA řetězec, simulace MD_6.



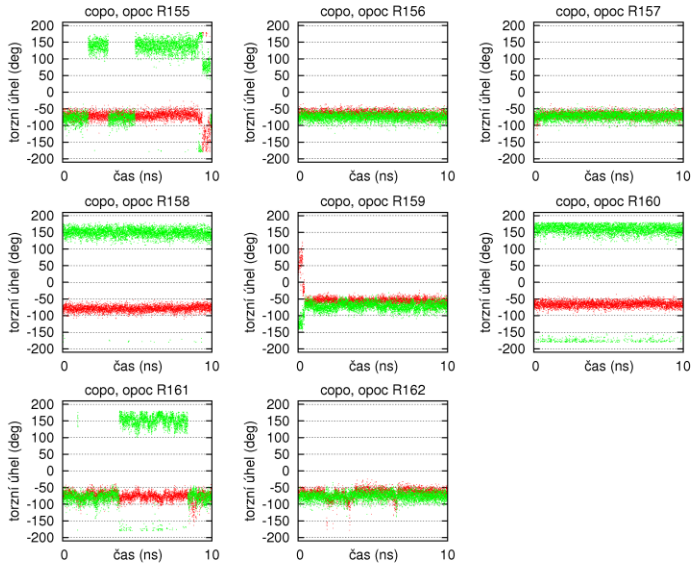
Graf A6: Torzní úhly C3'–O3'–P–O5' (červená) a O3'–P –O5'–C5' (zelená), DNA řetězec, simulace MD_6.



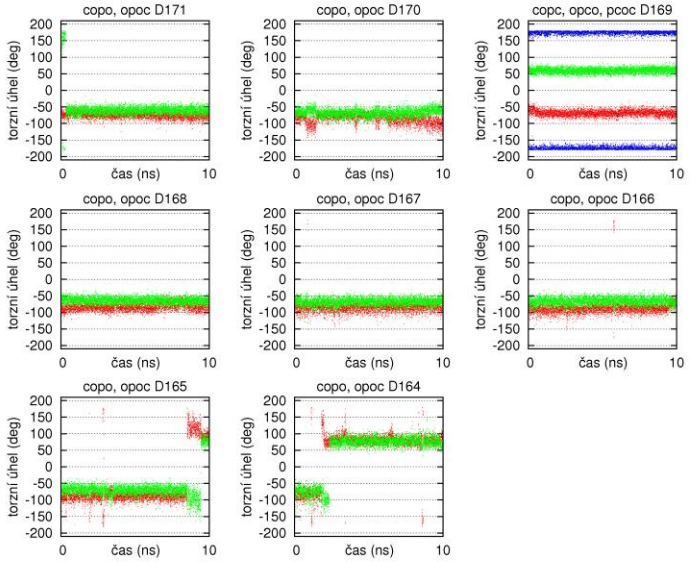
Graf A7: Torzní úhly C3'–O3'–P–O5' (červená) a O3'–P –O5'–C5' (zelená), RNA řetězec, simulace MD_7.



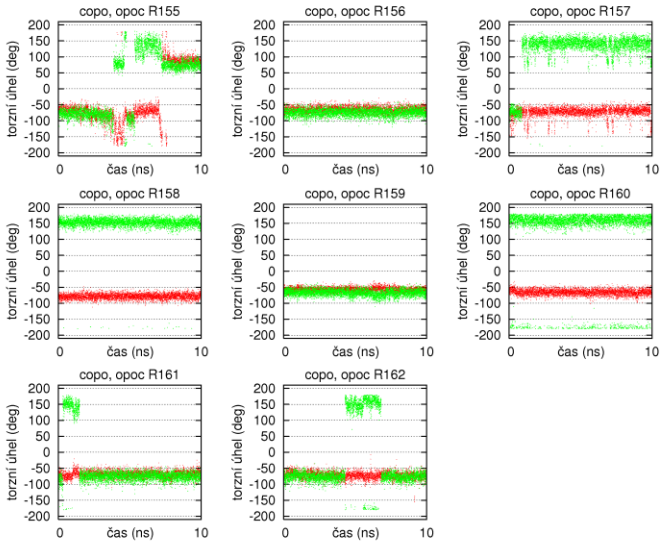
Graf A7: Torzní úhly C3'–O3'–P–O5' (červená) a O3'–P –O5'–C5' (zelená), DNA řetězec, simulace MD_7.



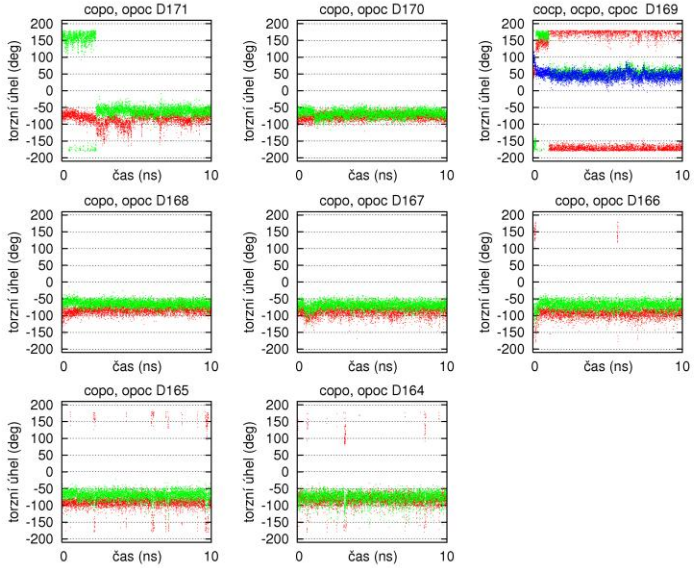
Graf A8: Torzní úhly C3'–O3'–P–O5' (červená) a O3'–P –O5'–C5' (zelená), RNA řetězec, simulace s C3'- O - PO_2 - CH_2 - O - C5' fosfonátovou modifikací v pozici D169.



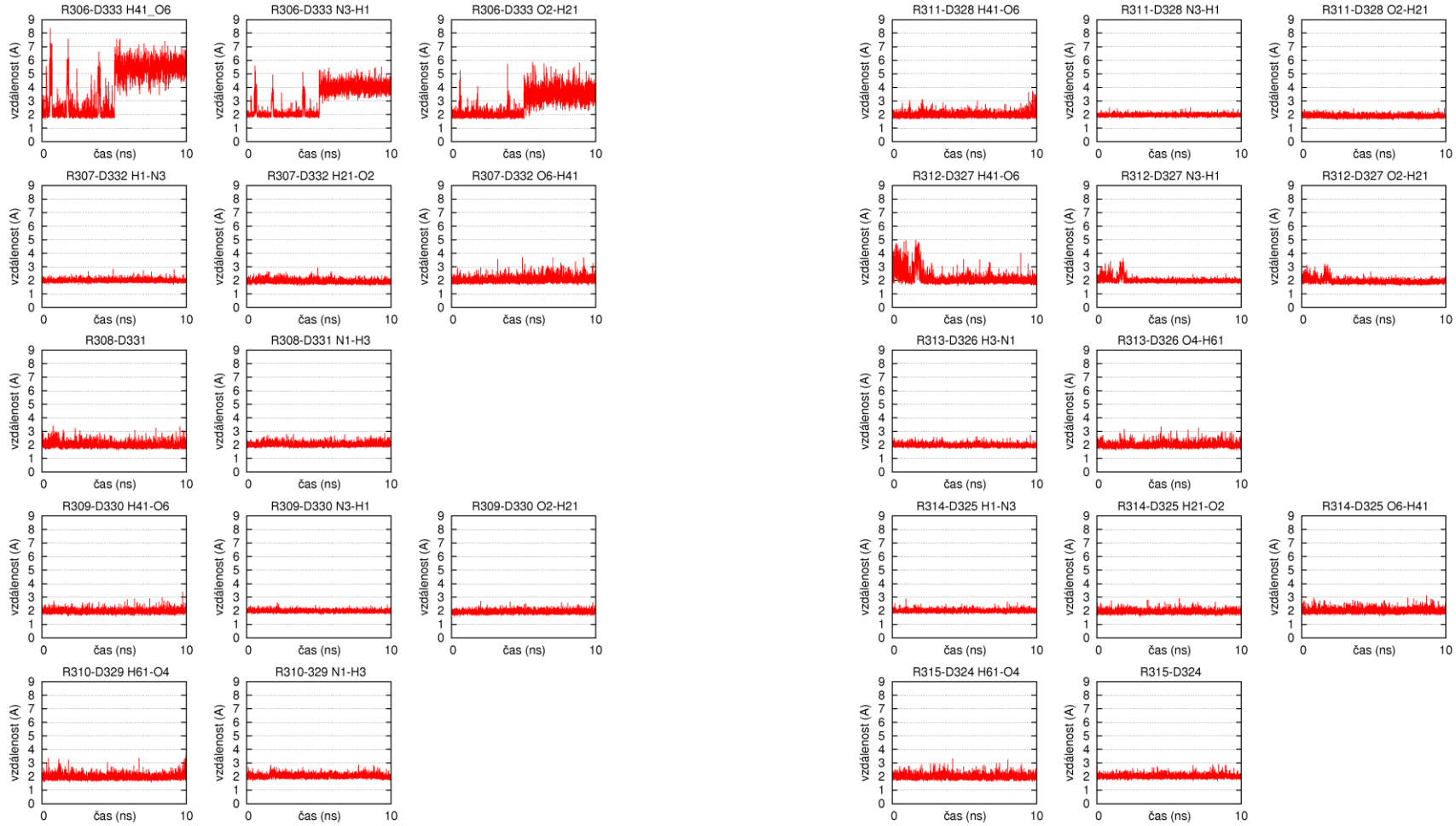
Graf A8: Torzní úhly C3'–O3'–P–O5' (červená) a O3'–P –O5'–C5' (zelená). Pro modifikovanou spojku D169 byly sledovány tři torzní úhly. DNA řetězec, simulace s C3'- O - PO_2 - CH_2 - O - C5' fosfonátovou modifikací v pozici D169.



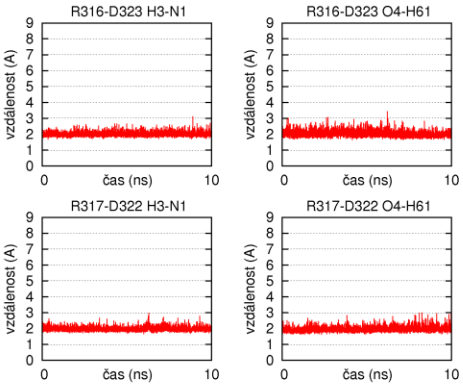
Graf A9: Torzní úhly C3'–O3'–P–O5' (červená) a O3'–P –O5'–C5' (zelená), RNA řetězec, simulace s C3'-O3'-CH_2 -P-O5'-C5' fosfonátovou modifikací v pozici D169.

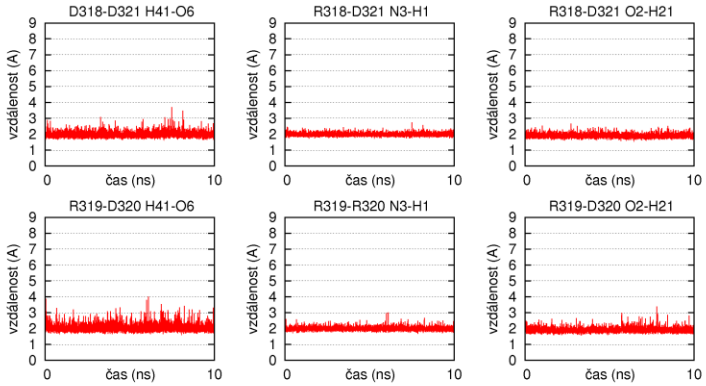


Graf A9: Torzní úhly C3'–O3'–P–O5' (červená) a O3'–P –O5'–C5' (zelená). Pro modifikovanou spojku D169 byly sledovány tři torzní úhly. DNA řetězec, simulace s C3'- O3'-CH_2-PO_2-O5'-C5' fosfonátovou modifikací v pozici D169.

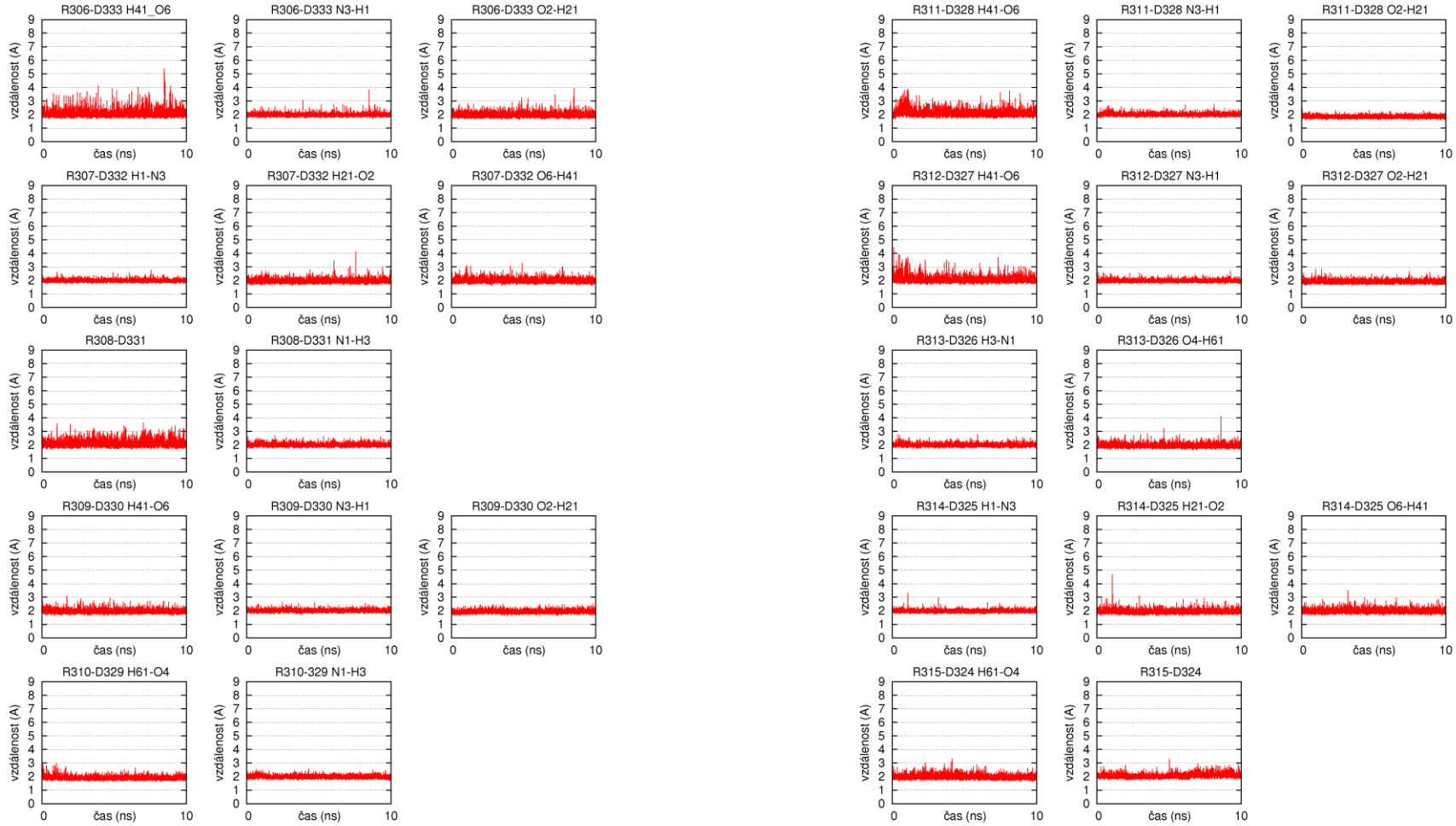


Graf B1: Watson – Crickovy vodíkové vazby mezi bázemi nukleové kyseliny, simulace MD_1, báze R306 – D333 až R315 – D324.

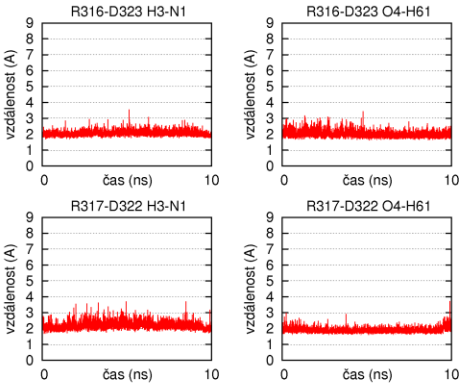


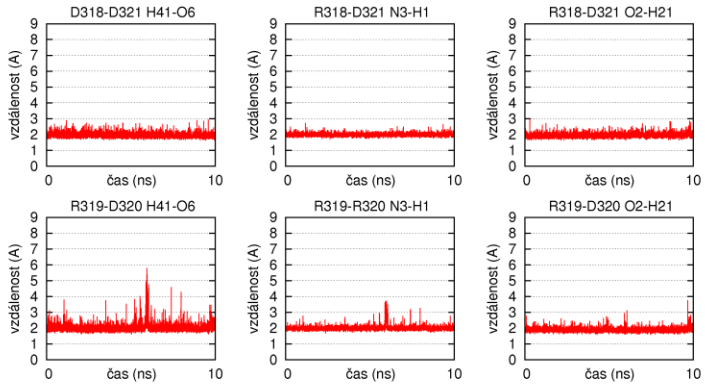


Graf A1 : Watson – Crickovy vodíkové vazby mezi bázemi nukleové kyseliny, simulace MD_1, báze R316 – D323 až R319 – D320.

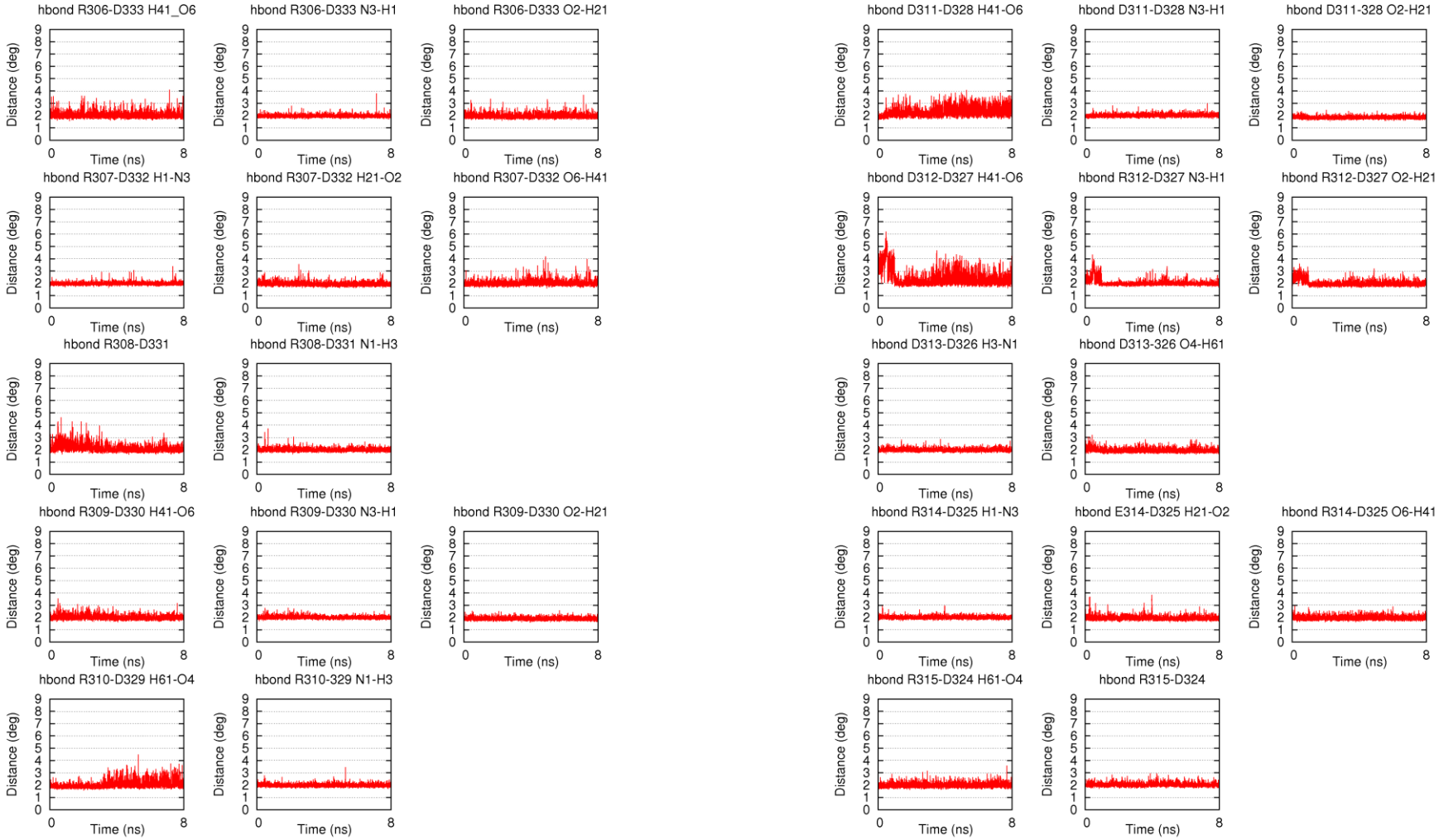


Graf B2 : Watson – Crickovy vodíkové vazby mezi bázemi nukleové kyseliny, simulace MD_2, báze R306 – D333 až R315 – D324.

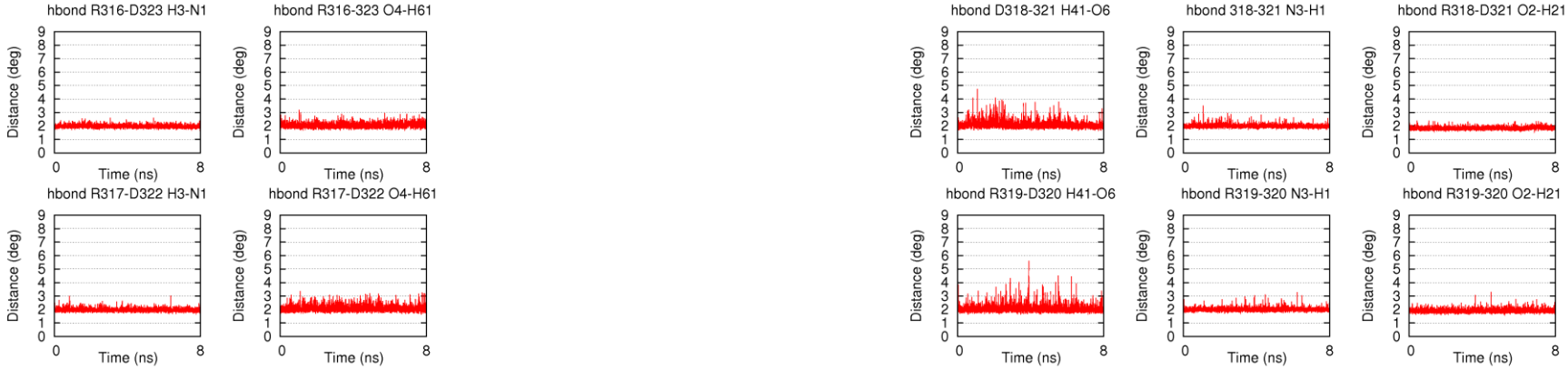




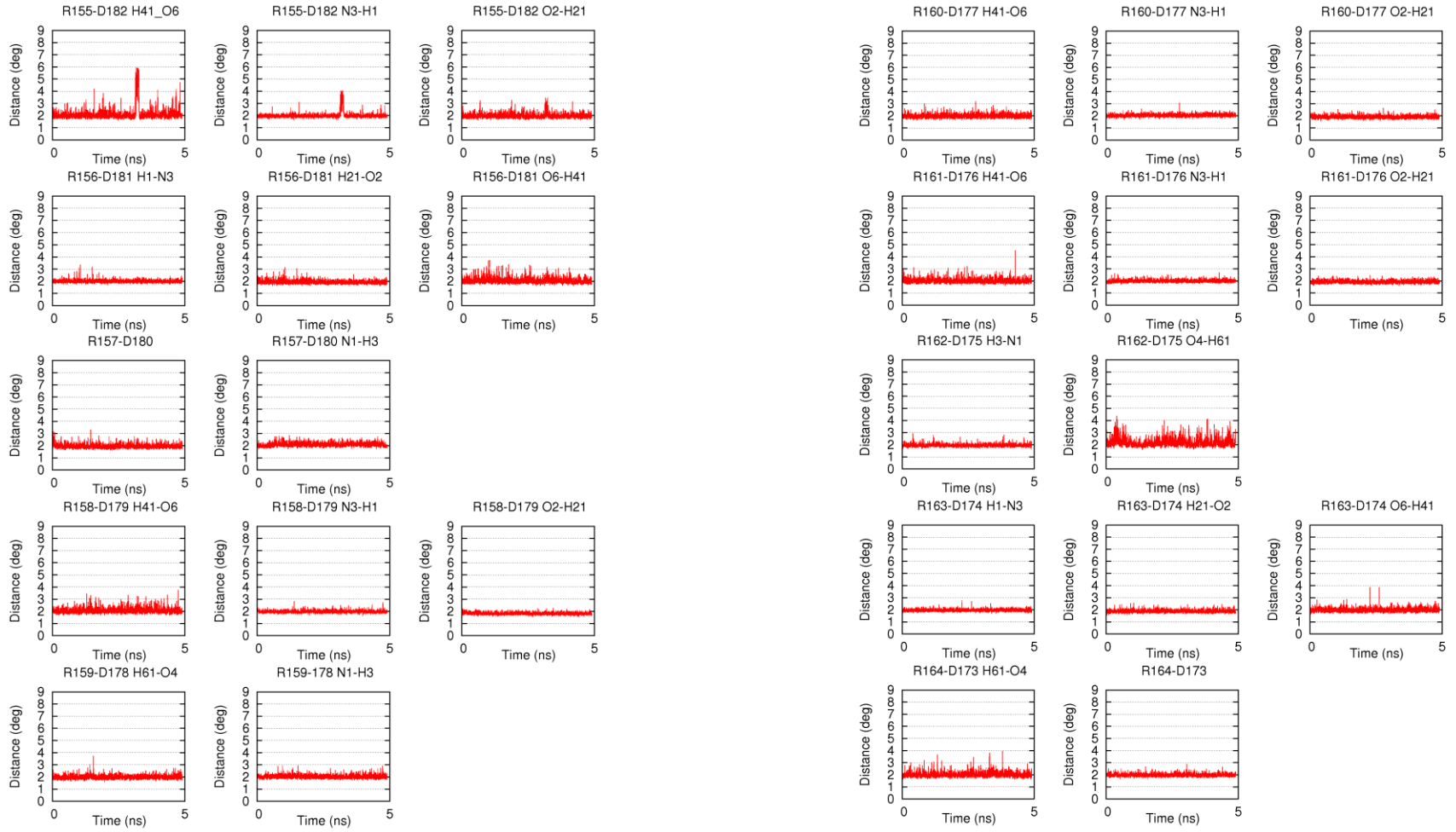
Graf B2: Watson – Crickovy vodíkové vazby mezi bázemi nukleové kyseliny, simulace MD_2, báze R316 – D323 až R319 – D320.



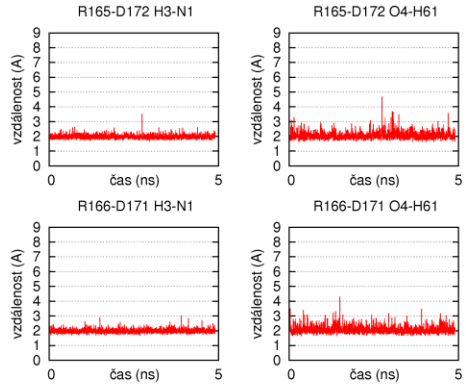
Graf B3: Watson – Crickovy vodíkové vazby mezi bázemi nukleové kyseliny, simulace MD_3, báze R306 – D333 až R315 – D324.

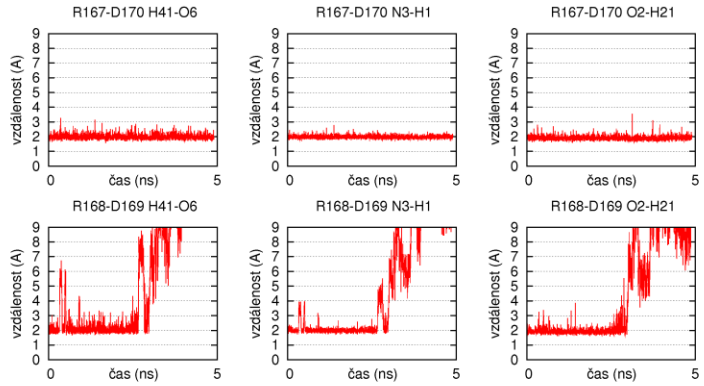


Graf B3: Watson – Crickovy vodíkové vazby mezi bázemi nukleové kyseliny, simulace MD_3, báze R316 – D323 až R319 – D320.

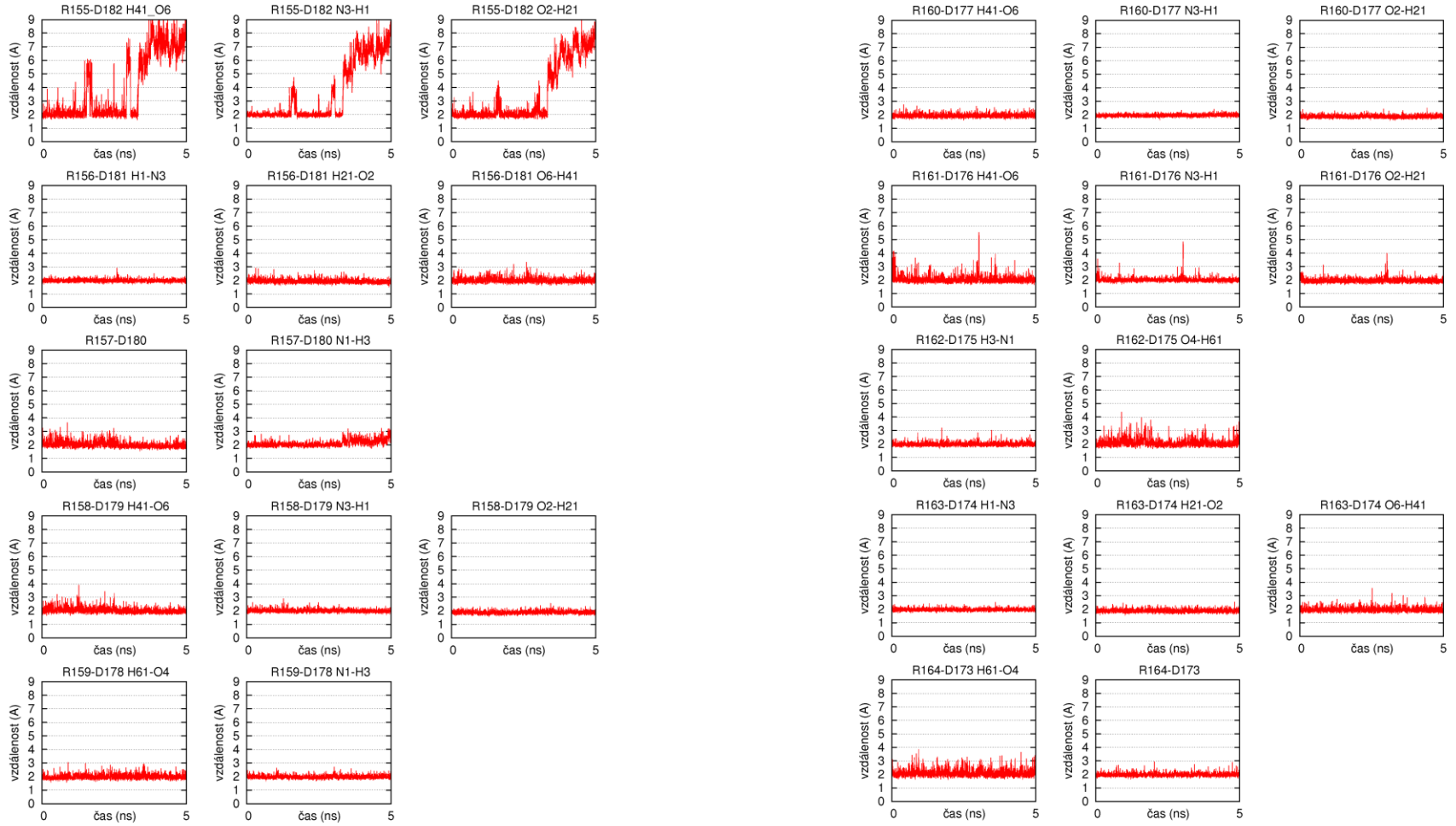


Graf B4: Watson – Crickovy vodíkové vazby mezi bázemi nukleové kyseliny, simulace MD_4, báze R155 – D182 až R164 – D173.

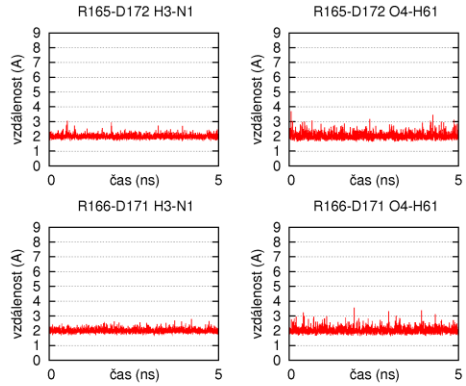


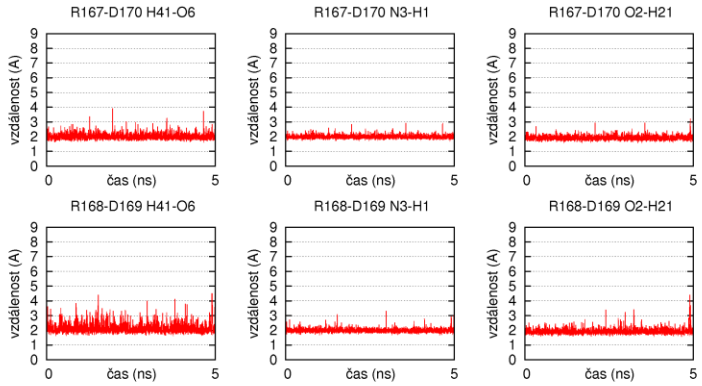


Graf B4: Watson – Crickovy vodíkové vazby mezi bázemi nukleové kyseliny, simulace MD_4, báze R165 – D172 až R168 – D169.

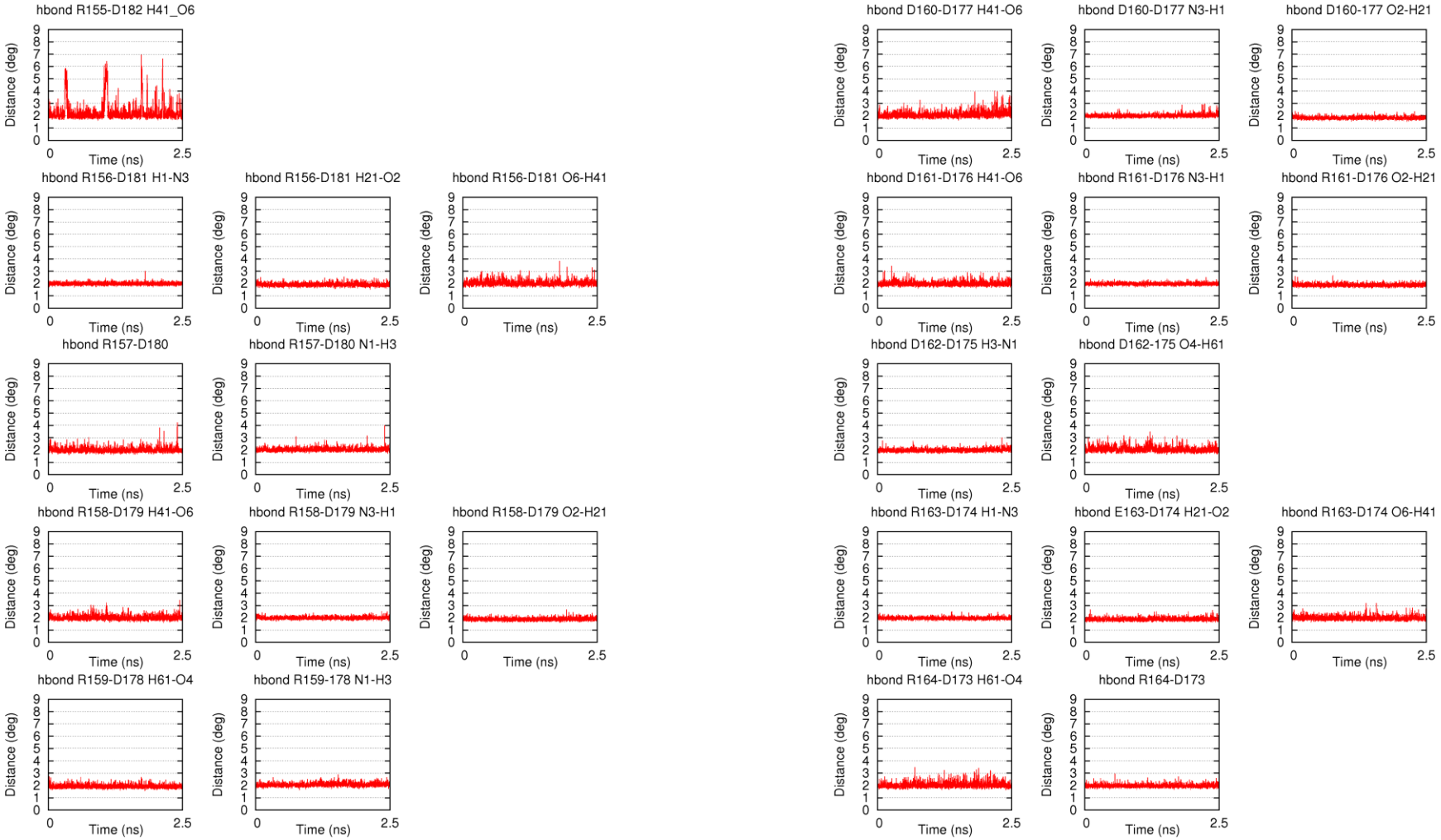


Graf B5: Watson – Crickovy vodíkové vazby mezi bázemi nukleové kyseliny, simulace MD_5, báze R155 – D182 až R164 – D173.

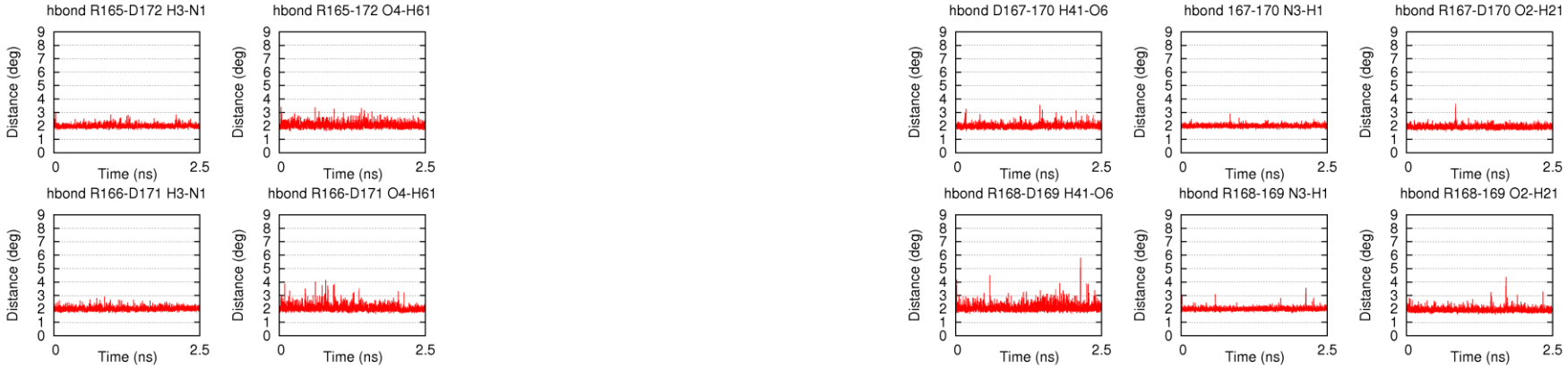




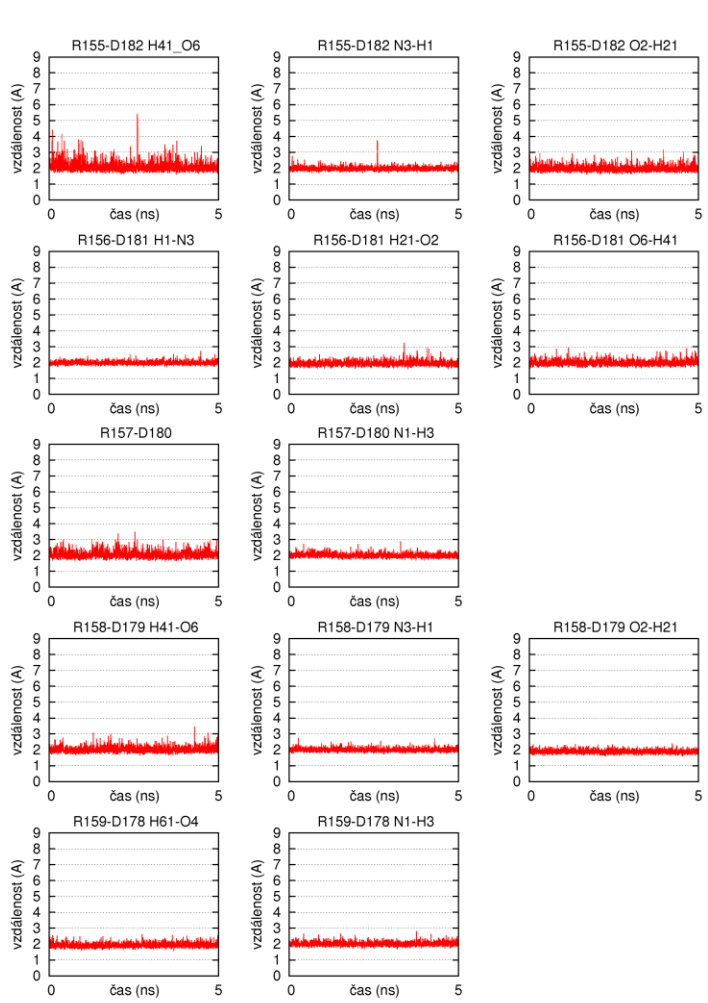
Graf B5: Watson – Crickovy vodíkové vazby mezi bázemi nukleové kyseliny, simulace MD_5, báze R165 – D172 až R168 – D169.

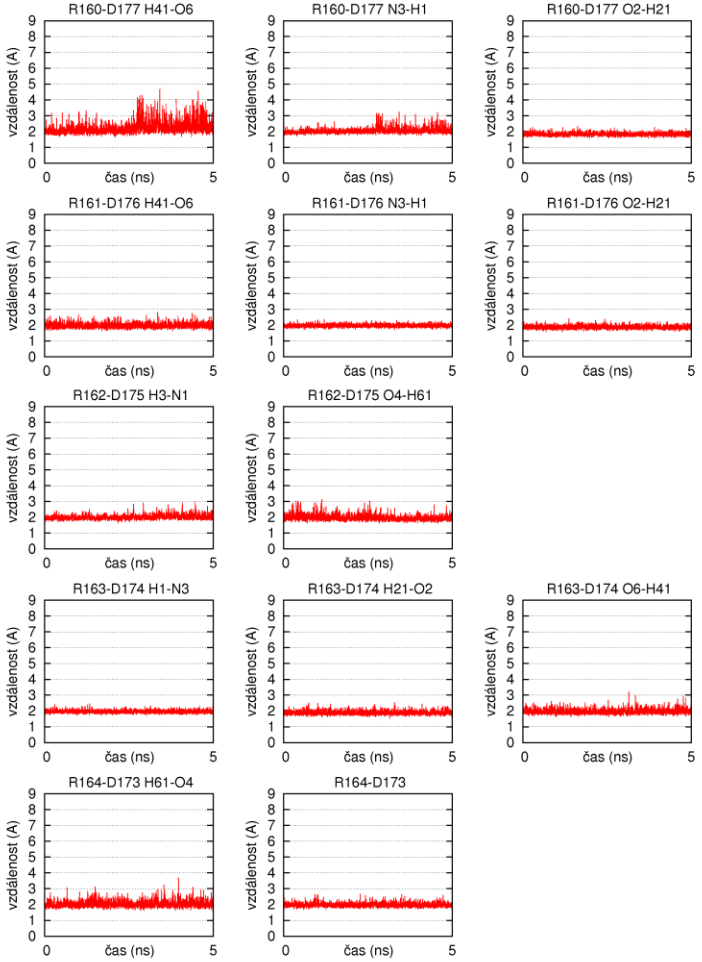


Graf B6: Watson – Crickovy vodíkové vazby mezi bázemi nukleové kyseliny, simulace MD_6, báze R155 – D182 až R164 – D173.

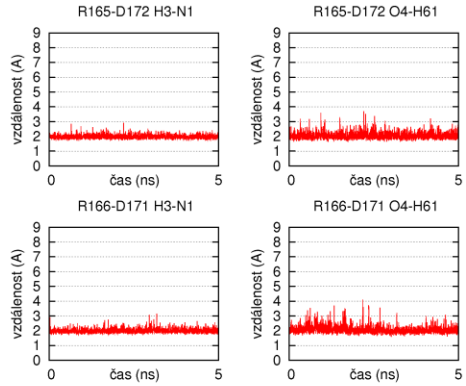


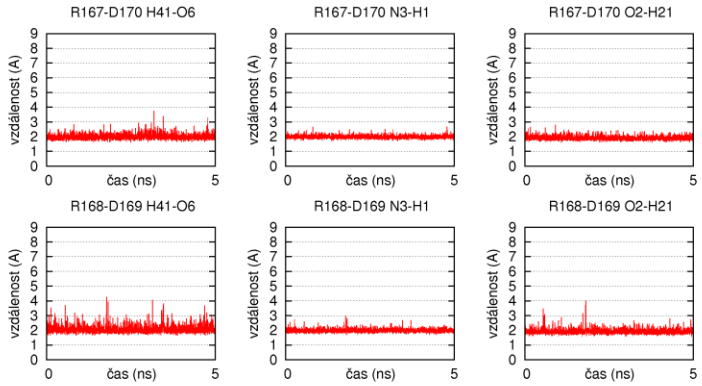
Graf B6: Watson – Crickovy vodíkové vazby mezi bázemi nukleové kyseliny, simulace MD_6, báze R165 – D172 až R168 – D169.



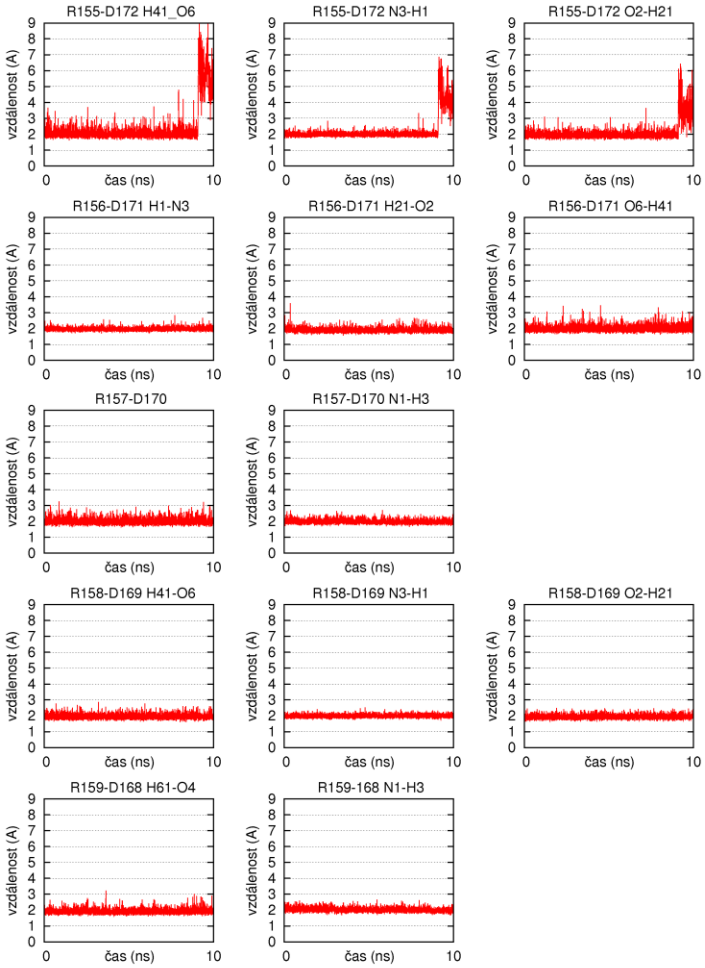


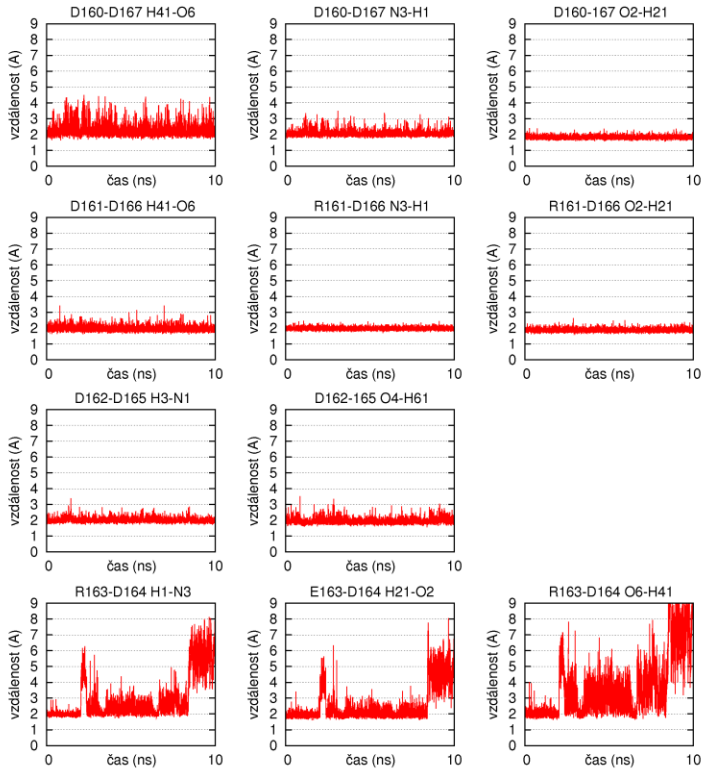
Graf B7: Watson – Crickovy vodíkové vazby mezi bázemi nukleové kyseliny, simulace MD_7, báze R155 – D182 až R164 – D173.



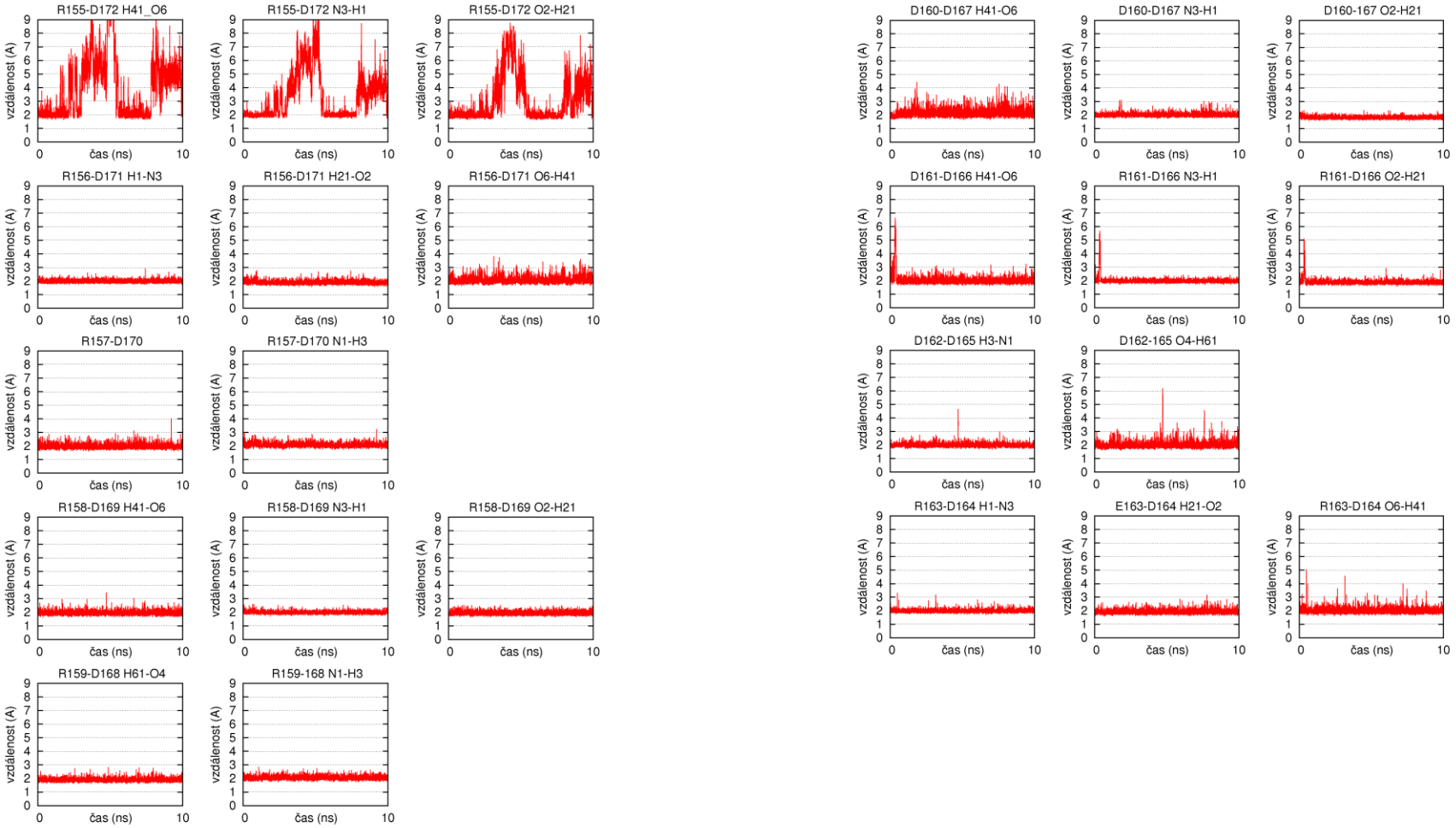


Graf B7: Watson – Crickovy vodíkové vazby mezi bázemi nukleové kyseliny, simulace MD_7, báze R165 – D172 až R168 – D169.

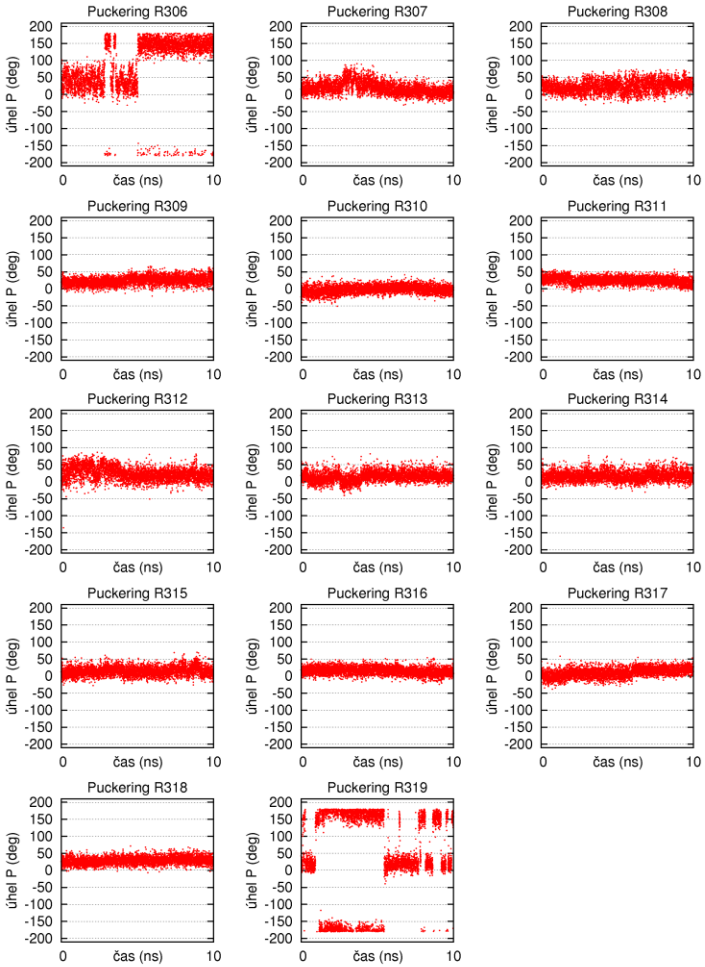




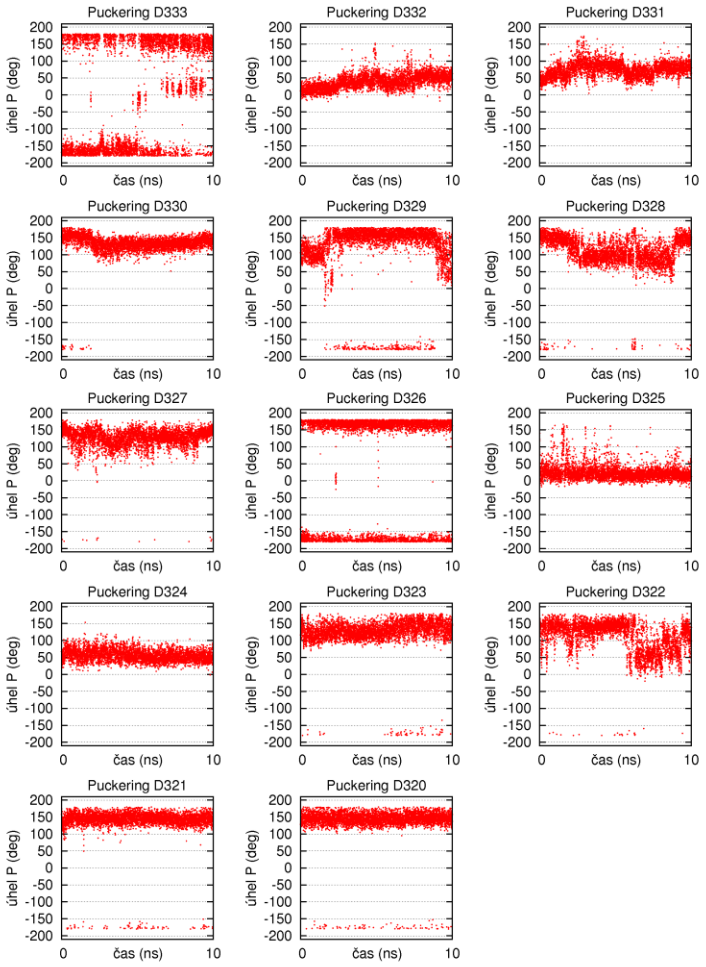
Graf B8: Watson – Crickovy vodíkové vazby mezi bázemi nukleové kyseliny, simulace MD_8, báze R155 – D172 až R163 – D164.



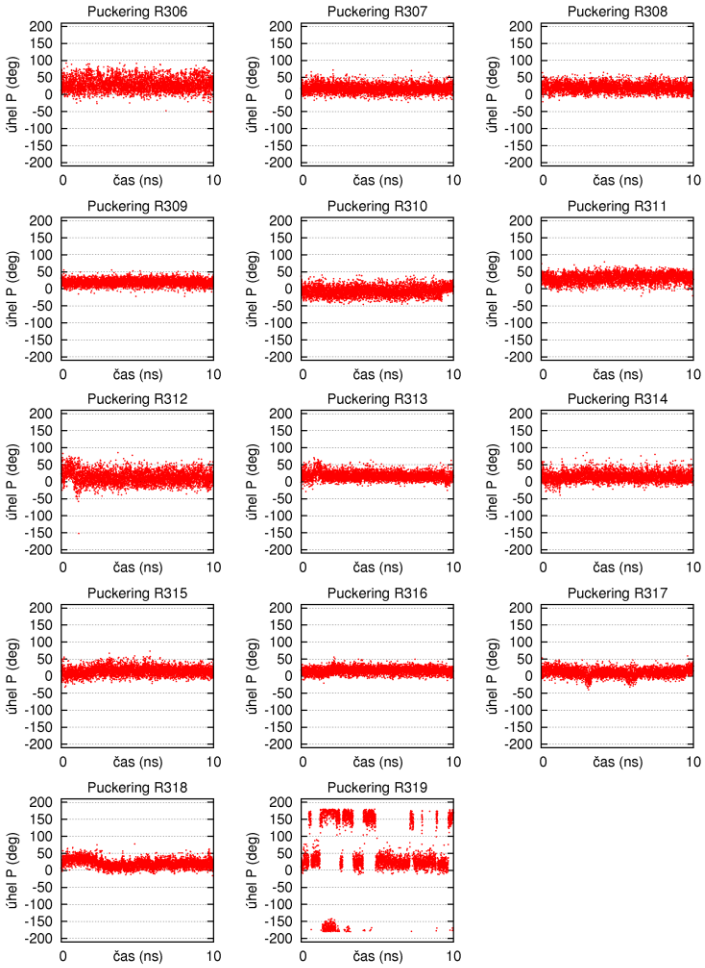
Graf B9: Watson – Crickovy vodíkové vazby mezi bázemi nukleové kyseliny, simulace MD_9, báze R155 – D172 až R163 – D164.



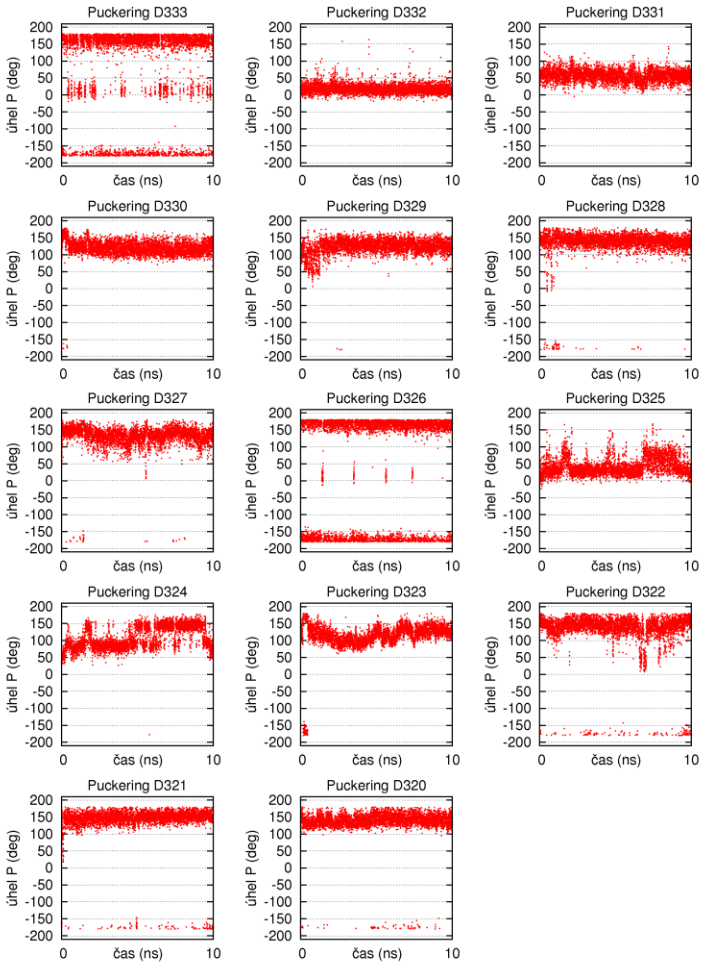
Graf C1: Puckering RNA vlákna, simulace MD_1.



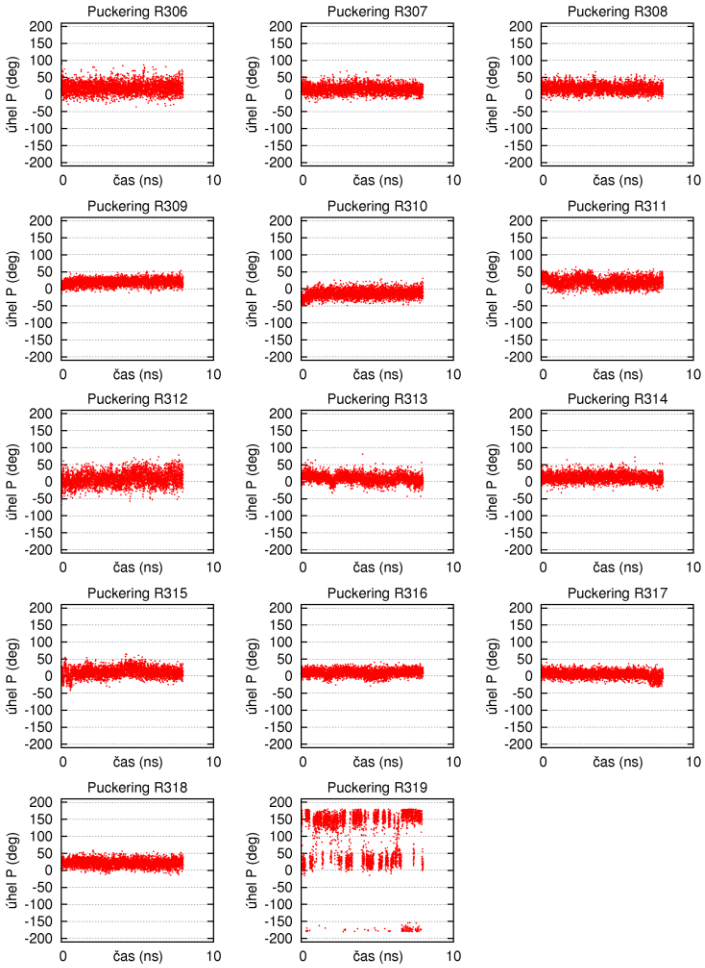
Graf C1: Puckering DNA vlákna, simulace MD_1.



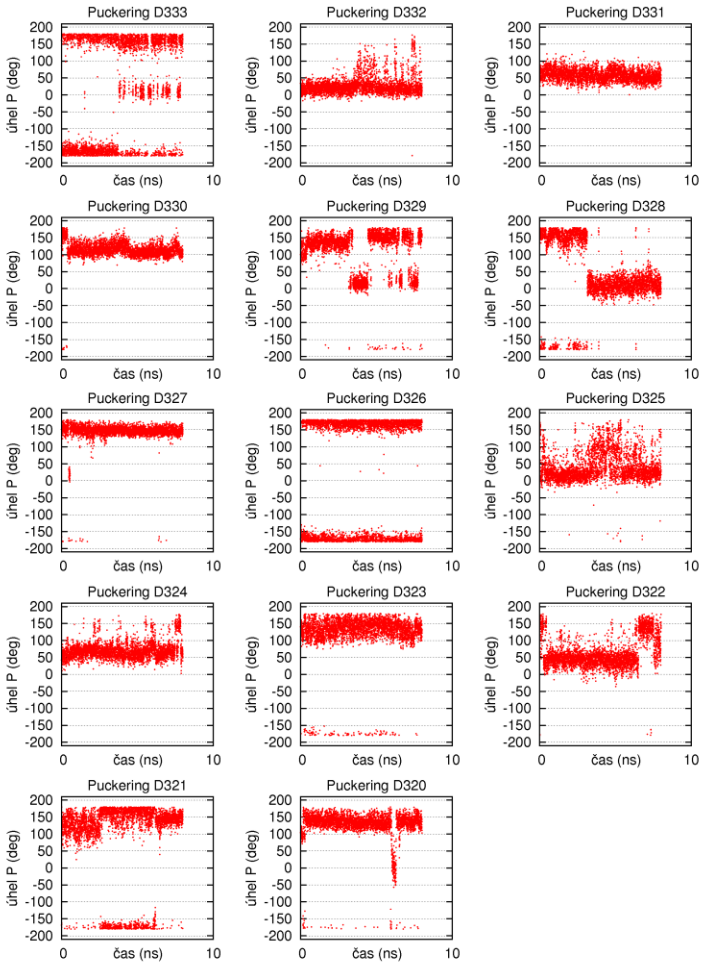
Graf A2: Puckering RNA vlákna simulace MD_2.



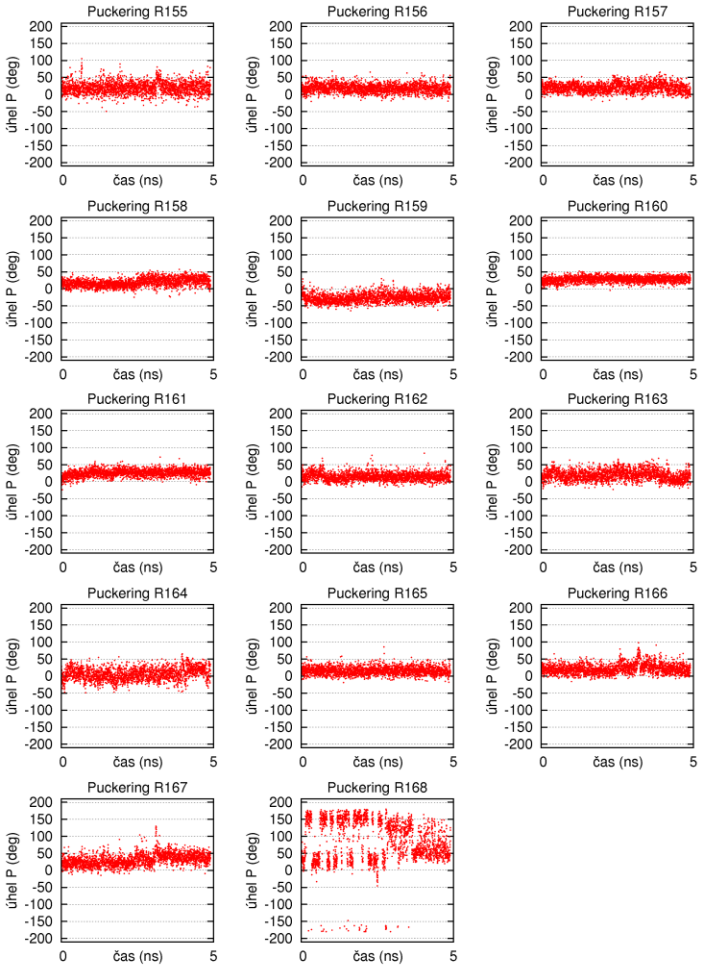
Graf C2: Puckering DNA vlákna, simulace MD_2.



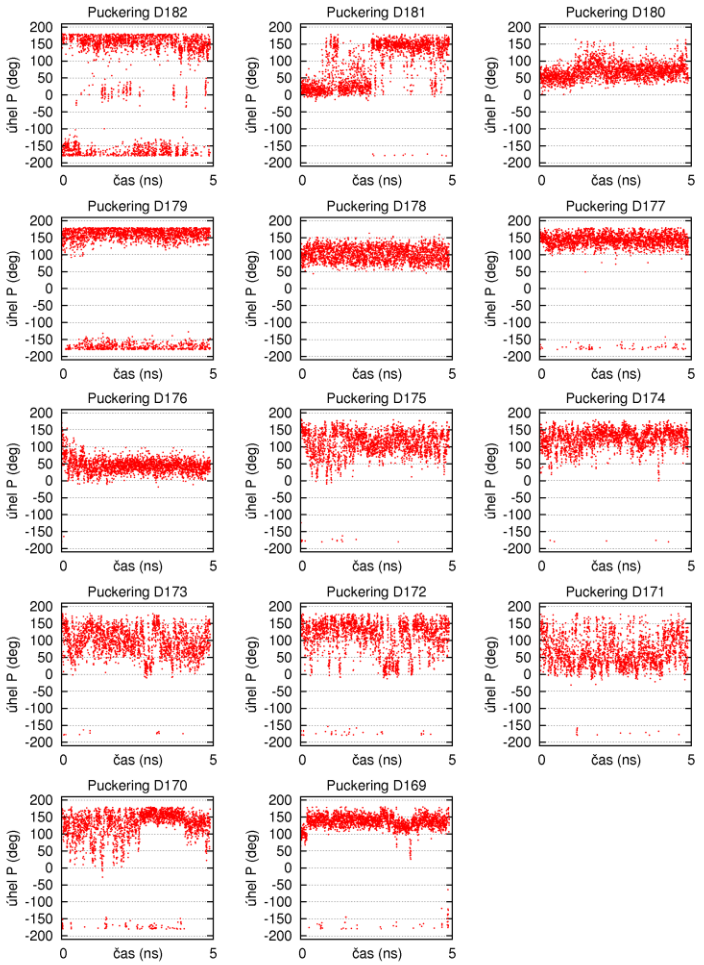
Graf C3: Puckering RNA vlákna simulace MD_3.



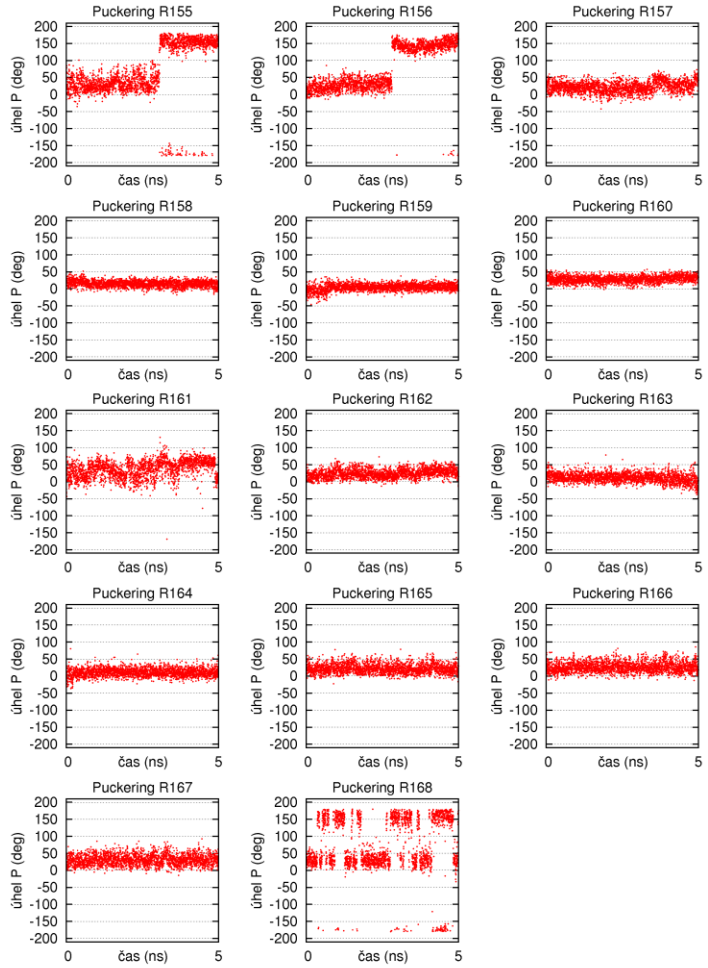
Graf C3: Puckering DNA vlákna, simulace MD_3.



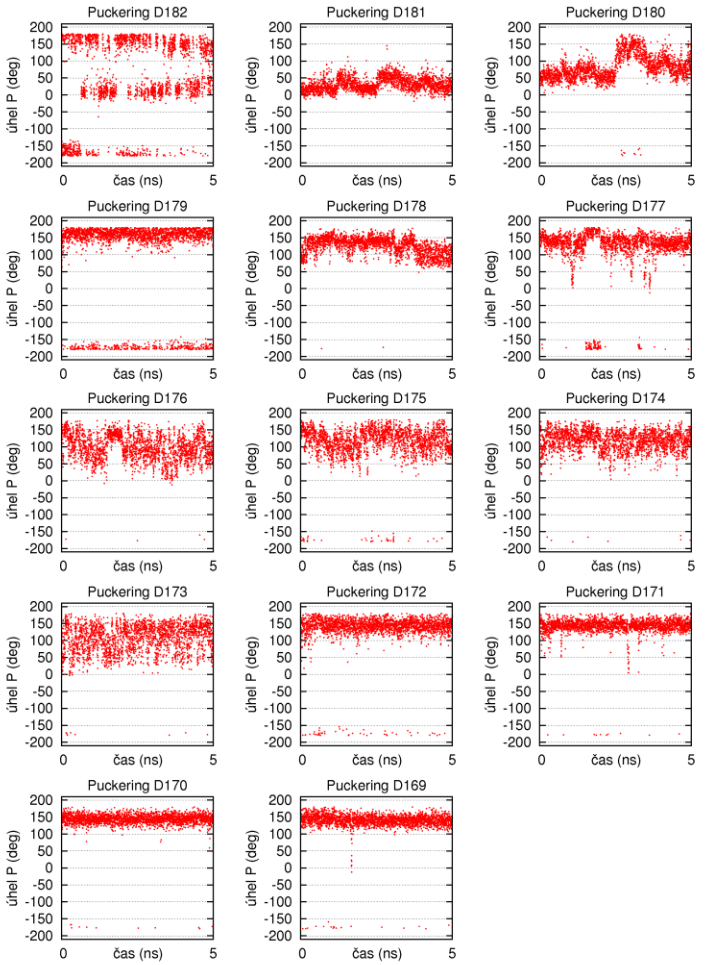
Graf C4: Puckering RNA vlákna simulace MD_4.



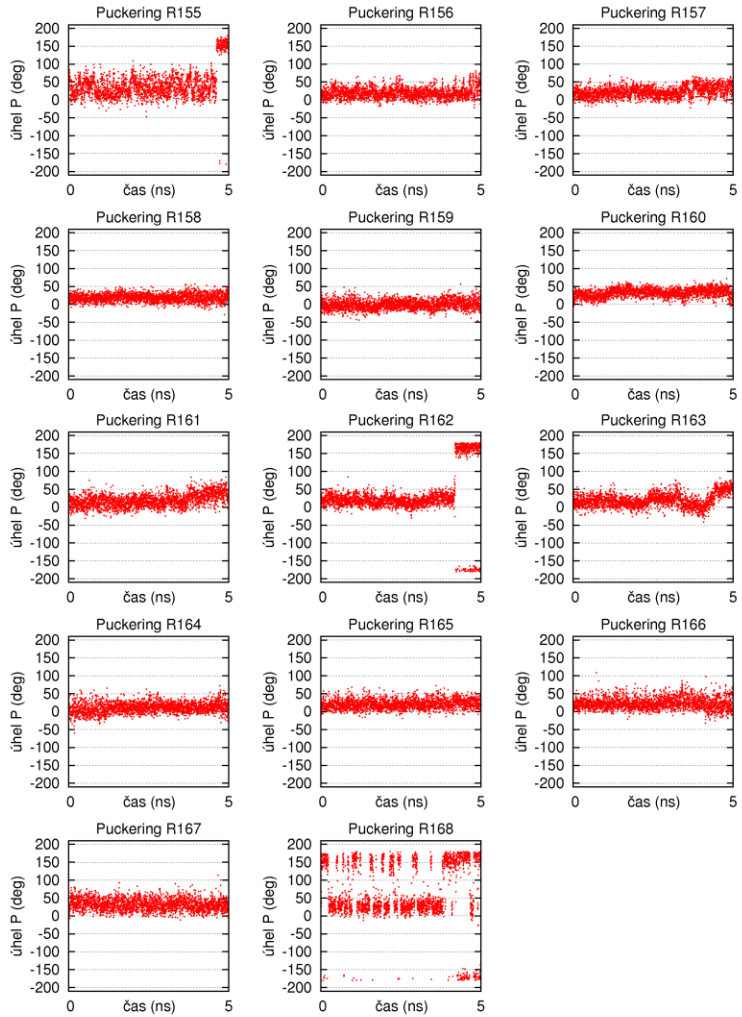
Graf C4: Puckering DNA vlákna, simulace MD_4.



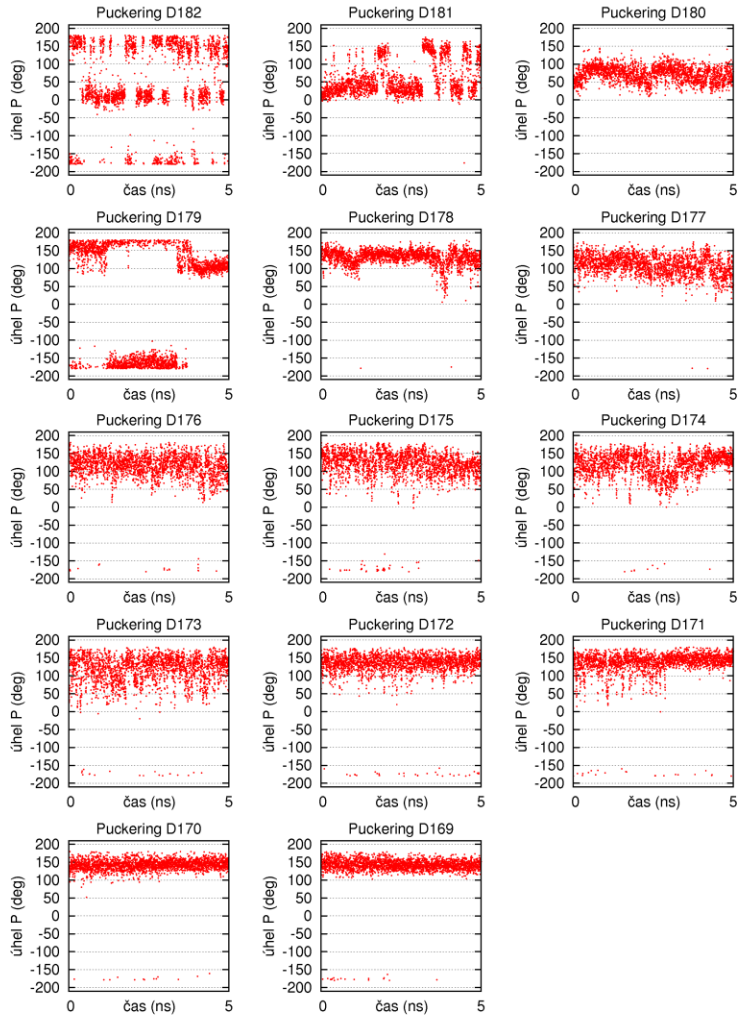
Graf C5: Puckering RNA vlákna, simulace MD_5.



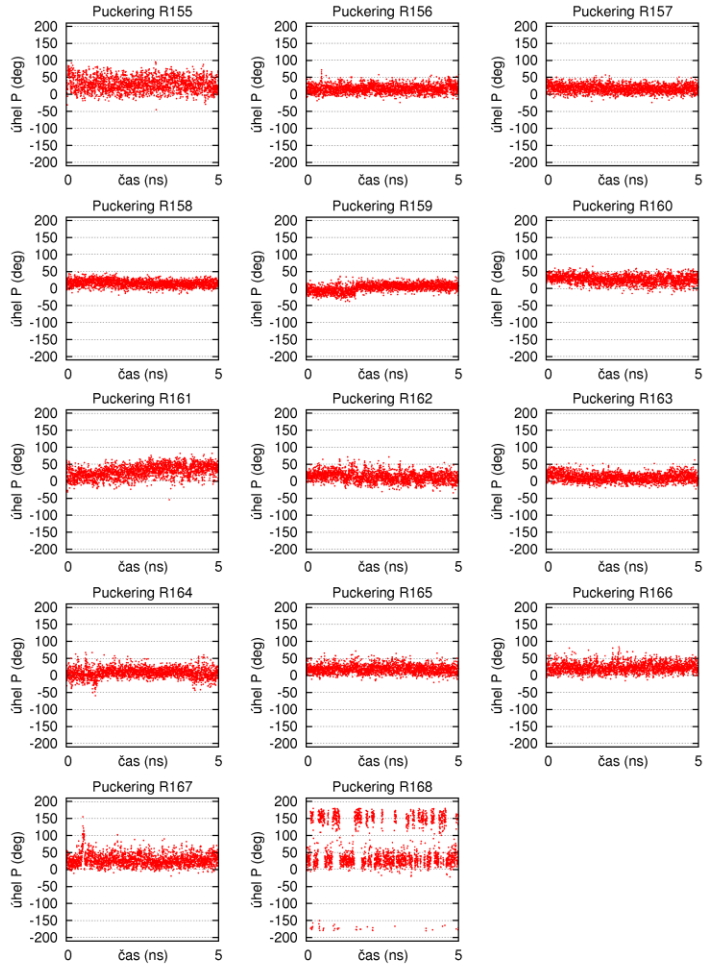
Graf C5: Puckering DNA vlákna, simulace MD_5.



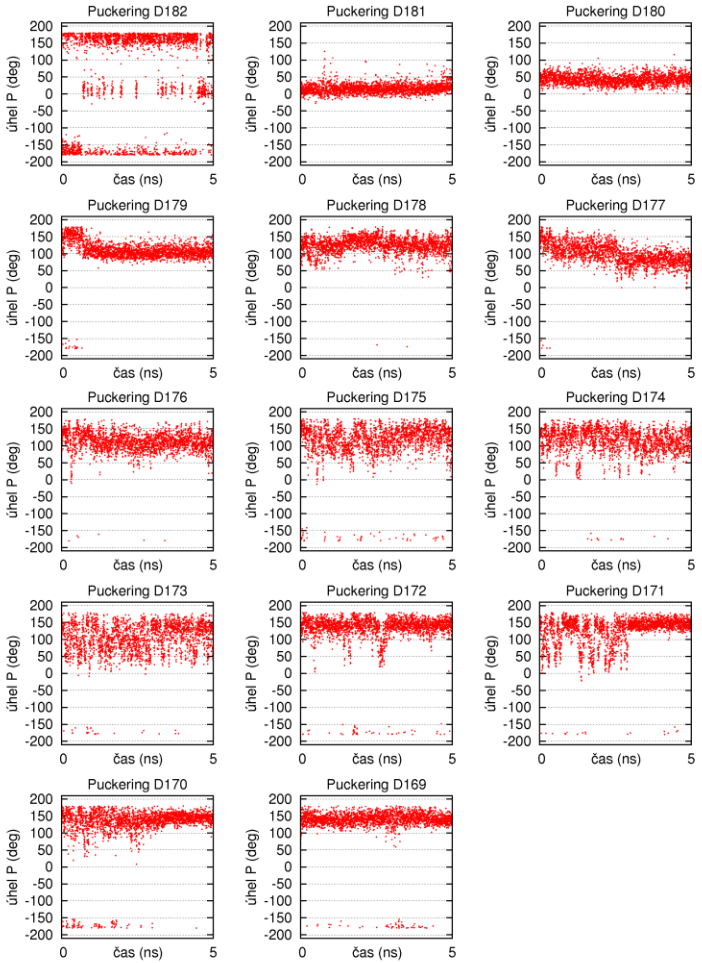
Graf C6: Puckering RNA vlákna, simulace MD_6.



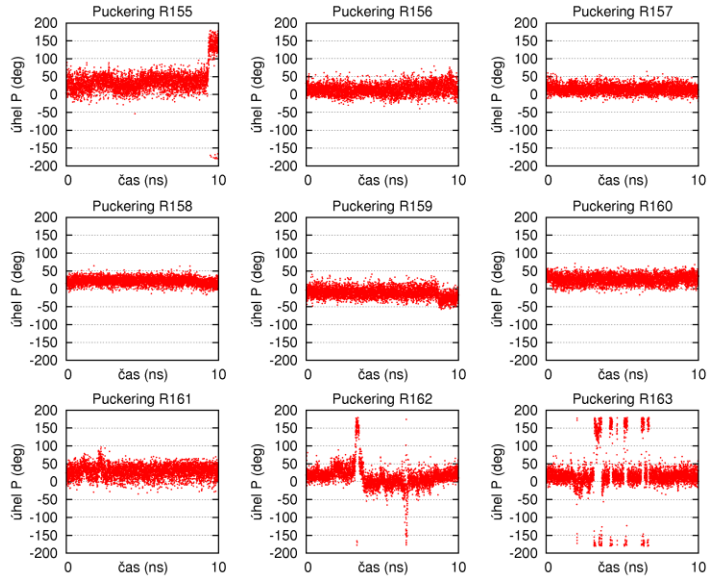
Graf C6: Puckering DNA vlákna, simulace MD_6.



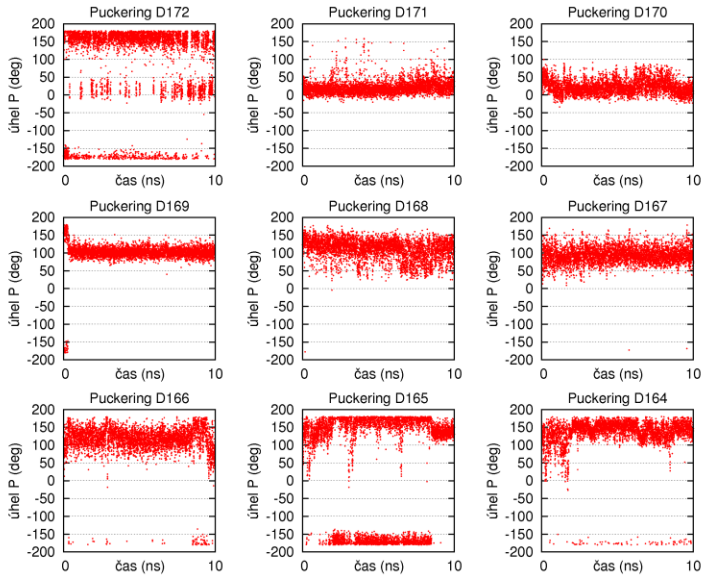
Graf C7: Puckering RNA vlákna simulace MD_7.



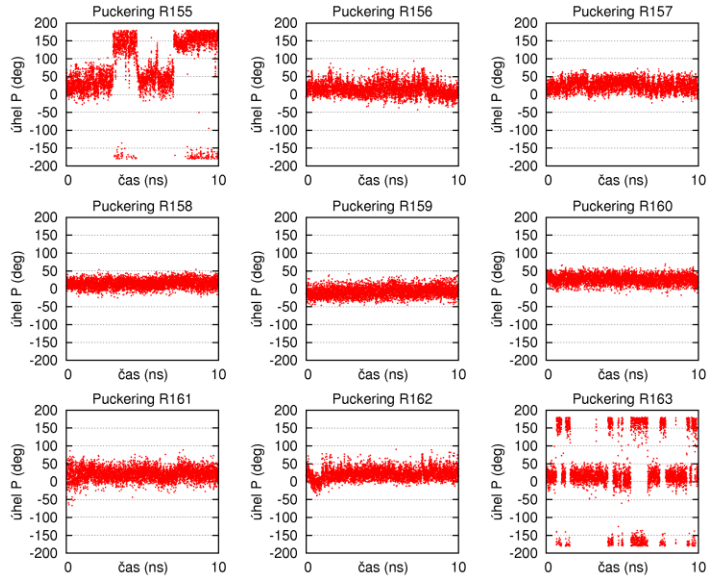
Graf C7: Puckering DNA vlákna,simulace MD_7.



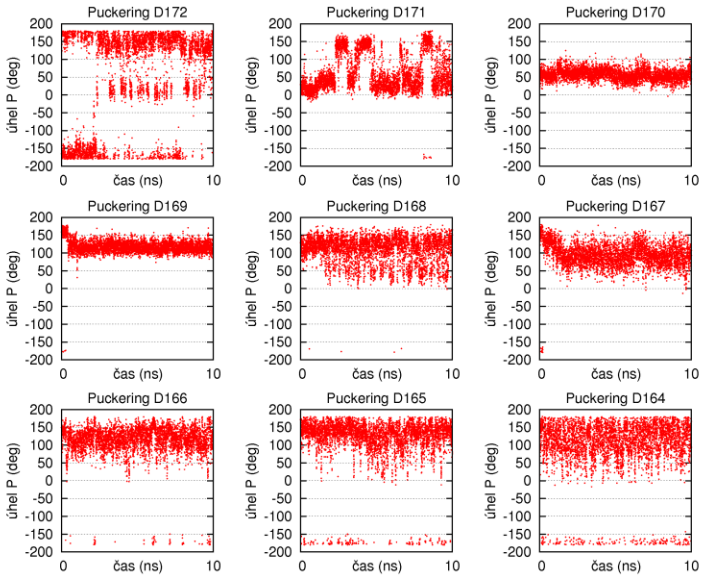
Graf C8: Puckering RNA vlákna simulace s C3'-O3'-CH_2 -P-O5'-C5' fosfonátovou modifikací v pozici D169.



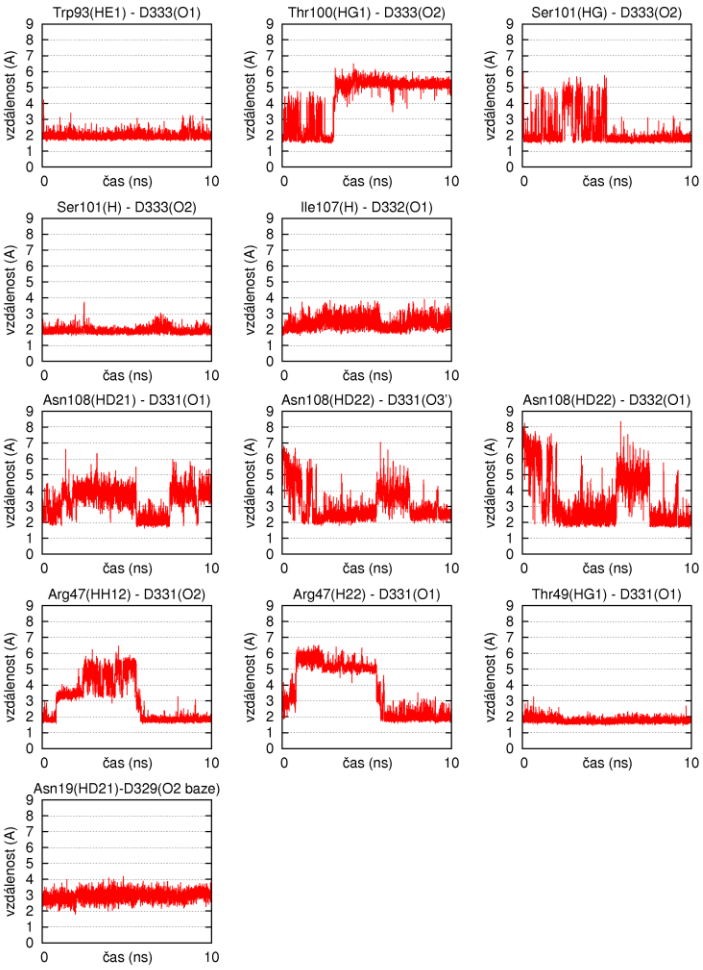
Graf C8: Puckering DNA vlákna,simulace s s C3'-O3'-CH_2 -P-O5'-C5' fosfonátovou modifikací v pozici D169.



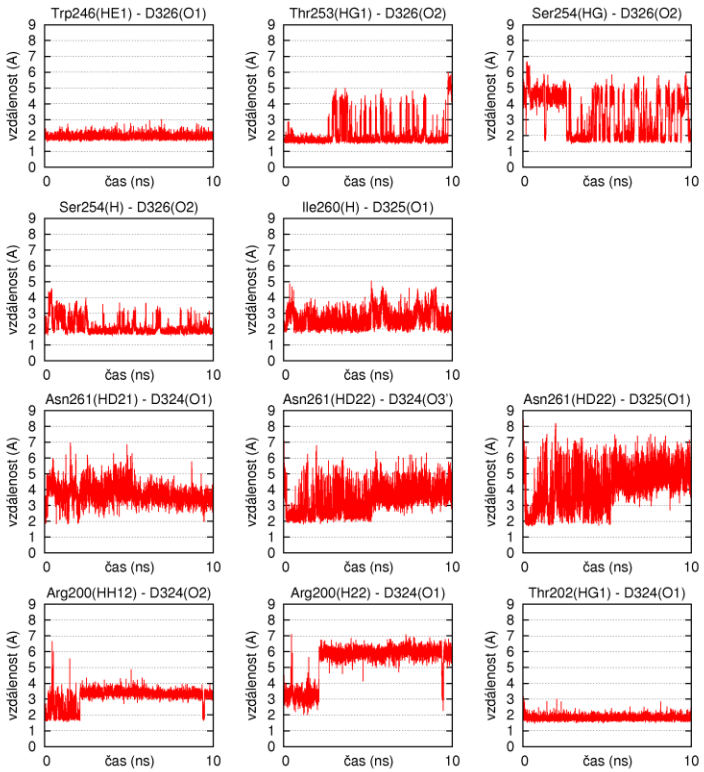
Graf C9: Puckering RNA vlákna,simulace C3'- O - PO_2 - CH_2 - O - C5' fosfonátovou modifikací v pozici D169.



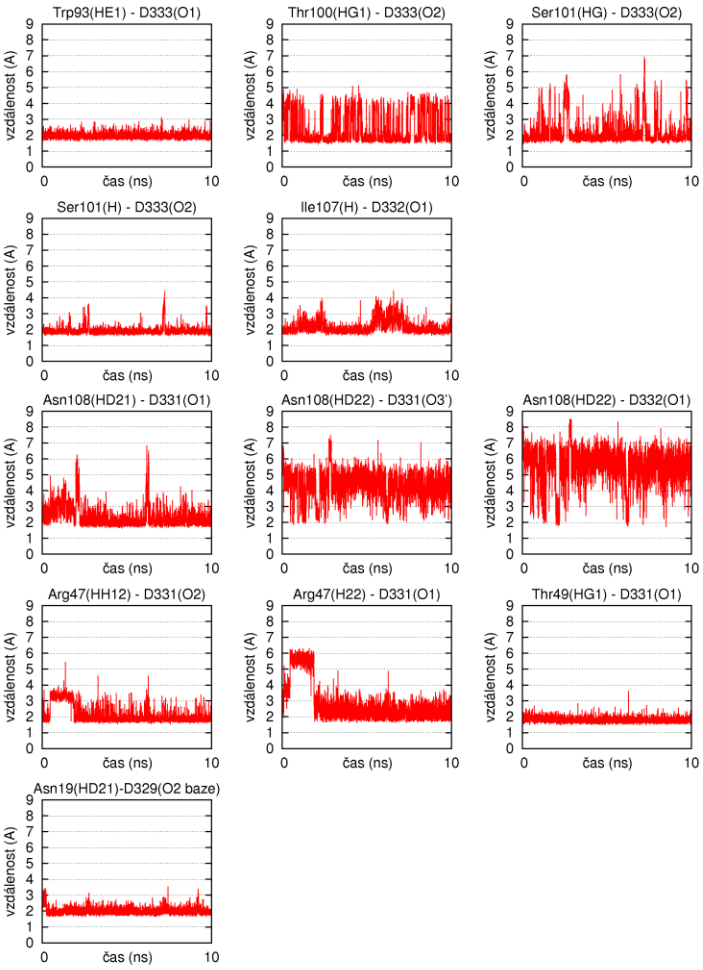
Graf C9: Puckering DNA vlákna,simulace C3'- O - PO_2 - CH_2 - O - C5' fosfonátovou modifikací v pozici D169.



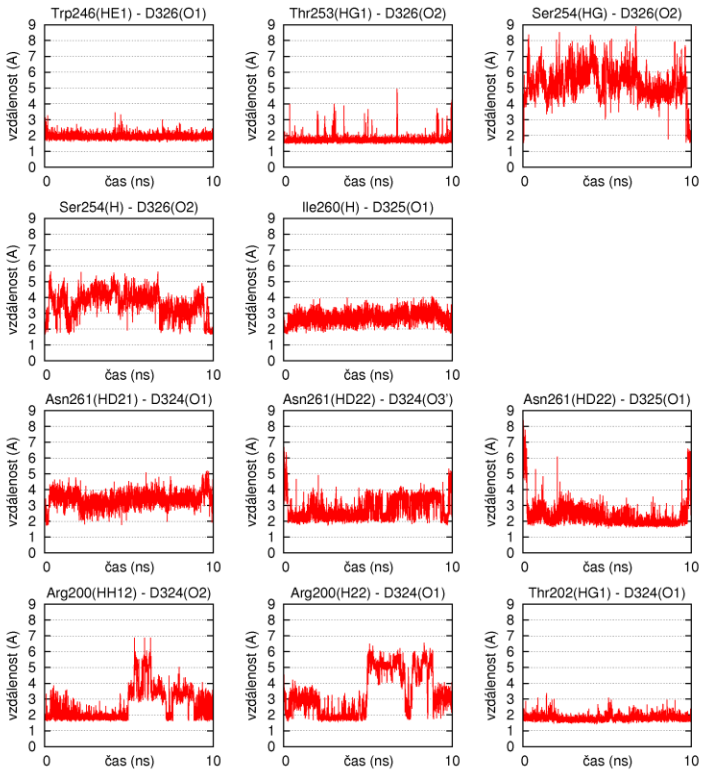
Graf D1: Vazba první domény RNase H na DNA řetězec nukleové kyseliny, simulace MD_1.



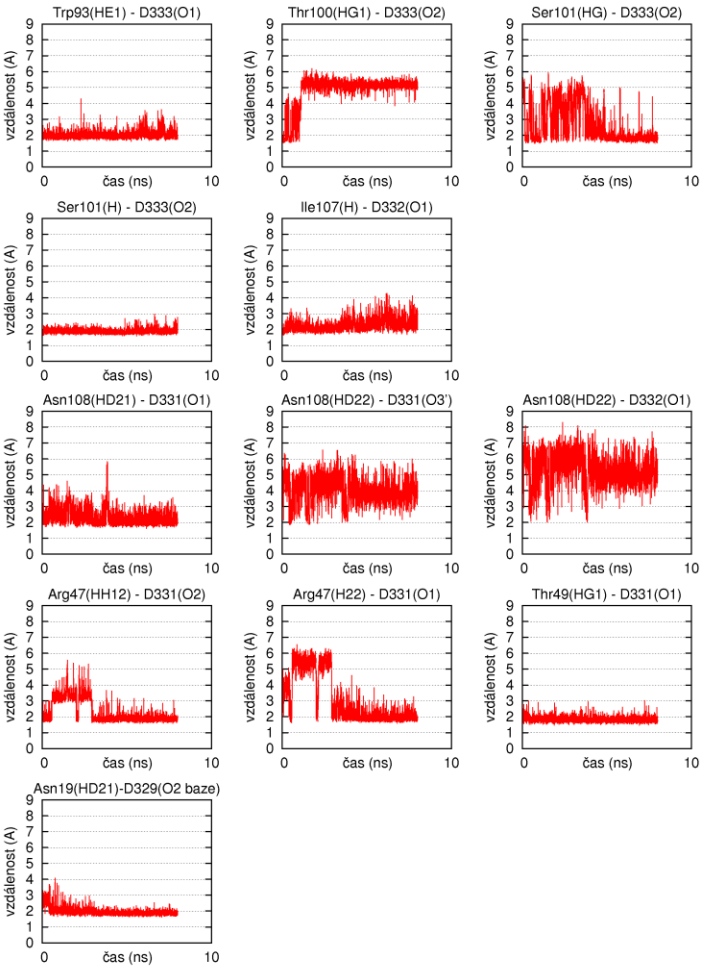
Graf D1: Vazba druhé domény RNase H na DNA řetězec nukleové kyseliny, simulace MD_1.



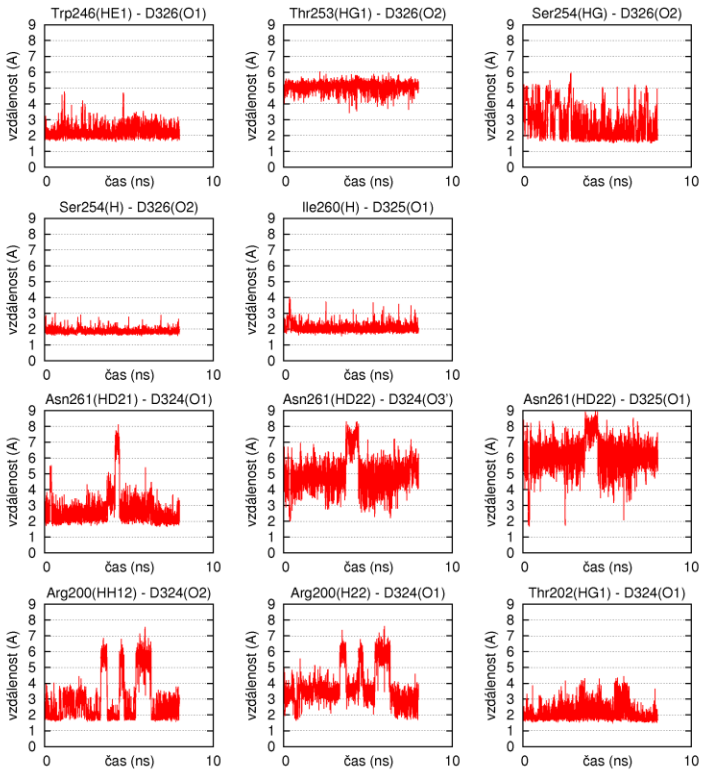
Graf D2: Vazba první domény RNase H na DNA řetězec nukleové kyseliny, simulace MD_2.



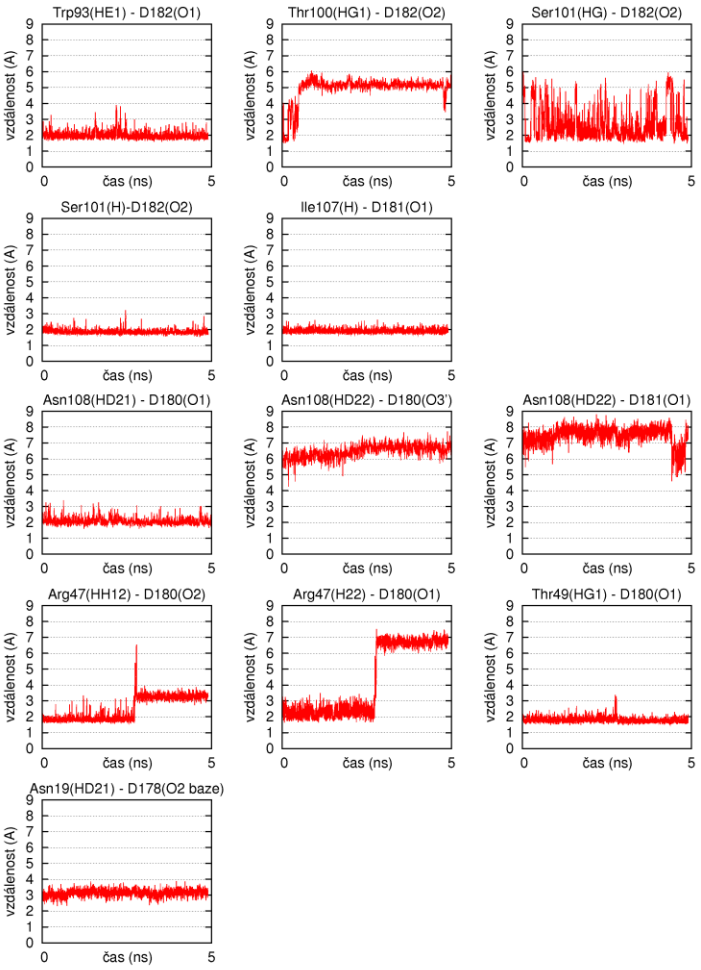
Graf A2: Vazba druhé domény RNase H na DNA řetězec nukleové kyseliny, simulace MD_2.



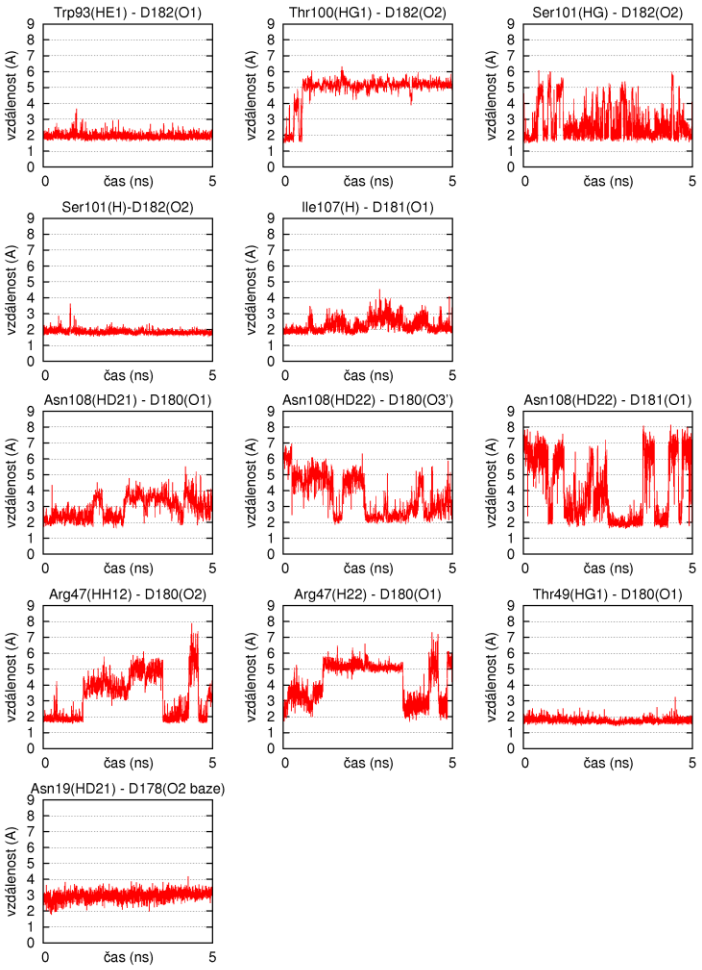
Graf D3: Vazba první domény RNase H na DNA řetězec nukleové kyseliny, simulace MD_3.



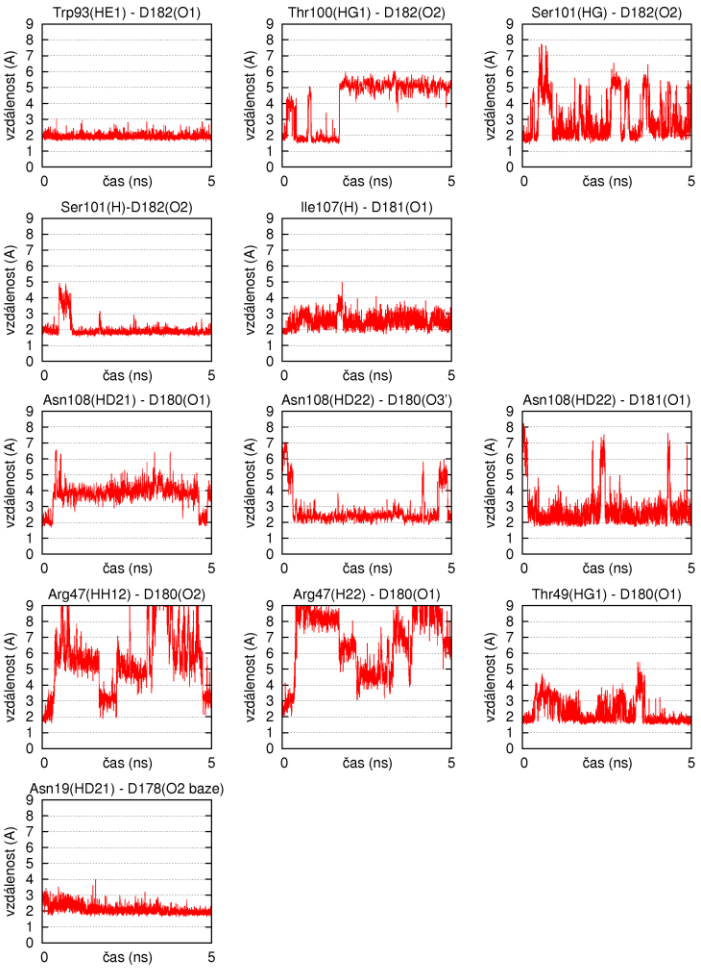
Graf D3: Vazba druhé domény RNase H na DNA řetězec nukleové kyseliny, simulace MD_3.



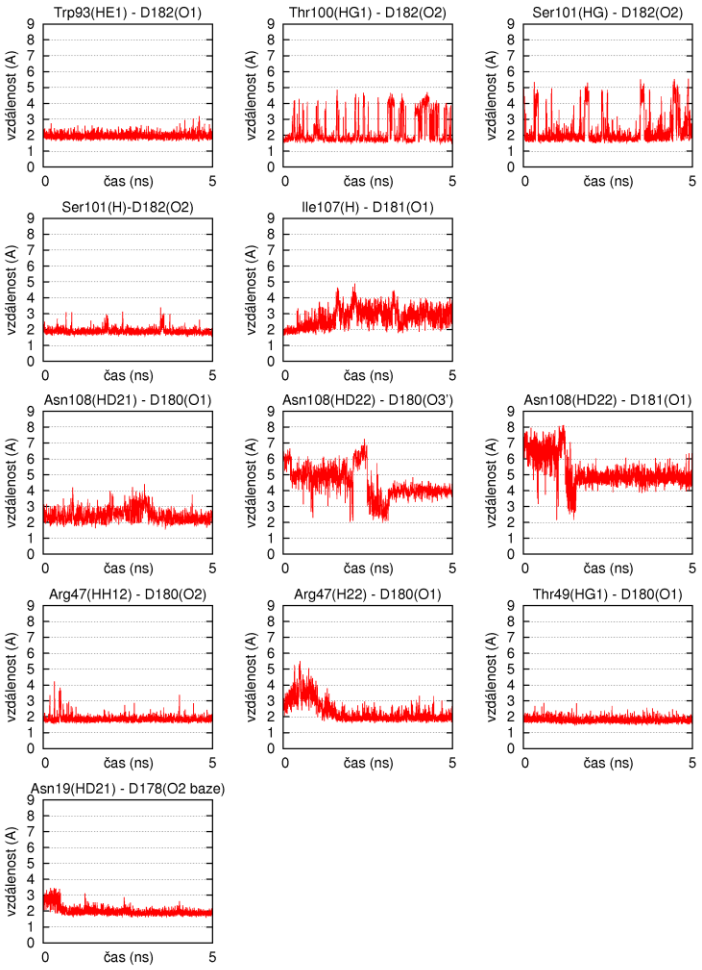
Graf D4: Vazba RNase H na DNA řetězec nukleové kyseliny, simulace MD_4.



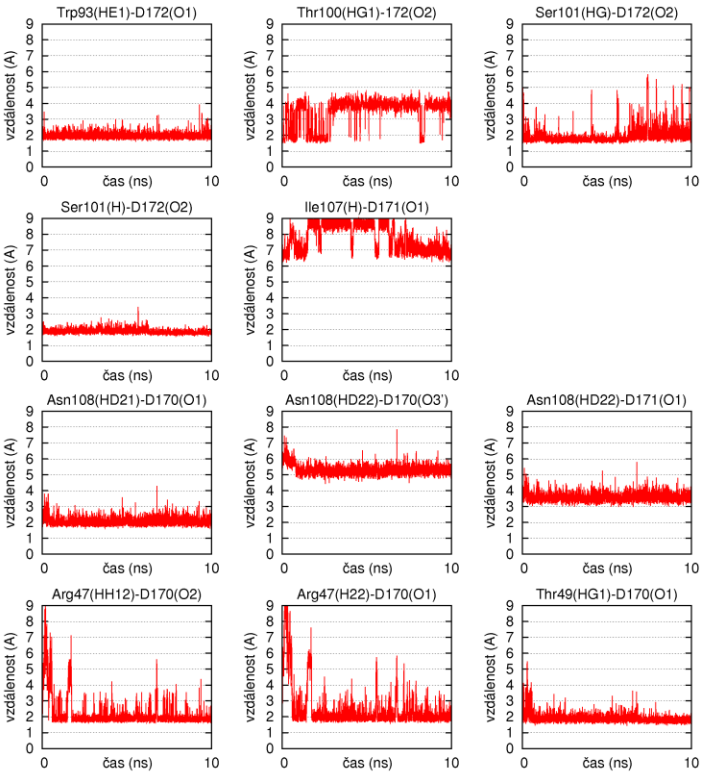
Graf D5: Vazba RNase H na DNA řetězec nukleové kyseliny, simulace MD_5.



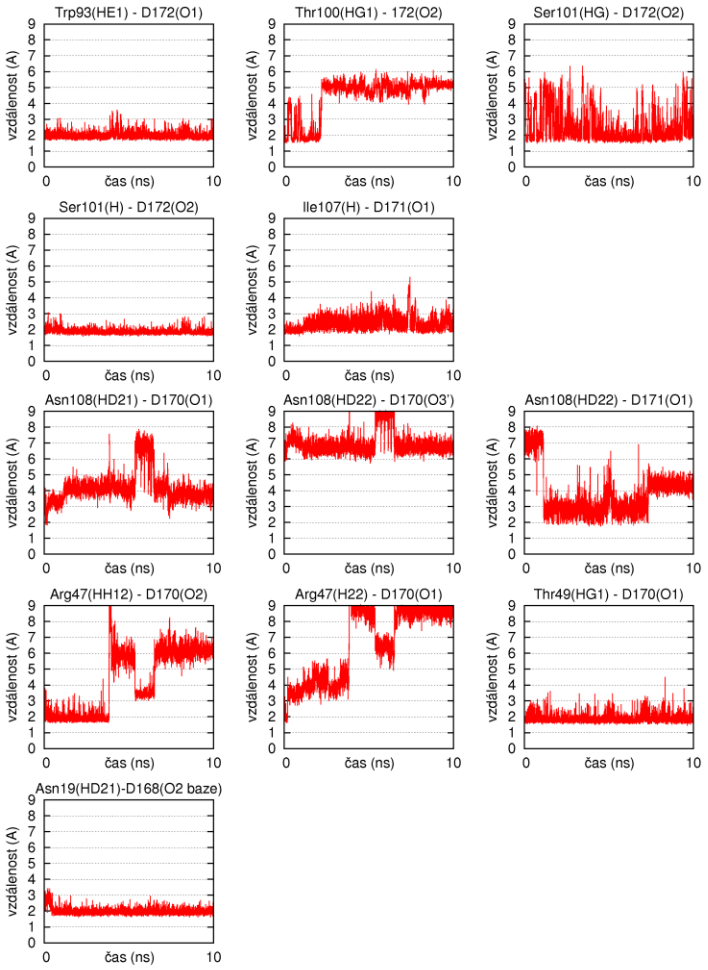
Graf D6: Vazba RNase H na DNA řetězec nukleové kyseliny, simulace MD_6.



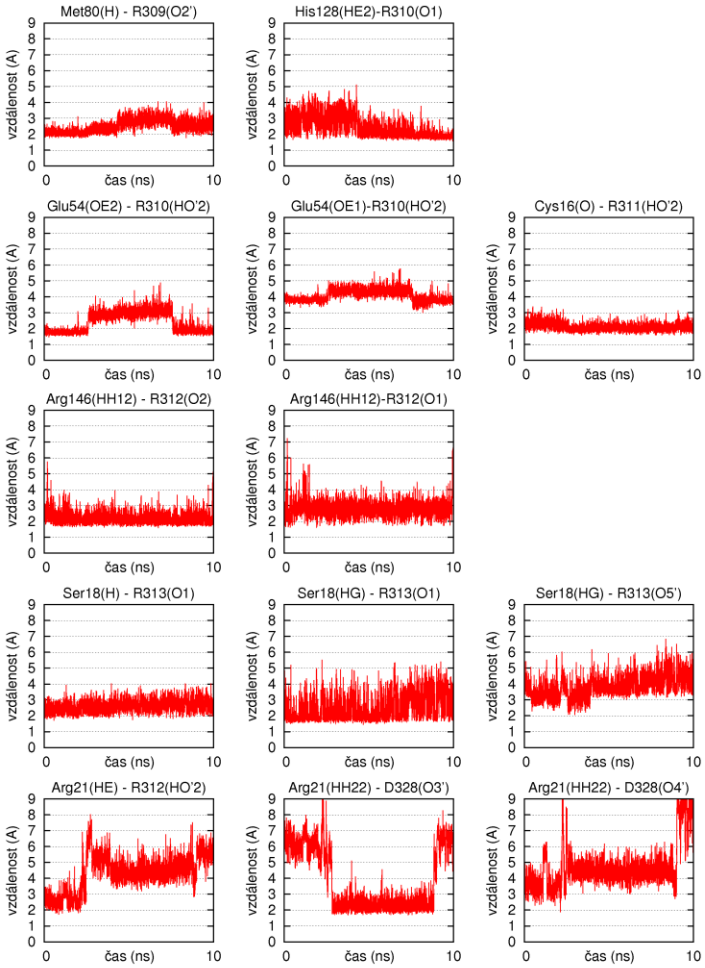
Graf D7: Vazba RNase H na DNA řetězec nukleové kyseliny, simulace MD_7.



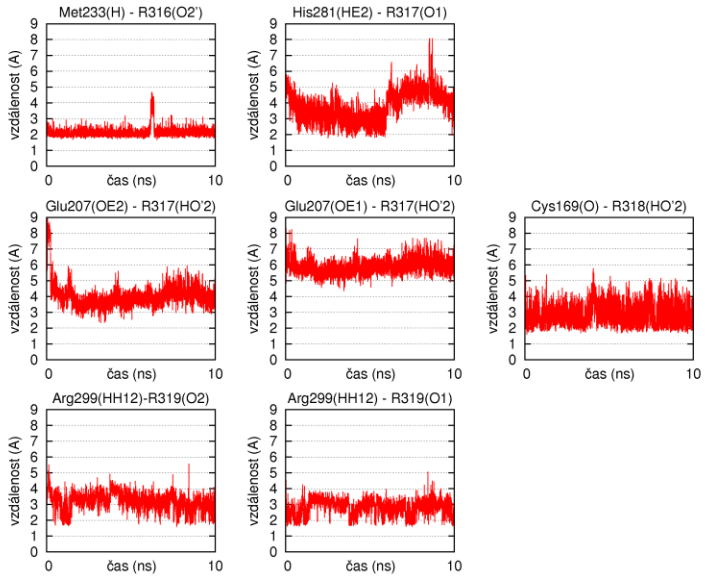
Graf D8: Vazba RNase H na DNA řetězec nukleové kyseliny, simulace s C3'- O - PO_2 - CH_2 - O - C5' fosfonátovou modifikací v pozici D169.



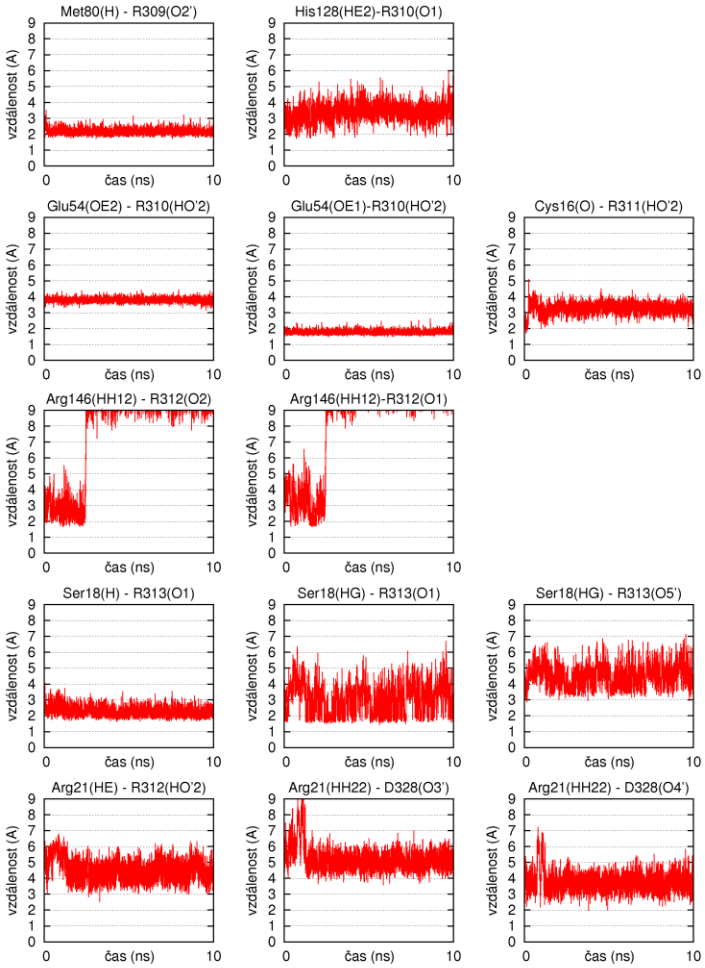
Graf D9: Vazba RNase H na DNA řetězec nukleové kyseliny, simulace s C3'- O - CH_2 - PO_2 - O - C5' fosfonátovou modifikací v pozici D169.



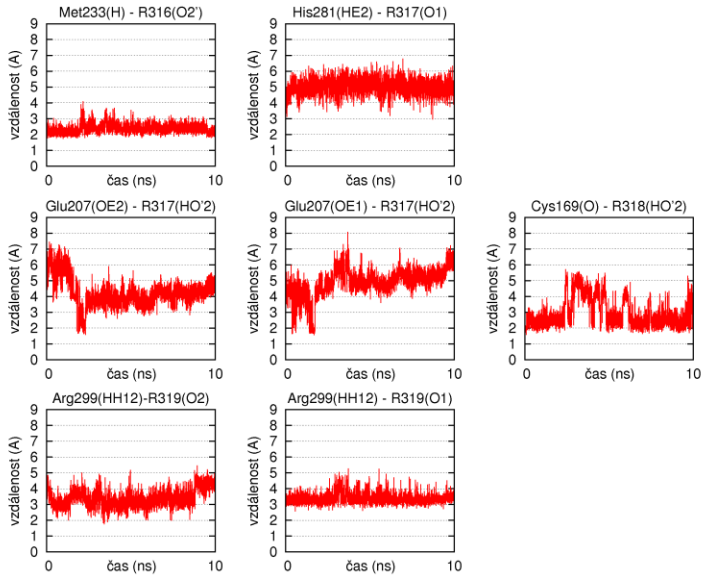
Graf E1: Vazba první domény RNase H na RNA řetězec nukleové kyseliny, simulace MD_1.



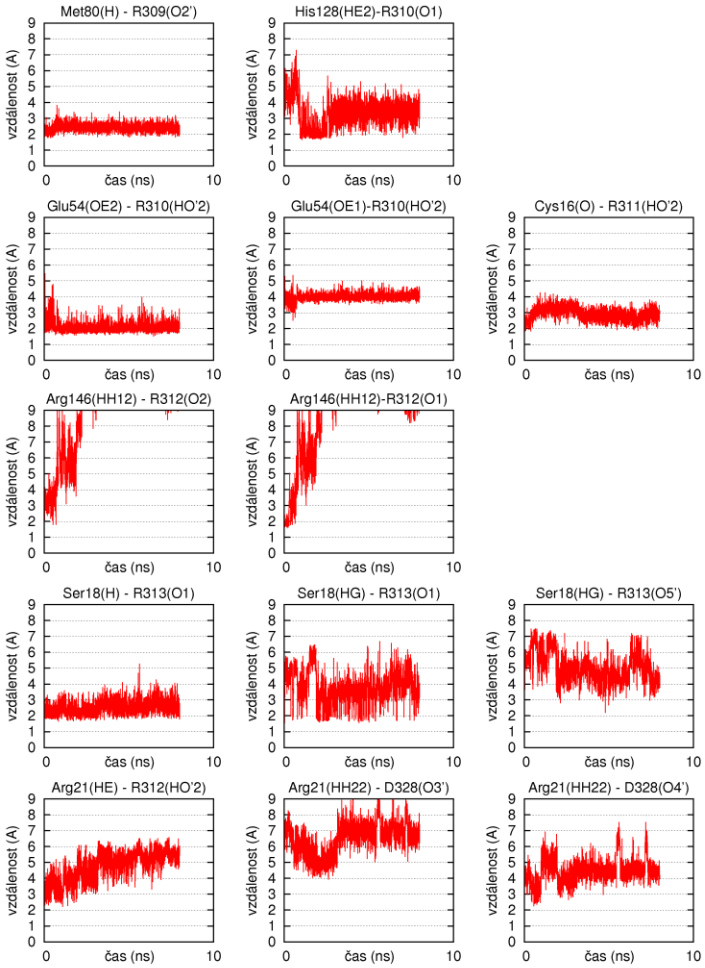
Graf E1: Vazba druhé domény RNase H na RNA řetězec nukleové kyseliny, simulace MD_1.



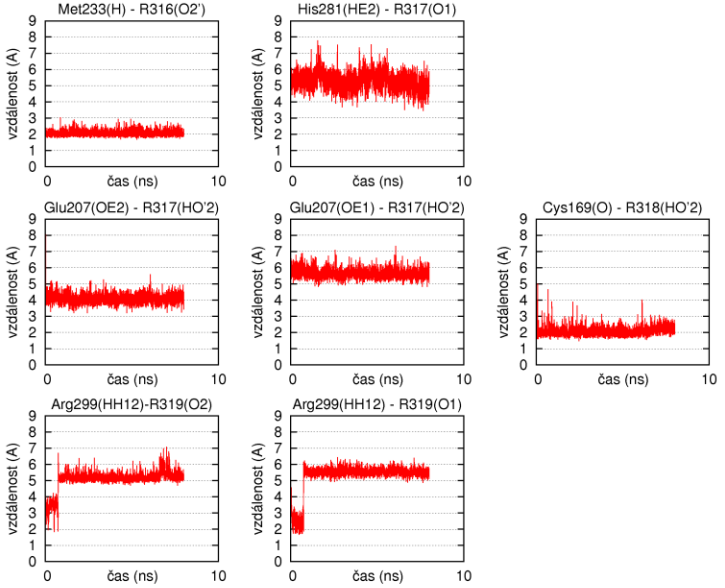
Graf E2: Vazba první domény RNase H na RNA řetězec nukleové kyseliny, simulace MD_2.



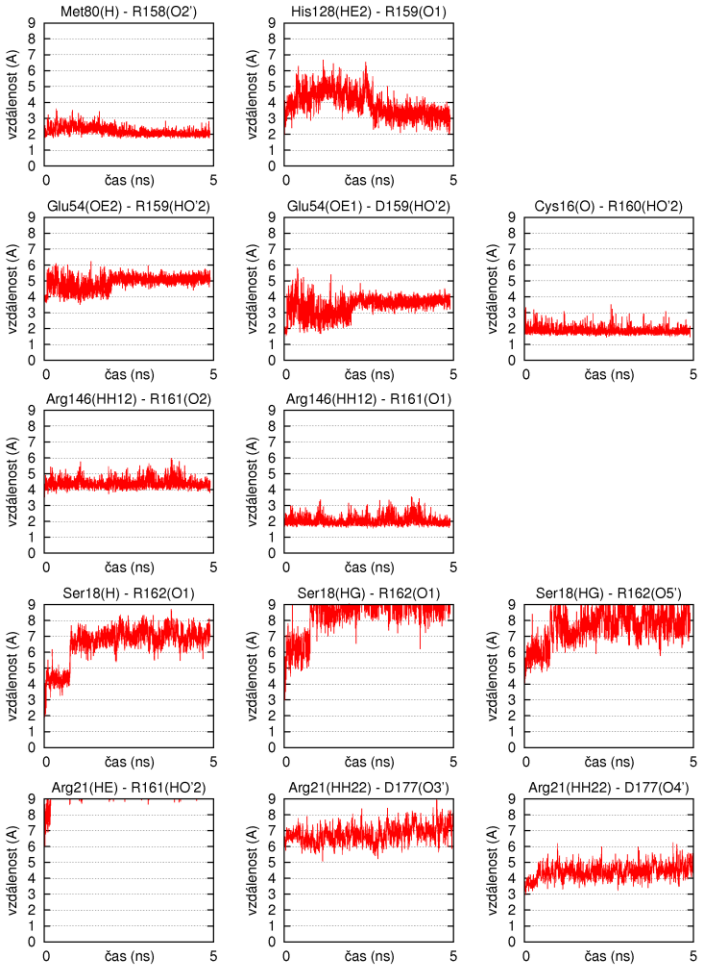
Graf E2: Vazba druhé domény RNase H na RNA řetězec nukleové kyseliny, simulace MD_2.



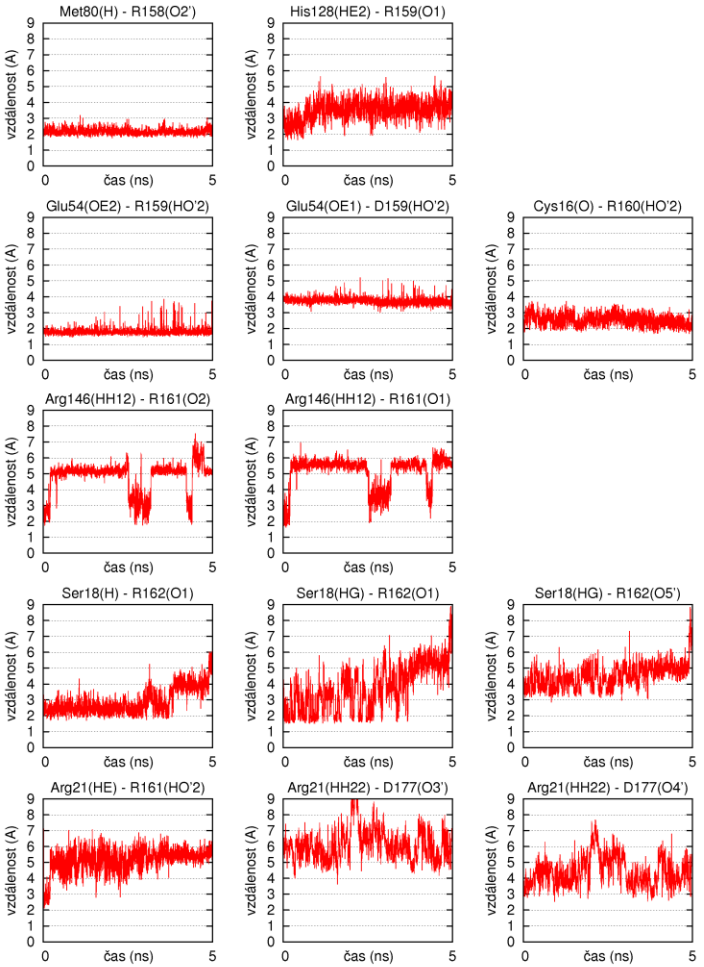
Graf A3: Vazba první domény RNase H na RNA řetězec nukleové kyseliny, simulace MD_3.



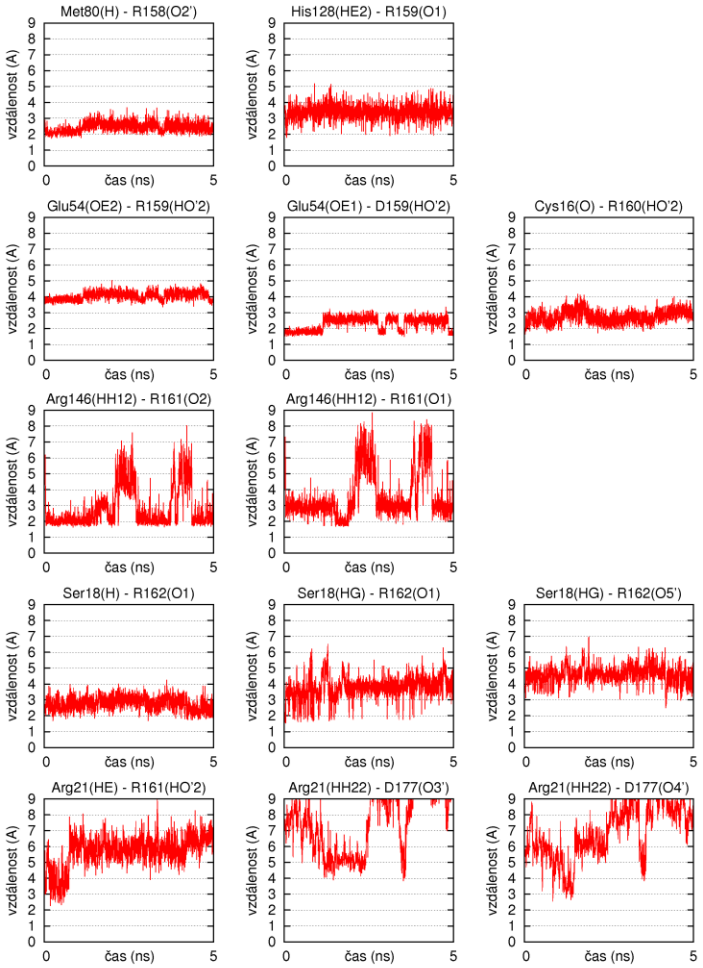
Graf E3: Vazba druhé domény RNase H na RNA řetězec nukleové kyseliny, simulace MD_3.



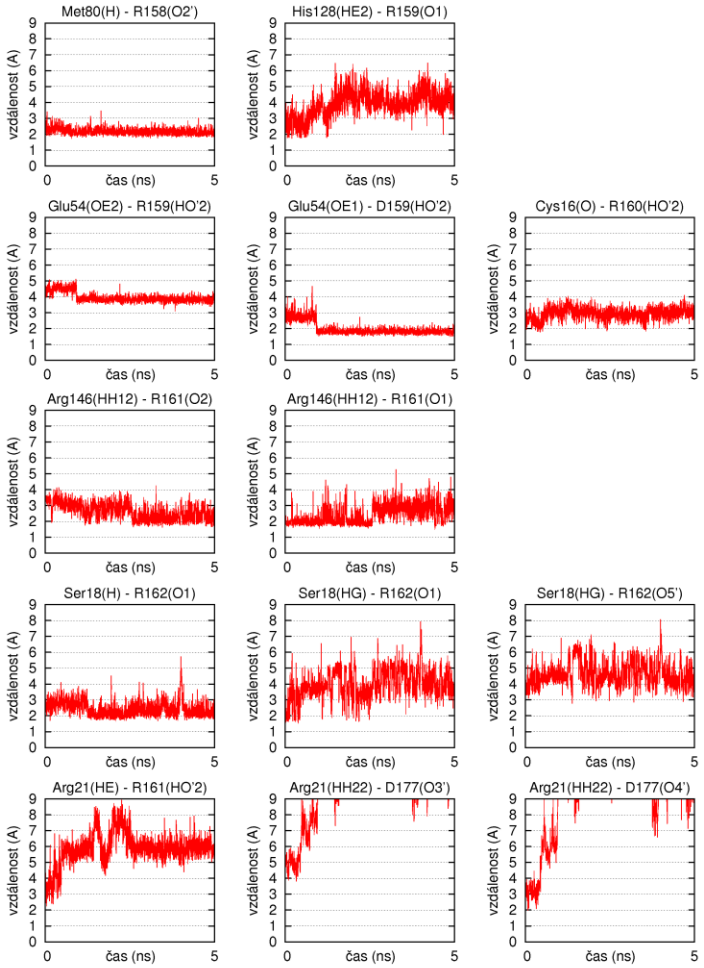
Graf E4: Vazba RNase H na RNA řetězec nukleové kyseliny, simulace MD_4.



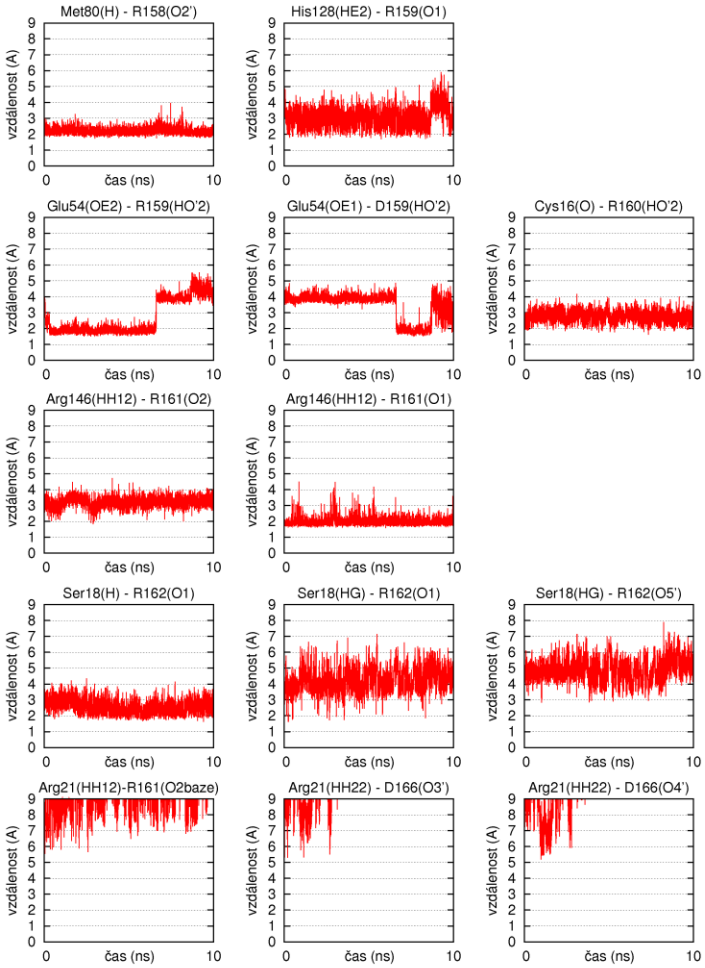
Graf E5: Vazba RNase H na RNA řetězec nukleové kyseliny, simulace MD_5.



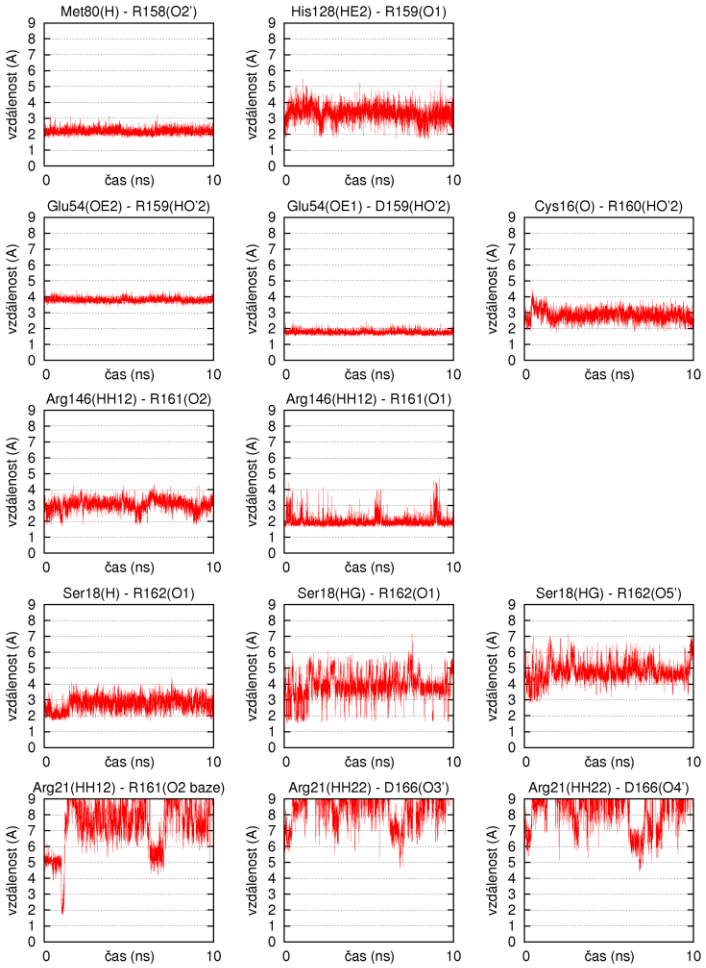
Graf E6:Vazba RNase H na RNA řetězec nukleové kyseliny, simulace MD_6.



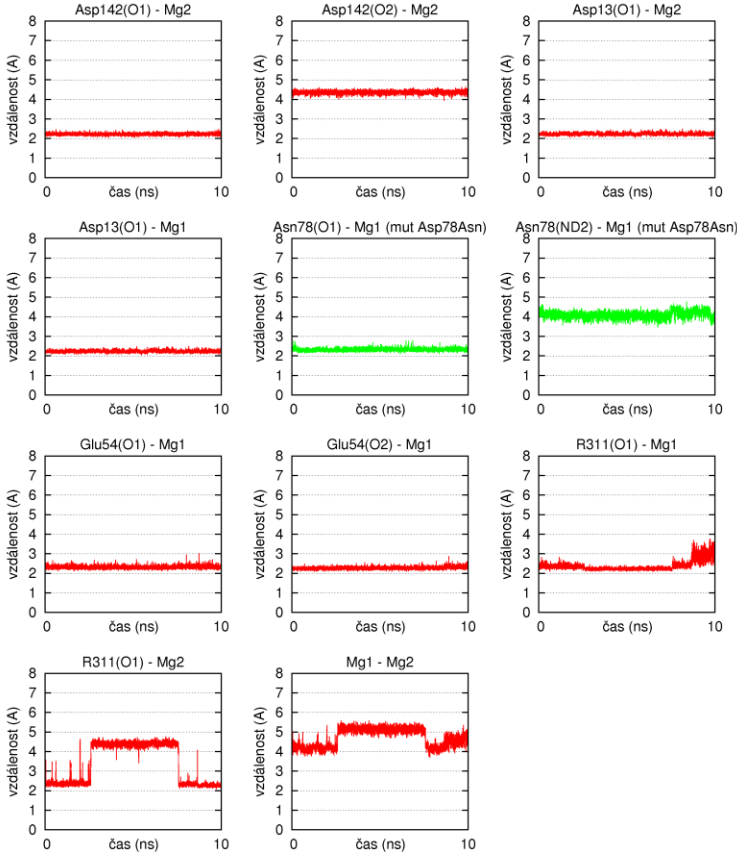
Graf E7: Vazba RNase H na RNA řetězec nukleové kyseliny, simulace MD_7.



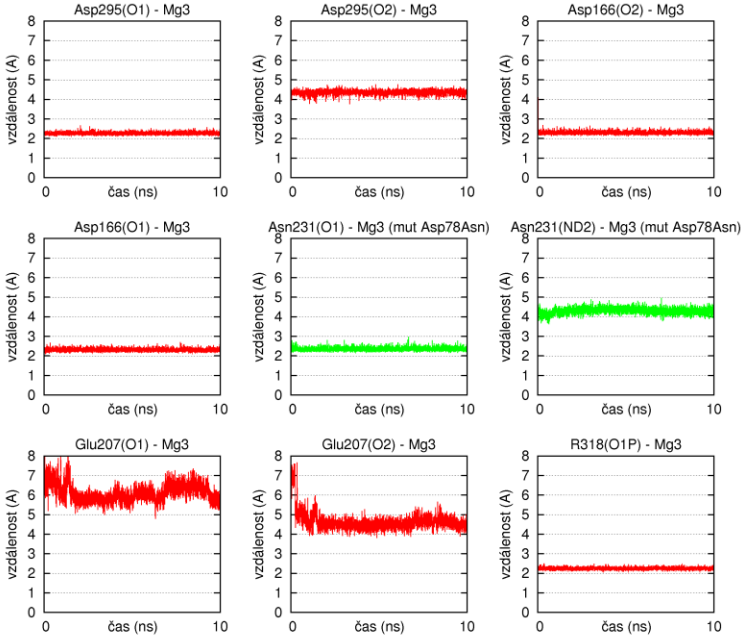
Graf E8: Vazba RNase H na RNA řetězec nukleové kyseliny, simulace s C3'- O - PO_2 - CH_2 - O - C5' fosfonátovou modifikací v pozici D169.



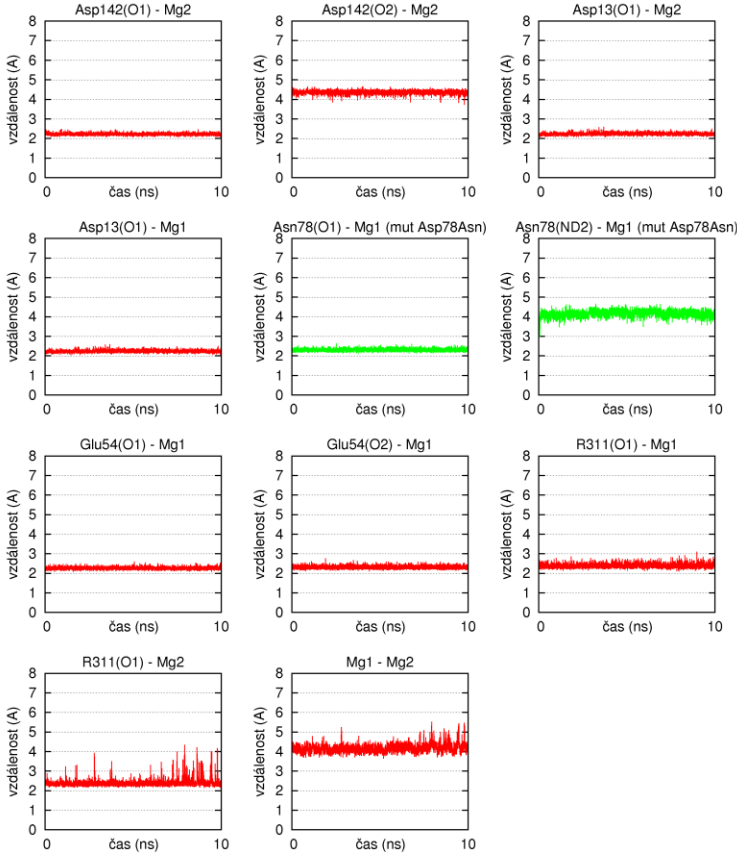
Graf E9: Vazba RNase H na RNA řetězec nukleové kyseliny, simulace s C3'- O - CH_2 - PO_2 - O - C5' fosfonátovou modifikací v pozici D169.



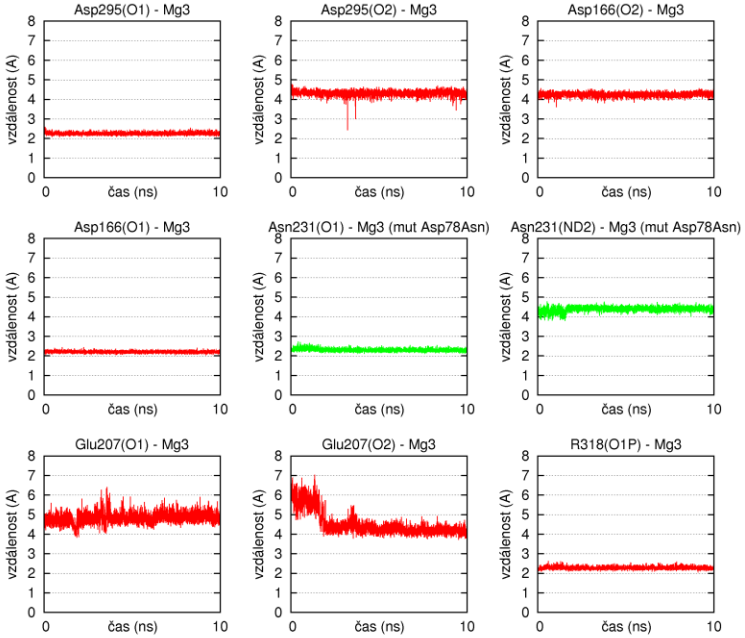
Graf F1: Kontakty iontů Mg^{2+} s DDED motivem aktivního místa první domény RNase H, simulace MD_1.



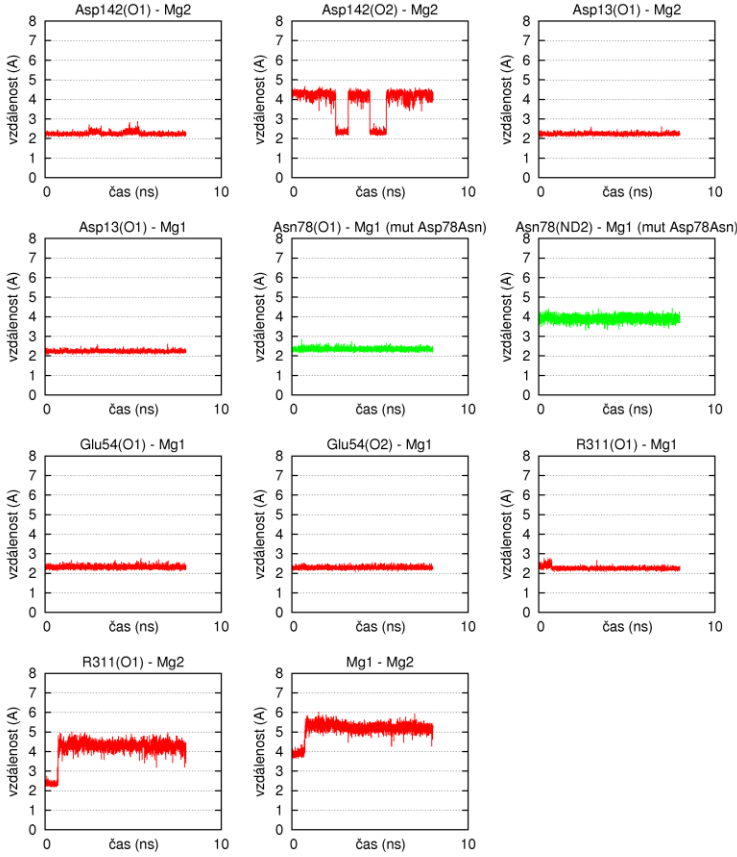
Graf F1: Kontakty iontů Mg^{2+} s DDED motivem aktivního místa druhé domény RNase H, simulace MD_1.



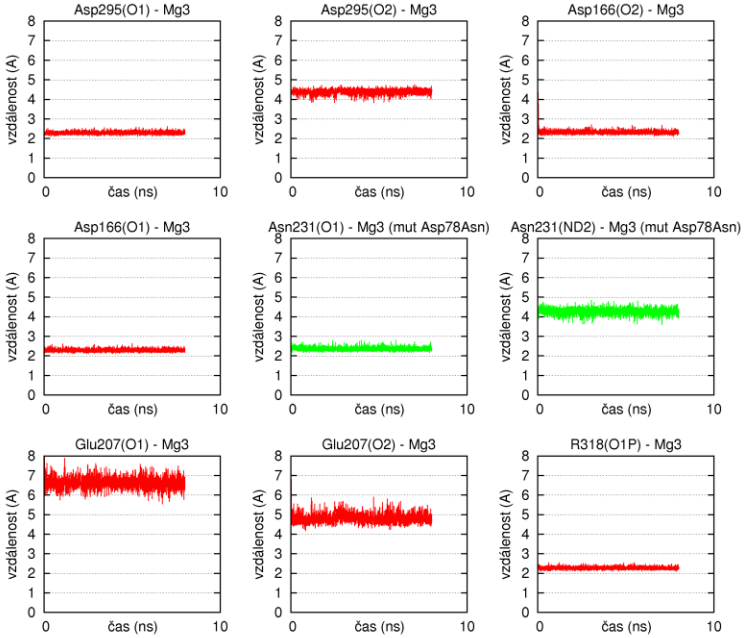
Graf F2: Kontakty iontů Mg^{2+} s DDED motivem aktivního místa první domény RNase H, simulace MD_2.



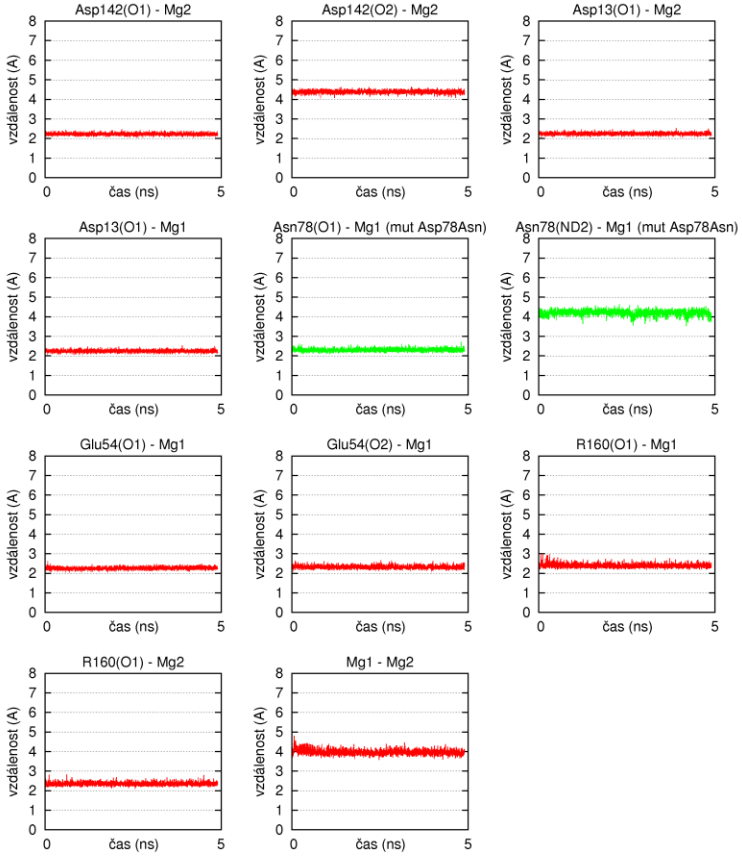
Graf F2: Kontakty iontů Mg^{2+} s DDED motivem aktivního místa druhé domény RNase H, simulace MD_2.



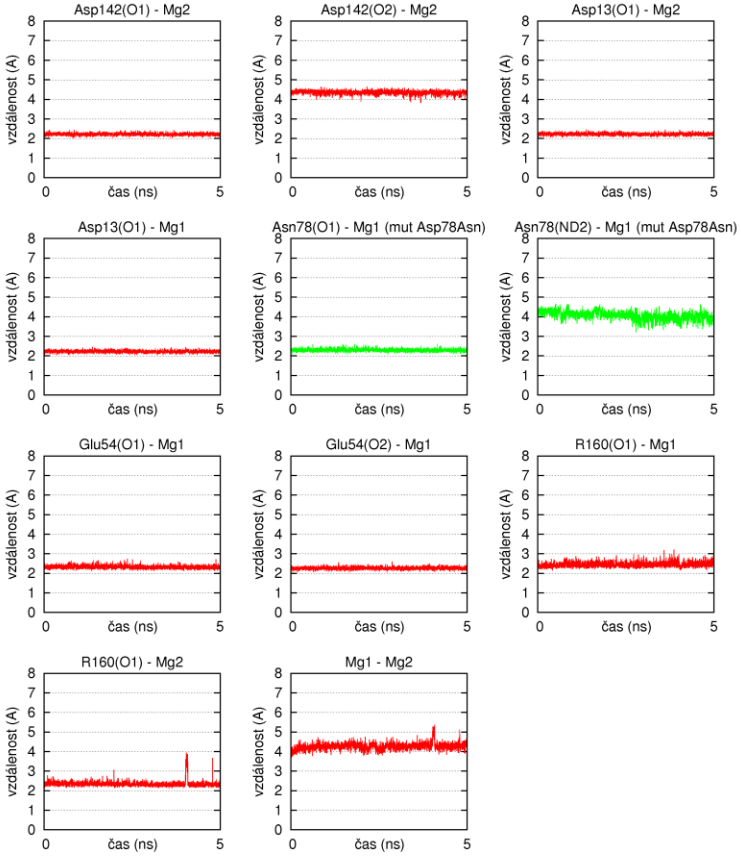
Graf F3: Kontakty iontů Mg^{2+} s DDED motivem aktivního místa první domény RNase H, simulace MD_3.



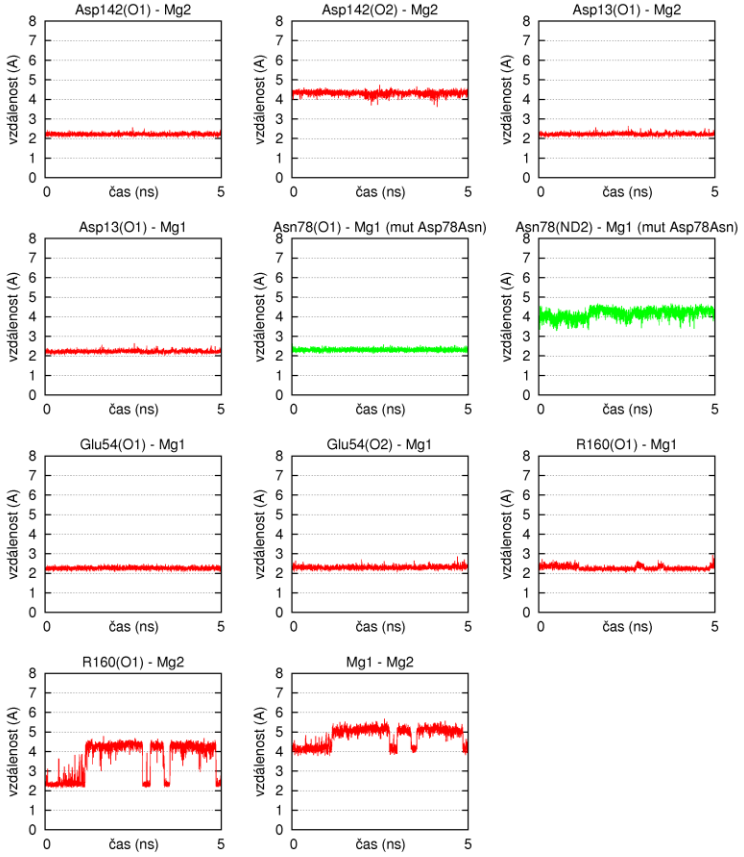
Graf A3: Kontakty iontů Mg^{2+} s DDED motivem aktivního místa druhé domény RNase H, simulace MD_3.



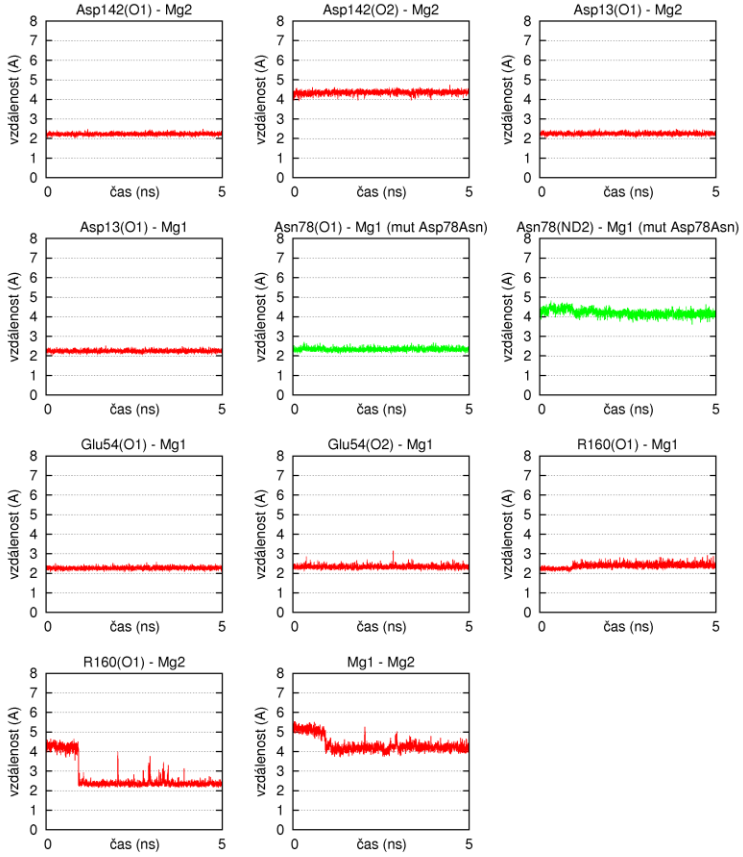
Graf F4: Kontakty iontů Mg^{2+} s DDED motivem aktivního místa RNase H, simulace MD_4.



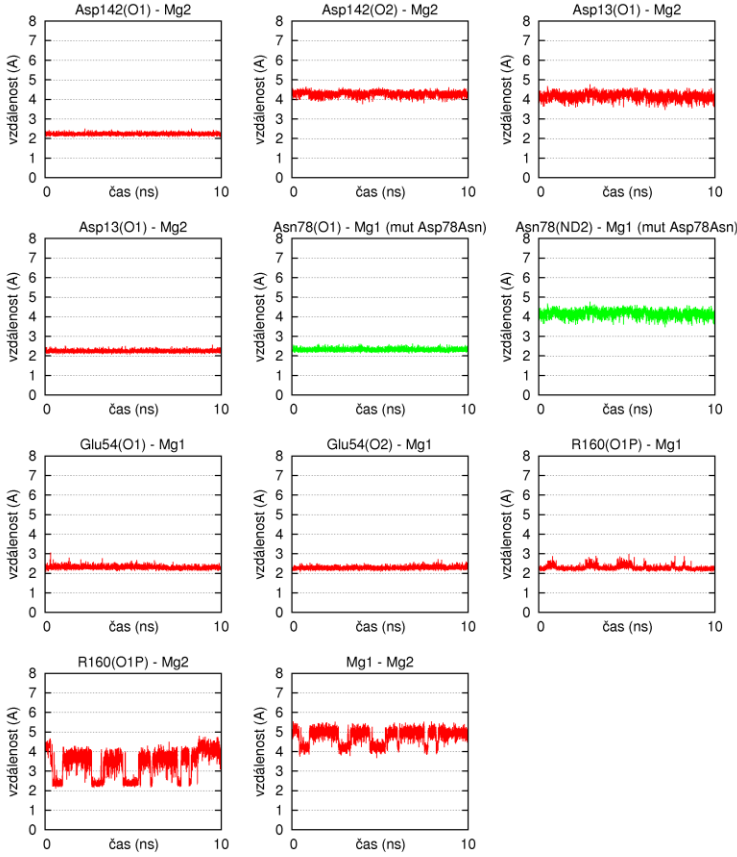
Graf F5: Kontakty iontů Mg^{2+} s DDED motivem aktivního místa RNase H, simulace MD_5.



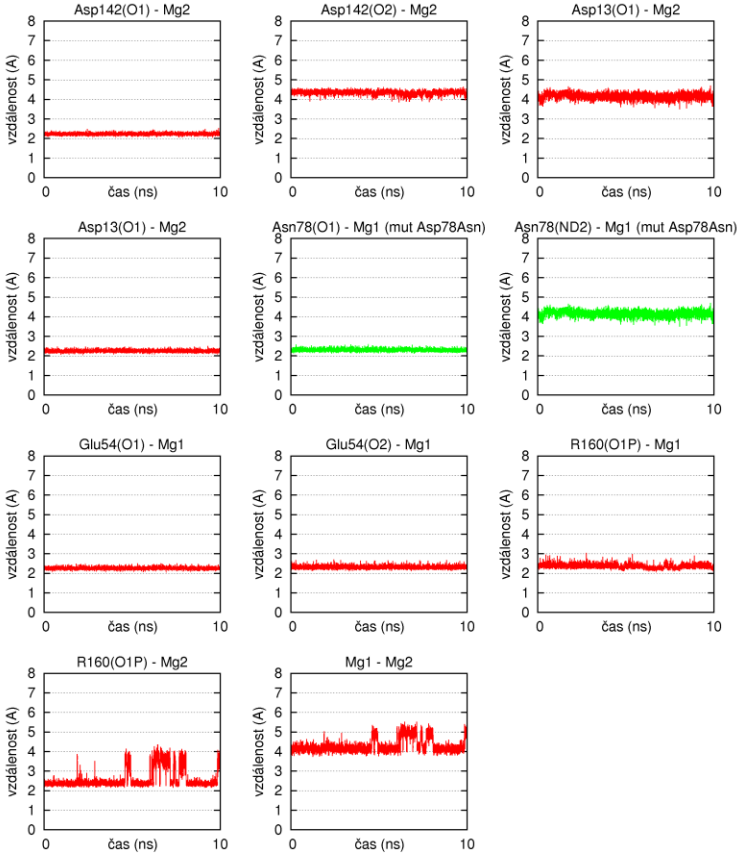
Graf F6: Kontakty iontů Mg^{2+} s DDED motivem aktivního místa RNase H, simulace MD_6.



Graf F7: Kontakty iontů Mg^{2+} s DDED motivem aktivního místa RNase H, simulace MD_7.



Graf F8: Kontakty iontů Mg^{2+} s DDED motivem aktivního místa RNase H, simulace s C3'- O - PO2 - CH2 - O - C5' fosfonátovou modifikací v pozici D169.



Graf F9: Kontakty iontů Mg^{2+} s DDED motivem aktivního místa RNase H, simulace C3'- O - CH2 - PO2 - CH2 - O - C5' fosfonátovou modifikací v pozici D169.