

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor SOČ: 03 chemie

Katalýza nukleolytických ribozymů

Martin Vondrák
Tomáš Heger

Olomoucký kraj

Olomouc 2015

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor SOČ: 03 chemie

Katalýza nukleolytických ribozymů

Autor:

Martin Vondrák
Tomáš Heger

Škola:

Slovanské gymnázium Olomouc
třída Jiřího z Poděbrad 13
771 11 Olomouc

Vedoucí práce:

Doc. Mgr. Pavel Banáš, Ph.D.

Olomouc 2015

Prohlášení

Prohlašujeme, že jsme svou práci SOČ vypracovali samostatně a použili jsme pouze podklady (literaturu, články, studie, prezentace, studentské práce atd.) uvedené v seznamu vloženém v práci SOČ.

Prohlašujeme, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemáme závažný důvod proti zpřístupňování této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) v platném znění.

V Olomouci dne podpisy:

.....

Poděkování

Naše velké díky patří především pracovníkům z Katedry fyzikální chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého. Jedná se především o našeho vedoucího práce Doc. Mgr. Pavla Banáše, Ph.D., který nám na našich schůzkách trpělivě věnoval svůj čas a vysvětloval nám ne příliš jednoduché souvislosti rozsáhlé problematiky RNA, kterou jsme se nechali pohltnout. Dále je třeba zmínit Mgr. Vojtěcha Mlýnského, Ph.D., kterému vděčíme za cenné lekce s programem PyMOL, bez nichž by nebylo možné tuto práci uskutečnit.

ABSTRAKT

Tato práce se zabývá problematikou RNA katalýzy, konkrétně pak samo-štěpením nukleolytických ribozymů (nazývaných také malé ribozymy). V teoretické části popisujeme strukturu RNA, historii objevu enzymatické funkce molekuly RNA a metody jejího zkoumání a nakonec jednotlivé RNA enzymy – tzv. ribozymy. Neopomenuli jsme zmínit ani v mnoha ohledech převratnou teorii RNA světa. V praktické části jsme se zaměřili na bioinformatickou analýzu krystalografických struktur ribozymů, konkrétně na vybrané parametry dinukleotidu aktivního místa (epsilon a zeta dihedrály, in-line attack úhel, pseudorotace a amplituda ribózy). Pořízená měření byla následně statisticky zpracována, abychom mohli diskutovat vliv inhibice na konformaci aktivního místa.

KLÍČOVÁ SLOVA

RNA katalýza, nukleolytické ribozymy, aktivní místo, epsilon a zeta dihedrály, in-line attack úhel

ABSTRACT

This thesis deals with RNA catalysis, especially with self-cleavage of nucleolytic ribozymes (also called small ribozymes). In the theoretical part, we describe the structure of RNA, the history of the discovery of the enzymatic functions of RNA molecules and methods of their investigation and in conclusion we describe each type of RNA enzymes, which are called ribozymes. We did not forget to mention the theory of the RNA world, revolutionary in many ways. In the practical part, we focused on bioinformatics analysis of crystallographic structures of ribozymes, specifically on selected parameters in dinucleotide of active site (epsilon and zeta dihedral, in-line attack angle and ribose amplitude and pseudorotation). Measurements which we have taken were subsequently statistically processed for the purpose of discussing the effect of inhibition on the conformation of the active site.

KEYWORDS

RNA catalysis, nucleolytic ribozymes, active site, epsilon and zeta dihedrals, in-line attack angle

Obsah

1	ÚVOD.....	1
2	TEORETICKÁ ČÁST	2
2.1	SROVNÁNÍ PRIMÁRNÍ STRUKTURY RNA A DNA	2
2.2	SEKUNDÁRNÍ STRUKTURA RNA.....	7
2.3	TERCIÁLNÍ STRUKTURA RNA	11
2.4	OBJEV RNA ENZYMŮ	14
2.5	TEORIE RNA SVĚTA.....	15
2.6	PRINCIPY KATALYTICKÉHO ŠTĚPENÍ NUKLEOLYTICKÝCH RIBOZYMŮ.....	18
2.7	METODY ZKOUMÁNÍ RIBOZYMŮ	21
2.7.1	Experimentální metody výzkumu.....	21
2.7.2	Teoretické metody výzkumu.....	25
2.8	DĚLENÍ RIBOZYMŮ	32
2.9	MALÉ SAMO-ŠTĚPÍCI RIBOZYMY	32
2.10	VYUŽITÍ NUKLEOLYTICKÝCH RIBOZYMŮ.....	33
3	PRAKTICKÁ ČÁST	34
3.1	Přirozené nukleolytické ribozymy.....	34
3.1.1	<i>glmS</i> ribozym.....	34
3.1.2	<i>glmS</i> ribozym – měření.....	38
3.1.3	Ribozym viru hepatitidy delta (HDV ribozym).....	43
3.1.4	Ribozym viru hepatitidy delta (HDV ribozym) – měření	46
3.1.5	Hammerhead ribozym.....	49
3.1.6	Hammerhead ribozym – měření	51
3.1.7	Vlásenkový ribozym (hairpin ribozyme).....	55
3.1.8	Vlásenkový ribozym (hairpin ribozyme) – měření	56
3.1.9	Twister ribozym.....	62
3.1.10	Twister ribozym – měření	63
3.1.11	Varkud satelit ribozym (VS ribozym).....	66
3.1.12	Varkud satelit ribozym (VS ribozym) – měření.....	68
3.2	Umělé nukleolytické ribozymy.....	69
3.2.1	Leadzyme	69
3.3	Srovnání našich měření s celou RNA databází	70
4	Závěr.....	72
5	Seznam zdrojů.....	73

1 ÚVOD

Ze střední školy zná většina lidí molekulu RNA pouze jako jakéhosi prostředníka umožňujícího na ribozomech realizovat genetický kód DNA do formy proteinů, jako stavební složku ribozomů a případně někteří vědí, že existují také RNA viry. Běžně se zde nehovoří o jiných funkcích této informační molekuly a veškeré učivo se většinou omezuje na proces transkripce a translace. Problematika RNA je však mnohem složitější a vytváří jeden velký obor, kterému by člověk mohl bezesporu zasvětit celý svůj život.

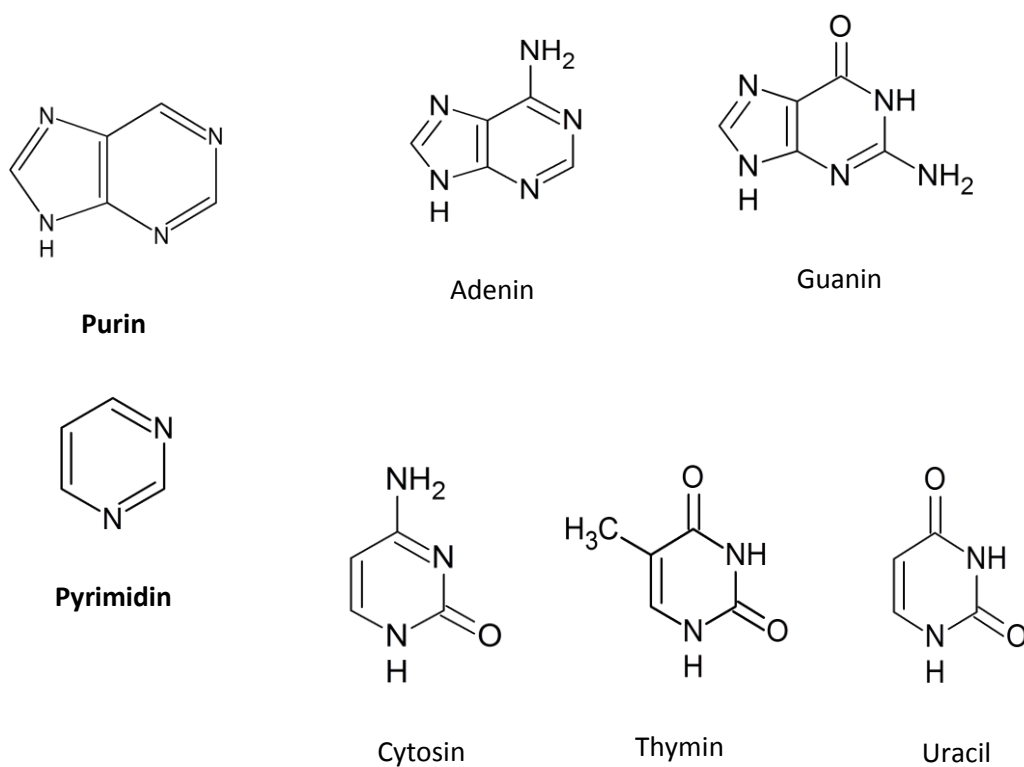
Vedle schopnosti RNA působit jako informační molekula je zde také další vlastnost této poměrně variabilní struktury, a tou je enzymatická funkce. Řetězce RNA jsou schopné podstoupit štěpení hned několika způsoby a my se v naší práci zaměřujeme speciálně na jeden, označovaný jako samo-štěpení (angl. self-cleavage). Skupina RNA enzymů – tzv. ribozymů – se schopností specificky štěpit svůj řetězec na dvě části, případně ho opět zligovat, se nazývá nukleolytické ribozymy nebo též malé ribozymy. Tzv. samo-štěpení, které podstupují, je charakterizováno jako substituce nukleofilní bimolekulární (S_N2), při které atakuje kyslík aktivované 2'-OH skupiny ribózy blízký fosfor, aktivní místo následně přejde do tranzitního stavu, který vyústí v izomeraci fosfátu na 2'-3'-cyklický fosfát na jednom nukleotidu a tedy i rozštěpení řetězce za vzniku terminální 5'-OH skupiny druhého, opouštějícího nukleotidu. Při tomto procesu se uplatňuje obecná acidobazická katalýza.

Biologický význam nukleolytických ribozymů je velice důležitý, neboť využití RNA katalýzy na tomto principu je součástí replikačního cyklu některých virů, viroidů a RNA satelitů, dále se uplatňuje při regulaci genové exprese a to jak přirozeně u některých organismů, tak i druhotně v rukou člověka jako součást speciálních biomedicínských terapií a neméně zajímavý je i podíl samo-štěpení RNA na mechanismu toxicity olova. Tyto souvislosti a mnohé další jsou rozebírány v naší práci, jejíž praktickým výstupem je přehled jednotlivých nukleolytických ribozymů, který není v českém jazyce doposud dobře zpracovaný, a dále také měření a statistika aktivních míst konkrétních struktur.

2 TEORETICKÁ ČÁST

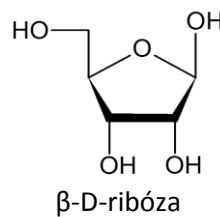
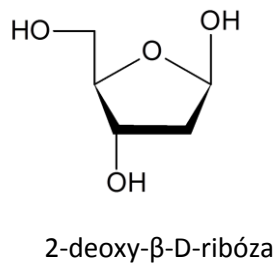
2.1 SROVNÁNÍ PRIMÁRNÍ STRUKTURY RNA A DNA

Primární struktura ribonukleové kyseliny (RNA) je stejně jako u kyseliny deoxyribonukleové (DNA) tvořená konkrétní sekvencí nukleotidů (angl. j. č. nucleotide, zkratka – nt). Nukleové kyseliny obecně jsou složeny z purinové (adenin – A, guanin – G) nebo pyrimidinové (thymín – T, cytosin – C, uracil – U) báze vázané N-glykosidickou vazbou na pentózu v místě prvního uhlíku C1' a takto vzniklé nukleosidy jsou přes uhlíky C3' a C5' vzájemně propojené fosfodiesterovými vazbami zbytku od kyseliny fosforečné.



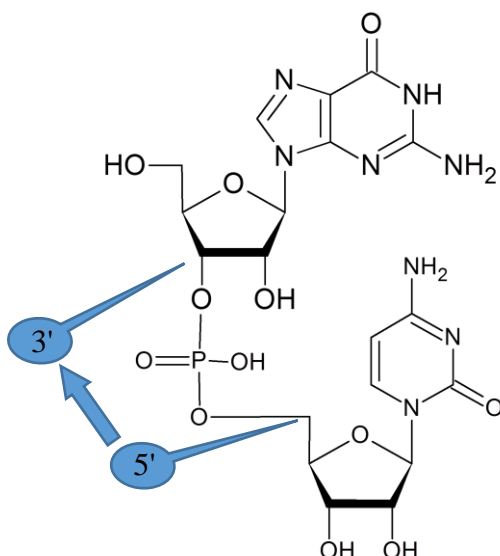
Obr. 1: Deriváty purinu a pyrimidinu – dusíkaté báze nukleových kyselin: purinové báze adenin (A) a guanin (G), pyrimidinové báze cytosin (C), thymin (T) a uracil (U)

Nukleotidy jsou tedy tvořené dusíkatou bází, pentózou a estericky vázaným fosfátem. Samotná báze a pentóza dávají dohromady sloučeninu zvanou nukleosid. V DNA jsou stavebními jednotkami deoxyribonukleotidy skládající se z adeninu, guaninu, thyminu nebo cytosinu a pentózou je 2'-deoxy- β -D-ribóza. V případě RNA se jedná o ribonukleotidy se zásadním rozdílem ve struktuře pentózy, neboť zde je obsažena β -D-ribóza, která je 2'-hydroxylovaným analogem deoxyribózy. Nepřítomnost 2'-OH skupiny pentózy v DNA ji činí mnohem odolnější vůči bazické hydrolyze, které RNA naopak podléhá ochotněji.



Obr. 2: Pentóza – heterocyklická pětičlenná molekula cukru s kyslíkovým heteroatomem

Polynukleotidový řetězec se sestává z nukleotidů spojených prostřednictvím fosfátu (dále značený jako P). Kondenzace v polymer probíhá vždy ve směru 5'→3', což znamená tvorbu vazby mezi fosfátem na C5' připojujícího se nukleotidu a OH skupinou na C3' posledního nukleotidu v prodlužujícím se řetězci, čímž vzniká 3',5'-fosfodiester (C5'-P-C3'). Fosfátové skupiny jsou kyselé a za fyziologického pH dělají z řetězců RNA a DNA ve své podstatě polyanionty, jejichž náboj je důležitý při vytváření sekundárních struktur nukleových kyselin a u DNA navíc zprostředkuje reverzibilní vazbu na bazické proteiny histony.



Obr. 3: Směr kondenzační polymerační reakce naznačený na diribonukleotidu

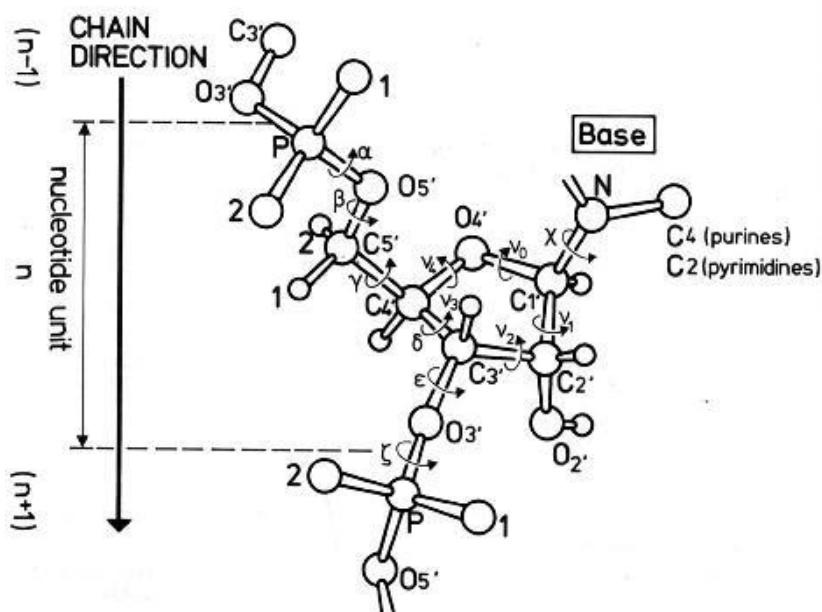
Fosforylovaný 5'-konec nového nukleotidu se připojuje vždy k 3'-konci posledního nukleotidu v nově vznikajícím řetězci – syntéza je orientovaná.

	Dusíkatá báze	RNA		DNA	
		β -D-ribóza	+ fosfát + 2 fosfáty + 3 fosfáty	2'-deoxy- β -D-ribóza	+ fosfát + 2 fosfáty + 3 fosfáty
		ribonukleosid	ribonukleotid	deoxyribonukleosid	deoxyribonukleotid
P U R I N	Adenin	Adenosin (A)	Adenosinmonofosfát (AMP) Adenosindifosfát (ADP) Adenosintrifosfát (ATP)	Deoxyadenosin (dA)	Deoxyadenosinmonofosfát (dAMP) Deoxyadenosindifosfát (dADP) Deoxyadenosintrifosfát (dATP)
	Guanin	Guanosin (G)	Guanosinmonofosfát (GMP) Guanosindifosfát (GDP) Guanosintrifosfát (GTP)	Deoxyguanosin (dG)	Deoxyguanosinmonofosfát (dGMP) Deoxyguanosindifosfát (dGDP) Deoxyguanosintrifosfát (dGTP)
P Y R I M I D I N	Thymin	Thymidin (T)	Thymidinmonofosfát (TMP) Thymidindifosfát (TDP) Thymidinfosfát (TTP)	Deoxythymidin (dT)	Deoxythymidinmonofosfát (dTMP) Deoxythymidindifosfát (dTDP) Deoxythymidintrifosfát (dTTP)
	Cytosin	Cytidin (C)	Cytidinmonofosfát (CMP) Cytidindifosfát (CDP) Cytidintrifosfát (CTP)	Deoxycytidin (dC)	Deoxycytidinmonofosfát (dCMP) Deoxycytidindifosfát (dCDP) Deoxycytidintrifosfát (dCTP)
	Uracil	Uridin (U)	Uridinmonofosfát (UMP) Uridindifosfát (UDP) Uridintrifosfát (UTP)	Deoxyuridin (dU)	Deoxyuridinmonofosfát (dUMP) Deoxyuridindifosfát (dUDP) Deoxyuridintrifosfát (dUTP)

Tabulka 1: Přehled složek nukleových kyselin a jejich derivátů

Dalším zásadním rozdílem mezi těmito informačními molekulami je náhrada thyminu za uracil během transkripce. V RNA je tedy místo nukleosidu deoxythymidinu zastoupen uridin. Chargaffova pravidla, která obecně platí pro složení bází v DNA, lze aplikovat pouze v případě dsRNA, která se nachází u některých virů (z lidských patogenů se jedná o rotavirus, seadornavirus a coltivirus) [33,34,35]. Dusíkaté báze jsou nepolární, a tudíž se hydrofobním působením natáčejí do centra struktury.

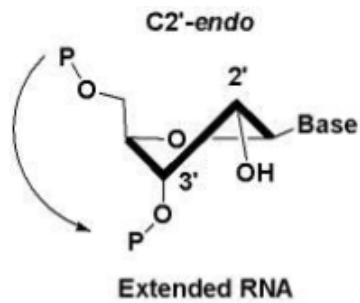
Konformace molekuly je její konkrétní struktura daná možností rotace atomů kolem vazeb, které v rámci této molekuly vytváří. Je důležité nezaměňovat tento pojem s termínem konfigurace, který se také vztahuje na změnu ve struktuře molekuly, avšak její podstatou je jiné uspořádání atomárních vazeb v rámci molekul o stejném atomárním složení.



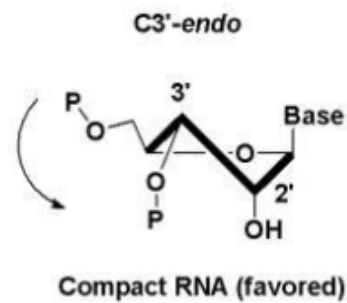
Obr. 4: Značení atomů, dihedrálů a dalších parametrů v ribonukleotidu [41]

Důležitým parametrem zásadně ovlivňujícím sekundární strukturu nukleových kyselin je tzv. pseudorotace cukerného kruhu. Jednotlivé uhlíky pětičlenného cyklu mají navázané různé substituenty, které se snaží zaujmout energeticky výhodnou vzájemnou pozici, a tím dochází ke sterickému pnutí cyklu. V nukleových kyselinách mohou nastat v zásadě dva preferované případy konformace pentózy, C3'-endo a C2'-endo, které popisují pozici uhlíků C3' a C2' vzhledem k rovině tvořené atomy C1', O4' a C4'. Jestliže cyklus zaujímá konformaci C3'-endo, atom C3' se společně s atomy C5' a N dusíkatého heterocyklu nachází ve shodném poloprostoru ohraničeném rovinou C1', O4' a C4'. V případě konformace C2'-endo ve společném poloprostoru leží atomy C2' a dále C5' a N. Uvedené rozložení atomů nukleotidu významně ovlivňuje vzdálenost mezi atomy fosforu v cukr-fosfátovém řetězci. Při konformaci pentózy C3'-endo je vzdálenost fosforů fosfátové skupiny navázané přes uhlík C3' a fosfátové skupiny navázané přes uhlík C5' rovna 5,9 Å. Konformace C2'-endo oddálí fosfory na vzdálenost 7 Å.

a)



b)



Obr. 5: Pseudorotace β -D-ribózy [upraveno podle 41]:

a) C2'-endo, kdy jsou fosfáty více vzdáleny, než je tomu při C3'-endo

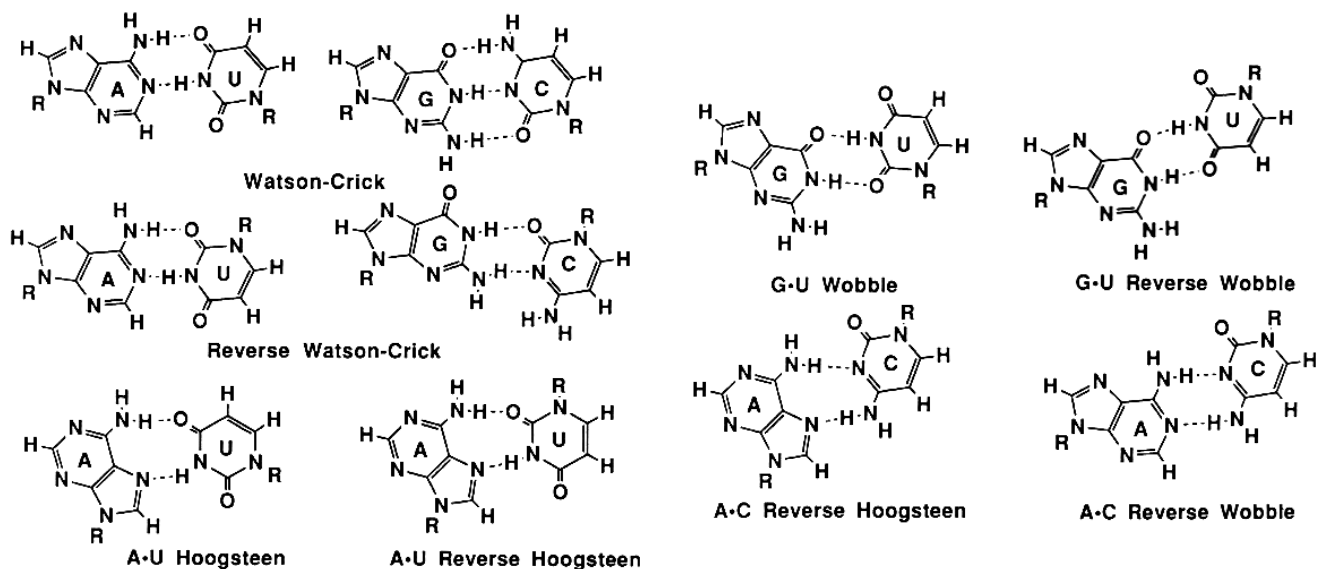
b) C3'-endo, kdy jsou fosfáty blíže, než je tomu u C2'-endo

Atomy N-glykosidické vazby mezi pentózou a purinovou bází nemohou kvůli sterickým zábranám plně rotovat, proto může být N-glykosidická vazba buď synklinální, nebo antiklinální. Pokud je konformace glykosidické vazby synklinální, nacházejí se atomy C2 a N3 pyrimidinových bází nebo atomy C6, N2 a C1 purinových bází nad pentózovým cyklem. Jsou-li báze orientovány opačně, a zmíněné atomy se tak nenacházejí nad cyklem, N-glykosidická vazba je antiklinální. Obecně platí, že pseudorotace furánózového cyklu C3'-endo upřednostňuje antiklinální konformaci a C2'-endo zase konformaci synklinální.

2.2 SEKUNDÁRNÍ STRUKTURA RNA

Významný rozdíl mezi oběma informačními molekulami povětšinou nastává v jejich sekundárních strukturách. Zatímco DNA je složená ze dvou antiparalelních vláken a ve svém přirozeném stavu zaujímá formu dvoušroubovice – duplexu s konformací levotočivé Z-DNA a pravotočivých A-DNA a nejčastěji vyskytované B-DNA. Během specifických pochodů metabolismu nukleových kyselin nebo v oblasti určitých sekvencí se mohou vyskytnout méně typické sekundární struktury DNA (např. G-tetráda). Jak v případě DNA, tak i RNA jednou z příčin konkrétní sekundární struktury je iontová síla daného prostředí. Ionty mohou participovat na elektrostatické stabilizaci záporných nábojů nukleotidových řetězců.

Kanonické a nekanonické párování. Takzvané Watson-Crickovo (kanonické) a non-Watson-Crickovo (nekanonické) párování jsou dva způsoby, kterými mohou páry bází (angl. base pairs, zkratka – bp) interagovat skrze vodíkové můstky. V oblasti neshody párování bází se může nacházet například rozpoznávací místo pro určité ionty, malé molekuly nebo proteiny. Nekanonické párování se také významně podílí na utváření sekundární struktury RNA a tím pádem i její funkce [32].



Obr. 6: Kanonické (Watson-Crickovo) a nekanonické (non-Watson-Crickovo: wobble a Hoogsteen) způsoby párování nukleových bází [42]

Sekundární struktura RNA nemá význam pouze termodynamický, nýbrž i funkční. Asi nejtypičtější příklad funkčního významu sekundárního uspořádání nám může poskytnout transferová RNA (tRNA), se kterou jsou obeznámeni již studenti středních škol. Právě pro pochopení katalýzy nukleolytických ribozymů je znalost sekundární struktury RNA naprosto stěžejní. RNA musí zaujmout správnou sekundární strukturu, aby se dostala do katalyticky aktivní konformace, ve které může započnout štěpení. Katalyticky aktivní konformace ribozymu obsahuje residua okolo aktivního místa orientovaná tak, že může dojít k rozštěpení cukr-fosfátové kostry obecnou acidobazickou katalýzou. V aktivním místě se v takovém případě vyskytuje akceptor protonu v blízkosti 2'-OH skupiny ribózy a donor protonu u opouštějícího negativně nabitého kyslíku v terminálním postavení vůči cyklizujícímu se fosfátu. Správná sekundární (případně terciální) struktura tedy umožní protonový transfer v aktivním místě ribozymu a její význam je nepostradatelný zvláště tam, kde jako obecná kyselina a zásada vystupují nukleotidy RNA řetězce, které bývají v primární struktuře zpravidla vzdálené od dinukleotidu aktivního místa. Právě tohle je případ malých samo-štěpících ribozymů, proto bude sekundární struktura předmětem popisu jejich jednotlivých zástupců.

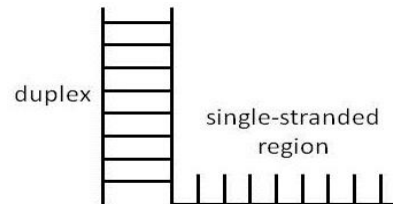
Anglické výrazy se staly i v české odborné literatuře, která se zabývá strukturou RNA, již zaběhnutými termíny a českých ekvivalentů se užívá zřídka. V naší práci se proto budeme často držet anglické terminologie, neboť to je to nejčastější, s čím se čtenář běžně setká.

A. *Single-stranded region* (jednořetězcová oblast) – **ssRNA**

Jedná se o oblasti RNA, které nemají žádným způsobem spárované báze. Díky tomu dochází k tvorbě méně uspořádaných sekundárních struktur.

B. *Double-stranded region* (dvouvláknová oblast) – **dsRNA**

Stem (kmen). Oblast, kde jsou všechny báze spárované a vytváří díky tomu duplex, se nazývá kmen (angl. stem).

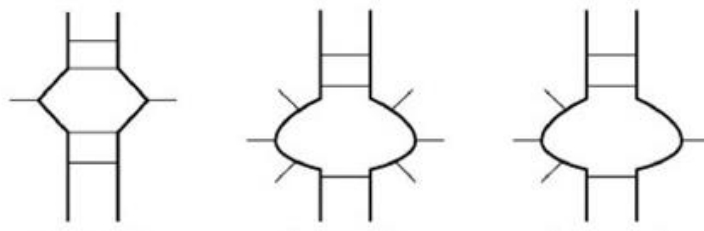


Obr. 7:

dsRNA a ssRNA segmenty [35]

C. *Loop* (smyčka)

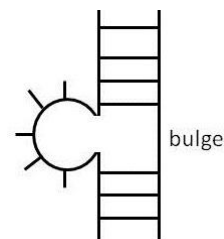
Internal loop (interní smyčka). Pokud jsou oblasti dsRNA přerušeny nepárujícími nukleotidy z každého vlákna, nazývá se tato konformace interní smyčka (internal nebo interior loop). Může být tvořena pouze jedním párem nukleotidů (tzv. neshoda, ang. mismatch – nekanonický pár) nebo více nukleotidy, které mohou být zastoupeny v obou řetězcích stejným počtem (symetrická interní smyčka), nebo počtem rozdílným (asymetrická interní smyčka).



Obr. 8: *Vnitřní smyčky* [35]

Zleva: *neshoda (jeden nt)*, *symetrická vnitřní smyčka (stejný počet nt po stranách)*, *asymetrická vnitřní smyčka (rozdílný počet nt po stranách)*

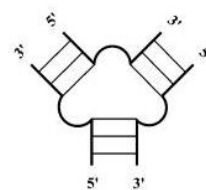
Bulge loop (boule, výdut'). Jestliže jsou spárované řetězce přerušeny sekvencí jednoho z nich skládající se z nukleotidů bez svých komplementárních protějšků v řetězci druhém, tvoří taková sekvence smyčku označovanou jako výdut' neboli boule (bulge). Nekomplementární segment tohoto řetězce se v sekundární struktuře vychlípí a po jeho ukončení v místě následné komplementární části se řetězce opět spárují, aniž by v druhém z nich vznikla v tomto úseku nespárovaná oblast. Jedná se tedy o přerušení párování v kmenu pouze na jedné straně. Boule může tvořit jeden nebo více nukleotidů. Rozdíl mezi neshodou (viz výše) a boulí o jednom nukleotidu je v tom, že neshoda se týká páru bází, zatímco boule pouze jedné strany řetězce, kde se v protějším místě nenachází žádná jiná báze, a onen jeden nukleotid se proto jeví jakoby navíc.



Obr. 9: Boule [35]

Vychází pouze z jedné strany kmene a v jejím místě na protější straně řetězce nejsou žádné nt.

Multi-branched loop (rozvětvená smyčka) neboli helical junction. V místě, kde se setkávají nejčastěji tři (three-way junction), popřípadě i více kmenů, vzniká rozvětvená smyčka (multi-branched loop).



Multi-branched loop

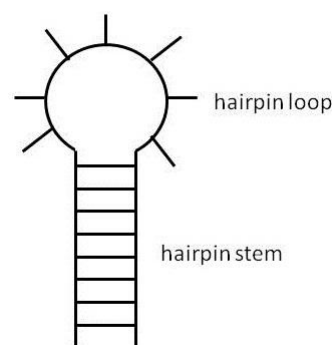
Obr. 10:

Rozvětvená smyčka [35]

D. *Hairpin loop* (vlásenka) *neboli stem-loop* (koncová smyčka)

Vlásenkovou strukturu tvoří jedno vlákno RNA s různě dokonalou palindromovou sekvencí, která je přerušena nukleotidy bez své komplementární části v primární struktuře vlásenky. To má za následek vytvoření kmene se smyčkou na jeho konci. Kmen vznikne spojením palindromové sekvence do podoby šroubovice a na jeho konci se vytvoří smyčka ze zbylé primární struktury bez své komplementární části. Stabilita vlásenkového kmene je ovlivněna jeho délkou a zvyšuje se s mírou komplementarity jeho bází, počtem párů G-C, π - π interakcemi (tzv. stacking), naopak stabilita klesá s neshodami v párování a s počtem výdutí, které nejsou z hlediska soudržnosti obou řetězců příliš akceptovatelné a pouze u dlouhého kmene mohou být výraznější výdutě tolerovány. Hairpinová smyčka na konci kmene může v rámci terciální struktury dále interagovat s jinými oblastmi RNA.

Z pohledu stability struktury vlásenky je optimální délka smyčky 4–8 nt. Velice častým zakončením dvoušroubovic RNA je tetranukleotidová vlásenka nazývaná tetraloop. Podle druhu nukleotidů, které ji tvoří, je možné tetraloop klasifikovat do tří rodin a to: CUYG, UNCG a GNRA (N = purin nebo pyrimidin; R = purin; Y = pyrimidin). Obecným znakem tetraloop je to, že druhý a třetí nukleotid se vytáčí vně z RNA řetězce, což umožní vytvoření vodíkové vazby mezi prvním a čtvrtým nukleotidem, často nekanonického charakteru. Výsledkem toho je celkově stabilnější konformace zároveň potenciál druhého a třetího nukleotidu interagovat s okolními strukturami.



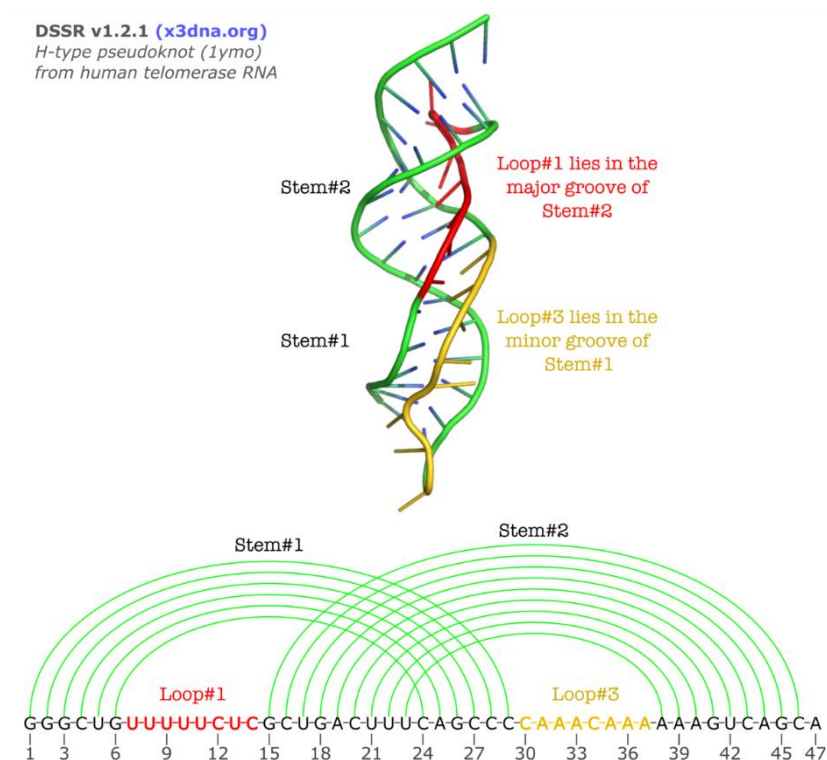
Obr. 11: Vlásenka [35]
Tzv. hairpin je reprezentován smyčkou na konci kmene.

2.3 TERCIÁLNÍ STRUKTURA RNA

Terciální uspořádání určuje prostorové rozložení celé molekuly RNA, její 3D strukturu a tvoří ho vzájemné interakce struktur sekundárních. Často se zde uplatňují kationty kovů (hlavně Na^+ a Mg^{2+}) jako stabilizační prvky, které kompenzují negativně nabitě cukr-fosfátové kostry molekuly RNA tak, že tlumí elektrostatické repulzní síly mezi negativními náboji řetěrců, které by jinak nedovolily vzniknout potřebné terciální struktuře. Složitě prostorové uspořádání RNA slouží především k její stabilizaci a má také funkční význam. Například u zmiňované tRNA zaujímá terciální struktura charakteristický tvar písmene „L“.

Pseudoknot (pseudouzel)

Jeden řetězec RNA se ve svém průběhu stáčí, vytváří smyčku a jeho sekvence pokračuje v opačném směru a komplementárně se páruje v kmen, na jehož konci se opět RNA stočí za vytvoření smyčky druhé, pokračuje v jednořetězcové podobě opačným směrem k první smyčce, s jejíž určitou částí vytvoří komplementární oblast. Tak vznikají dva kmene (obecně označované jako S1 a S2) spojené ssRNA tvořící dvě smyčky. Tento útvar se nazývá pseudouzel a vyskytuje se například, co se týče všeobecně známějších RNA struktur, v telomerázové RNA komponentě (TERC) nebo také v RNázě P. Pro představu jednodušší vysvětlení struktury pseudouzlu je nejspíš vznik komplementárního párování mezi vlásenkovou smyčkou a částí ssRNA navazující na vlásenkový kmen, přičemž mezi takto nově vzniklou komplementární oblastí a vlásenkovým kmenem se nachází nespárovaný region vytvářející jednu ze dvou smyček pseudouzlu. Oba vzniklé kmene jsou často stabilizovány koaxiálním stohováním a kontakty smyčka-kmen, během kterých dochází k ukládání ssRNA smyčky do žlábků kmenů. Stohování mezi dvěma kmene pseudouzlu vytvoří souvislou šroubovici, kde se v místě spojení kmenů uplatňují π - π interakce.



Obr. 12:

Pseudouzel haipinového typu lidské telomerázové RNA komponenty (hTERC)

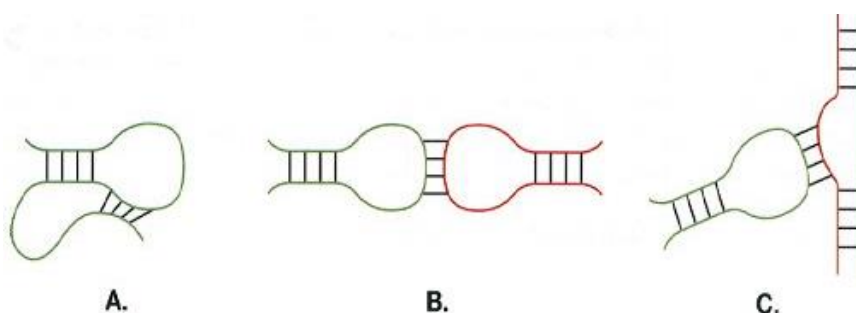
Ze schématu terciální struktury je patrné stohování mezi kmene a kontakty smyčka-kmen

Hairpin-bulge contact

Jedná se o strukturu tvořenou kontaktem vlásenkové smyčky a boule, kde se mezi sebou párují ssRNA segmenty těchto dvou sekundárních struktur.

Kissing hairpins (spojené vlásenky)

Spojené vlásenky se vytvoří, pokud jsou obě smyčky vlásenek alespoň částečně komplementární.



Obr. 13: Terciální struktura RNA [26]:

A: pseudoknot, B: kissing hairpins, C: hairpin-bulge contact

Loop-helix contact (kontakt smyčka-kmen)

Stabilizující kontakt mezi kmenem a smyčkou hraje zásadní roli obzvláště v pseudouzlu. Jestliže se jedná o pseudouzlu typu hairpin, jeho smyčky jsou umístěny ve velkých a malých žlábkách kmenů této struktury, což ji činí velice kompaktní. Typický kontakt smyčka-kmen je tzv. trojitá interakce bází, při které dojde k vytvoření specifické vodíkové vazby (uplatnění Hoogsteenova párování) na dva Watson-Crickovské spárované nukleotidy kmenu. Může k ní docházet jak v malém, tak i velkém žlábků. Nejčastější je případ Hoogsteenova vodíkového můstku mezi pyrimidinem první smyčky a purinem z nukleotidového páru druhého kmene ve velkém žlábků: $U \cdot (A-U)$ nebo $C^+ \cdot (G-C)$ [25].

2.4 OBJEV RNA ENZYMŮ

Již v roce 1967 Carl Woese ve své knize *The Genetic Code* zveřejnil první myšlenky podporující teorii, že život vzešel primárně skrze ribonukleovou kyselinu [8]. Dalším rokem přibyla práce, ve které Francis Crick a Leslie Orgel konstatovali, že RNA by mohla mít také katalytickou funkci, tedy že by byla schopna kompletně zastat úlohu proteinů i DNA [3]. Francis Crick tvrdil, že RNA musela být první molekulou nesoucí genetickou informaci a zároveň že byla schopná katalyzovat svou vlastní replikaci. To všechno však byly zatím jen teoretické úvahy odvozené z chemického složení RNA a variability jejích sekundárních struktur.

Skutečné důkazy o existenci RNA enzymů přinesla až práce chemika Thomase Roberta Cecha a molekulárního biologa Sidney Altmana. Thomas R. Cech studoval metabolismus nukleových kyselin se zaměřením na sestřih pre-rRNA. Jako modelový organismus si vybral prvoka *Tetrahymena thermophila*, ze kterého se svými studenty mohl získat dostatek RNA. Navzdory mnohým opakováním se jim však nedařilo izolovat RNA v neporušeném stavu, pokaždé byla již fragmentovaná. Mysleli si, že enzymy pro sestřih musí být vázány těsně k RNA, a proto se jim nedaří je separovat. Když stále nenacházeli žádný protein, postupně si uvědomovali, že RNA musí vykazovat autokatalytickou funkci sama o sobě. Roku 1982 publikovala skupina v čele s Thomasem R. Cechem článek, kde zveřejnila výsledky svého bádání, které dokazují, že sama RNA katalyzuje vlastní sestřih. Byli první vědeckou skupinou, která přinesla tato zjištění [3,4].

Skupina profesora Altmana se zabývala enzymem ribonukleázou P získanou z bakterie *Escherichia coli*. Jedná se o ribonukleoprotein umožňující vyštěpení prekurzorové RNA z primárního transkriptu tRNA, jinými slovy se jedná o enzym účastnící se zrání tRNA [5,6]. Domnívali se, že molekuly RNA se do vzorku dostávají v důsledku nedokonalého vyizolování tohoto enzymu. Poté, co se však podařilo rozdělit RNázu P na její podjednotky, bylo zjištěno, že enzymatickou aktivitu vykazuje ta část heterodimeru tvořená ribonukleovou kyselinou a ne protein, jak se podle dosavadních poznatků očekávalo [3,4]. Katalytická aktivita samotné RNA byla sice slabší než v dimeru s proteinem, avšak proteinová podjednotka nebyla schopna provést vyštěpení prekurzorové RNA. Oběma vědcům byla roku 1989 za objev katalytické funkce RNA udělena Nobelova cena za chemii [7].

Pro pořádek je třeba uvést, že ne všechny ribonukleázy P jsou schopné fungovat po rozdělení na svou ribonukleovou a proteinovou část. Tohle můžeme pozorovat pouze u bakteriálních a některých archeálních RNáz P, zatímco eukaryotní RNázy P a velká většina archeálních RNáz P, jejichž proteinové podjednotky jsou mnohem větší, ztrácí po rozdělení na monomery katalytickou funkci [6,16].

2.5 TEORIE RNA SVĚTA

Objev autokatalytické aktivity RNA znamenal naprostý převrat v dosavadním paradigmatu a dal by se označit za jistý milník v biologických vědách. RNA, které již bylo známo několik druhů, přibyla k variabilitě další nově známá funkce – enzymatická funkce. Důsledkem zjištění mohla být nová teorie o původu života, která již nemusí zahrnovat DNA jako informační molekulu a proteiny jako enzymy do ústřední role. Byly tedy potvrzeny předpovědi C. Woese, F. Cricka, R. Orgela a dalších, které se týkaly právě RNA katalýzy. Ribozymy mohly být prvním systémem schopným vlastní reprodukce [1]. Původ života se mohl tedy zakládat pouze na bázi RNA, která měla schopnost autoreprodukce a byla nositelkou dědičné informace zároveň. Spojení „svět RNA“ bylo poprvé použito roku 1986 molekulárním biologem Waltrem Gilbertem z Harvardské univerzity[2]. Zatímco DNA nemůže existovat bez proteinů, protože není možné, aby se bez nich replikovala, stejně tak budou těžko existovat proteiny, pro jejichž syntézu je nutný předpis zapsaný v DNA. Jestliže existoval RNA svět, tak obě tyto funkce zastávala jedna molekula a problém s tím, co bylo dříve, zda DNA nebo proteiny, je vyřešen. Podle teorie RNA světa, který měl existovat zhruba před 3,5 miliardami let, byla u biologických systémů později během evoluce preferována DNA a proteiny z několika důvodů. Pro přerod RNA světa ve svět DNA postavený na principech, jaké fungují v současné biologii, byly hlavní tři enzymy, a to: ribonukleotid reductáza, thymidylát syntáza a reverzní transkriptáza. Vznik DNA mohl proběhnout právě pomocí enzymů ribonukleotid reductázy, která katalyzuje syntézu 2'-deoxyribonukleotidů, a reverzní transkriptázy, která umožní přepis RNA na DNA. Thymidylát syntáza katalyzuje přenos methylenové skupiny na deoxyuridin monofosfát, čímž vzniká deoxythymidin monofosfát. Díky tomuto enzymu mohl být uracil vyskytující se v RNA nahrazen thyminem obsaženým v DNA. Pomocí těchto evolučních kroků se docílilo vzniku

chemicky stabilnější DNA, což je nezbytné pro přenos a uchování dědičné informace v průběhu jednotlivých generací organismů. Větší stabilita je dána právě chybějícím 2'-hydroxylem u deoxyribózy, kde díky tomu mohou atomy v deoxyribózovém kruhu zaujmout takovou pseudorotaci, tzv. pucker, která stericky umožní vytvořit rozšířené dvoušroubovice, dále je díky tomu zabráněno potenciálnímu rozštěpení řetězce bazickou hydrolyzou nebo nukleofilním atakem aktivovaného hydroxyly [19,20]. Přítomnost 2'-OH skupiny u ribózy v RNA však udává jedinečné chemické vlastnosti ribonukleotidového řetězce, které jsou pro jeho funkce klíčové. Proteiny jsou pro současné i minulé životní formy nezastupitelné strukturní a funkční jednotky, které RNA z hlediska jejich strukturní funkce nemůže nahradit. Oproti DNA mají polyaminokyselinové a polyribonukleotidové řetězce rozmanitější možnosti vytváření terciárních struktur, které mohou udávat právě enzymové vlastnosti molekuly. Proteiny mají znatelně více možností katalytické aktivity, zatímco ribozymy mají výrazně omezenější repertoár možných enzymatických reakcí. Je to dáno především větším počtem možných stavebních jednotek aminokyselinových řetězců oproti čtyřem nukleotidům RNA.

Katalytické schopnosti RNA jsou předmětem intenzivního výzkumu na mnoha světových pracovištích, co je však stále zahalené rouškou tajemství, je kompletní mechanismus replikace RNA v hypotetickém světě RNA. Výzkum ztěžuje hlavně fakt, že dnešní biologické systémy, když bereme v úvahu správnost hypotézy, během evoluce nahradily způsoby replikace, které stály při vzniku života, efektivnějšími mechanismy zahrnujícími proteinové enzymy. Odkazy RNA světa mohou být studovány pouze na předpokládaných reliktech světa RNA, které nám však v této oblasti poskytují nanejvýš nepřímé dedukce. Existuje několik teorií, jakým způsobem mohla replikace probíhat. Jednou z možností, která vylučuje enzymy, je templátem řízená polymerační reakce, při které dochází ke kondenzaci chemicky aktivovaných ribonukleotidů v polymerní řetězec. Syntéza je řízena a stabilizována komplementaritou k již existujícímu řetězci, tzv. templátu. Tento způsob replikace by však byl pomalý a náchylný k chybovosti, což je pro přenos genetické informace zásadní komplikací. Naskytá se otázka, zda nebyla templátem řízená polymerační reakce během evoluce postupně nahrazena důmyslnějším mechanismem, a to právě ribozymy [18].

Z dnešních poznatků vyplývá, že nejvíce pravděpodobným způsobem replikace pomocí ribozymů se jeví takový, jak ho známe u replikáz. Replikáza je z hlediska své funkce RNA-dependentní RNA polymeráza. Současné polymerázy využívají jako zdroj energie pro polymerační reakci štěpení vazby nukleosid-5'-trifosfátů přičemž vzniká anorganický difosfát a nukleotid se fosfátem připojí jako další článek nukleotidového řetězce. Stejný mechanismus se předpokládá i u ribozymových RNA replikáz v RNA světě. Takovou hypotetickou RNA replikázu by tvořil RNA enzym, skrze jehož aktivní místo by procházel jednořetězcový RNA templát ke kterému by se na základě komplementarity bází v aktivním místě dosyntetizovalo dceřiné vlákno. Na konci polymerizační reakce by stála dvoušroubovice RNA, která by se hned vzápětí rozpadla na dvě samostatná vlákna. Jedno z vláken, původní templát, může být znovu replikováno a druhé, dceřiné vlákno, se stává díky správné konformaci terciární struktury novou replikázou [18]. Žádný takový v přírodě se vyskytující ribozym nebyl doposud objeven. *In vitro* selekce a evoluce RNA však umožnila několika vědeckým skupinám získat ribozymy schopné katalyzovat tuto reakci. Vůbec první takto vytvořený syntetický ribozym byl RNA ligáza L1, kterou objevili a popsali Dr. Michael Robertson a Dr. Andrew Ellington.

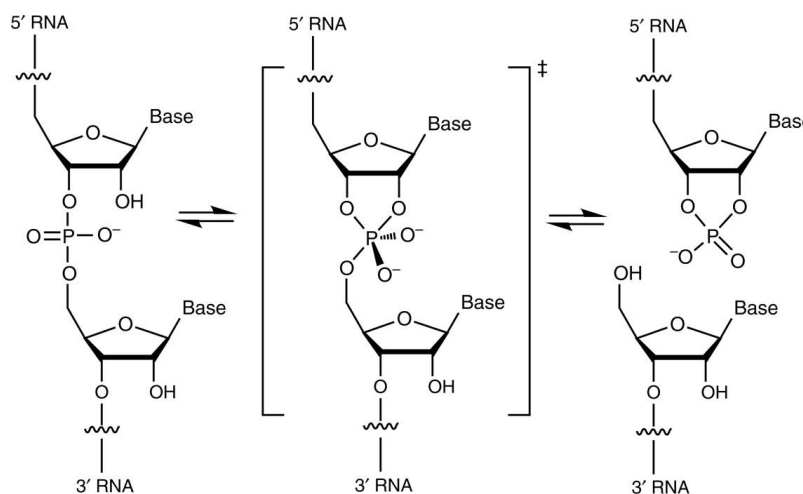
Existuje však několik nezanedbatelných problémů spojených s možností vzniku RNA světa. Je proto možné, že RNA svět koexistoval s jinými mechanismy, které taktéž stály u zrodu života na Zemi, nebo možná vůbec neexistoval.

2.6 PRINCIPY KATALYTICKÉHO ŠTĚPENÍ NUKLEOLYTICKÝCH RIBOZYMŮ

Během acidobazické katalýzy dochází k přenosu protonů (tzv. protonovému transferu) v přechodném stavu, kdy právě protony přenášené během těchto reakcí jsou oním katalyzátorem. Může se zdát překvapujícím, že přenos několika protonů sehraje tak obrovskou roli v reakcích mnohem většího měřítka a může v námi popisovaném případě vést ke štěpení ribonukleotidového řetězce. Přestože v buňkách fungují důmyslné pufrací systémy a pH je přísně střeženo okolo neutrální hodnoty, acidobazická katalýza je ve světě enzymů poměrně častá, avšak lze říct, že ještě častějším jevem je právě protonový transfer v jejich molekulách. Aby mohlo k těmto jevům docházet, je zapotřebí správné konformace reziduí, která nastaví vhodné disociační konstanty. Existují dva druhy acidobazické katalýzy, specifická a obecná. Během specifické acidobazické katalýzy umožní průběh reakce volné ionty H_3O^+ , oxonium, nebo $(\text{OH})^-$, hydroxidový anion. Při obecné acidobazické katalýze tvoří zásadu i bázi konkrétní částice. Protonový transfer je zprostředkován bezprostřední výměnou kationtů H^+ mezi konkrétní bází a konkrétní kyselinou přímo v aktivním místě enzymu, oproti tomu u specifické acidobazické katalýzy se jedná o prostou difuzi volných H_3O^+ a $(\text{OH})^-$ iontů do aktivního místa. Obecnou acidobazickou katalýzu samo-štěpící reakce v dinukleotidu aktivního místa malých (tzn. nukleolytických) ribozymů lze popsat jako odevzdání protonu 2'-OH skupiny nukleotidu nad štípaným fosfátem obecné bázi s volným elektronovým párem (tzn. Lewisova báze), čímž je aktivována nukleofilita kyslíku vůči fosforu v jeho blízkosti. Nukleofilním atakem systém přejde do přechodného neboli tranzitního stavu. Na druhé straně aktivního místa enzymu obecná kyselina představovaná elektronově deficitní částicí (tzn. kladně nabitou protonizovanou elektrofilní částicí) poskytne proton 5'-kyslíku z druhého nukleotidu, který má během tranzitního stavu oslabenou fosfoesterovou vazbu na centrální fosfát v aktivním místě. Protonový transfer zahrnuje oslabení vazeb kyslík–vodík v 2'-OH skupině za současného vznikání nové vazby obecná Lewisova báze–proton a oslabení vazby obecná kyselina–proton za vznikání nové vazby mezi proton–opouštějící 5'-kyslík. V celém řetězci zániku a vzniku vazeb se střídají ze strany obecné báze až po obecnou kyselinu částice s nadbytkem elektronů a částice s jejich nedostatkem. Přechodně rovnovážné poměry v elektronovém rozložení nastanou během tranzitního stavu. Zjednodušeně si lze také představit pohyb protonů jedním směrem a pohyb elektronů směrem opačným.

Nukleolytické ribozymy katalyzují intramolekulární místně specifické štěpení vlastní ribózo-fosfátové kostry a případně i reverzní reakci, tedy její ligaci. Samoštěpení probíhá na základě mechanismu obdobného RNáze A, kdy dochází ke čtyřem reakčním krokům: správná prostorová orientace komponentů aktivního místa (i), aktivace nukleofilu (ii), stabilizace přechodného stavu (iii) a protonace opouštějící skupiny (iv) [17]. Umožnění štěpení a jeho následná rychlost jsou dány právě těmito parametry reakce.

Ještě jednou se podíváme do aktivního místa na průběh samo-štěpení. Nukleázovou aktivitu zahájí nukleofilní atak Lewisovou bází aktivované 2'-OH skupiny na sp^3 hybridizovaný fosfor navázaný přes kyslík na C3' v blízkosti nukleofilu, kterým se stal kyslík aktivované hydroxylové skupiny. Během přechodného stavu fosfor zaujme geometrii trigonální bipyramidy (sp^3d) a tvoří vazbu s pěti kyslíky, celý komplex je stabilizován konkrétními vnějšími činiteli podle typu reakce (nejčastěji ionty kovů, okolní báze a jejich interakce). Jak je patrné, jedná se o mechanismus bimolekulární substituce nukleofilní $S_N2(P)$, při které je 2'-kyslík, fosfor a 5'-kyslík v jedné linii, podle které se nukleofilní atak označuje jako „in line“. Na druhé straně je 5'-kyslíku předán proton obecnou kyselinou za současného přerušení vazby na fosfor, čímž je tato fosfoesterová vazba rozštěpena a s ní tedy i RNA řetězec. Výsledkem této reakce bohaté na elektronový přenos je 2',3'-cyklický diester fosfátu a 5'-OH skupina na následujícím, tedy 3'-proximálním, nukleotidu opouštějícího řetězce. V podstatě se tedy jedná výhradně o spontánní transesterifikaci nebo také jinými slovy izomeraci 3',5'-fosfodiesteru.



Obr. 14: Schéma katalytického štěpení nukleolytických ribozymů [30]

Praktickým využitím těchto teoretických znalostí můžeme získat krystalické struktury původních nebo mutantních ribozymů v různých fázích samoštěpící reakce nebo struktury průběh reakce mimikující. Studuje se také vliv přítomnosti iontů různých kovů a jejich vazebná specifita, zjišťuje se minimální katalyticky aktivní délka ribonukleotidového řetězce, vytvářejí se trans-acting verze ribozymů, provádějí se obměny obecné kyseliny a obecné báze, chemicky se modifikují ribonukleotidy, zkoumá se vliv pH a ionizace, pomocí počítačových simulací se modeluje protonový transfer nebo enzymová dynamika. Obecně řečeno, hlavním předmětem zájmu praktických přístupů ve výzkumu RNA katalýzy je provést co nejšetrnější způsob inhibice reakce tak, aby bylo možné pořídit krystalovou strukturu, která nám podá co nejméně zkreslenou informaci o struktuře aktivního místa, a tedy i o nejpravděpodobnějším průběhu samoštěpení, který je u dané struktury studován především pomocí výpočetních metod v počítačových simulacích.

2.7 METODY ZKOUMÁNÍ RIBOZYMŮ

V této části se budeme věnovat metodám výzkumu ribozymů. Jedná se o metody popisující strukturu, funkci a vlastnosti ribozymů. Zabýváme se pouze vybranými metodami, neboť obsáhnout celou škálu experimentálních a teoretických způsobů komplexního studia RNA katalýzy je nad rámec této práce.

2.7.1 Experimentální metody výzkumu

2.7.1.1 *Klonované cDNA verze RNA motivu a technika místem řízené mutagenese*

Jedním ze způsobů, jak získat dostatek RNA pro výzkum, je transkripce z klonovaných cDNA verzí požadované RNA. Zkoumaný RNA motiv je možné *in vitro* reverzně transkribovat do podoby kódující DNA, která je následně vložena do plazmidových vektorů a namnožena bakteriemi, ze kterých je poté možné zpětně izolovat dostatečné množství cDNA a funkčním promotorem umožnit přepsání na RNA [21,23]. Při této metodě se také provádí technika místem řízené mutagenese, která dovoluje vnášet mutace na konkrétní místa sekvence DNA a zjistit tak míru konzervovanosti nukleotidů přepsaného RNA motivu ribozymu, případně nukleotidy pro autokatalýzu klíčové [22,23].

2.7.1.2 *Krystalografie s následnou analýzou pomocí elektromagnetického záření*

Pro získání prostorového uspořádání atomů v molekule je mnohdy vhodné použít metodu krystalizace zkoumané látky a následné prozáření krystalu vhodným typem záření (fotony, elektrony, neutrony) s určitou energií. Experimentální metoda zabývající se komplexně takovou analýzou se nazývá krystalografie. Studuje atomární strukturu krystalů na základě jejich interakcí s určitým typem zářením.

2.7.1.2.1 Rentgenová strukturní analýza

Experimentální analytická metoda založená na principu difrakce monochromatického svazku rentgenových paprsků procházejícího krystalem se nazývá rentgenová (RTG) strukturní analýza nebo také rentgenová difrakční (XRD) analýza či rentgenová difraktometrie. Jedná se o v praxi velice rozšířenou přístrojovou metodu, která nabízí mnoho možností a poskytuje značné množství údajů o zkoumaném vzorku, který navíc po ukončení analýzy zůstane zachován. Je možné ji rozdělit na krystalografii malých a velkých molekul, kde je pomyslnou dělicí hranicí molekula o 1 000 atomech vyjma těch vodíkových. Další rozdíl v RTG strukturních analýzách spočívá v charakteru zkoumaného vzorku. Je možné se zabývat čistým monokrystalem nebo polykrystalem. V případě hojného zastoupení malých molekul ve vzorku nebo pevného vzorku polykrystalického se používaná metoda vymezuje jako prášková RTG strukturní analýza a využívá RTG záření diskrétní vlnové délky dané materiálem anody rentgenové lampy. V naší práci se blíže zaměříme na monokrystalovou RTG difraktometrii, protože ta má velký význam pro získávání statických dat o struktuře ribozymů. V oblasti výzkumu biomakromolekul se měření musí provádět za snížené teploty (tzv. kryoprotekce), aby nedošlo k radiačnímu poškození vzorku, a záření bývá často synchrotronové.

Pomocí RTG strukturní analýzy můžeme zjistit parametry krystalové mřížky, např. velikost elementární buňky, délku vazeb mezi atomy a také úhly mezi těmito vazbami nebo mikrodeformace krystalové mřížky. Jsme schopni identifikovat, jaké strukturní fáze se ve vzorku vyskytují a v jakém počtu

Záření dopadající na vzorek, označované jako primární, postupně prochází jeho jednotlivými vrstvami a interakcí elektronových obalů částic (atomy, molekuly, ionty) se svazkem záření dochází k elastickému rozptylu a záření je difraktováno do mnoha směrů. Elektrony jednotlivých ozářených atomů jsou rozkmitány na stejnou frekvenci, jakou má dopadající RTG záření, čímž se stanou zdrojem záření sekundárního o stejné vlnové délce. Záření tedy neztrácí energii, jednotlivé vlny mohou být vůči sobě v různé fázi a podstupují interferenci, na jejímž konci ze vzorku vychází soubor difraktovaných vln. Záření vycházející ze vzorku má pozměněný směr a pro danou strukturu vytváří charakteristický difrakční obraz, což je soubor jednotlivých difrakčních stop, které vypovídají o prostorovém rozložení difraktovaných vln a zpětně tedy i o poloze atomů

v krystalové mřížce. Ve 2D zobrazení difrakčního obrazu na fotografickém filmu lze pozorovat uspořádání interferenčních maxim do tzv. difrakční linie, která odpovídá souboru rovnoběžných rovin v krystalické mřížce vzorku.

Grafickým výstupem RTG strukturní analýzy je tzv. difraktogram, kde každý pík znázorňuje polohu a intenzitu difrakce, což jsou analyticky hodnotné informace. Poloha závisí na velikosti, tvaru a atomárním uspořádání elementární buňky a intenzita je dána interakcí rentgenových paprsků s elektrony v elementární buňce. Z poloh difrakcí se stanoví rozměr elementární buňky a z jejich intenzit je možné vyčíst teplotně-vibrační parametry a pozice atomů. Tvar píků vypovídá o fyzikálních vlastnostech materiálu. Vzor rentgenové difrakce zaznamenaný na fotografickém filmu lze vnímat jako analogii k „otisku prstu“ konkrétního krystalu. Kvalita difraktogramu závisí na čistotě vzorku, tedy na míře dokonalosti jeho krystalické struktury. Vnitřní symetrické uspořádání musí být co nejvyšší, abychom mohli obdržet kvalitní záznam struktury. Difraktogram tedy odráží uspořádání částic v elementární buňce a fyzikální vlastnosti vzorku

2.7.1.2.2 Infračervená spektrometrie

Jedná se o nedestruktivní analytickou metodu, která využívá energii fotonů z infračervené části spektra elektromagnetického záření k tomu, aby u zkoumaného vzorku zvýšila pohyby atomů kolem svých vazeb. Dochází tedy interakci zkoumané látky infračerveného záření, která může mít dvojí charakter: buďto dojde k pohlcení fotonu (absorpční IR spektrometrie), anebo k jeho vyzáření (emisní IR spektrometrie). Při tomto procesu nedochází k excitaci elektronů, pro kterou není energie dostatečná, zato dojde ke změně vibračního (a v případě plynné fáze i rotačního) stavu molekuly, neboť vazba atomů v molekulách není statická, ale osciluje kolem rovnovážné polohy a přijetím energie dopadajícího IR záření se pohyby tohoto druhu zvýrazní. Základní vibrační stav molekuly je ovlivněn hmotností atomů vazbu v molekule sdílejících a dále silou této vazby.

Dle druhu použitého IR záření můžeme spektrometrii dále rozdělit na tři podskupiny a to blízkou, střední a dalekou (dělení na základě vlnočtu). Změřením hodnot změny vibračních energií studovaného vzorku, které obdržíme ve formě tzv. infračerveného spektra, pak můžeme odvodit jeho chemické složení a geometrické uspořádání atomů. Z principu této metody vyplývá, že pro její správnou interpretaci je nutné zabývat se kvantově-mechanickým pojetím [26, 27].

2.7.1.2.3 Ramanova spektrometrie

Stejně jako IR spektrometrie také Ramanova spektrometrie využívá interakce záření a zkoumané hmoty, obě techniky se řadí mezi elektromagnetické spektrometrie a v praxi jsou často kombinovány, neboť data získaná každou z těchto metod zvláště se často vzájemně doplňují. Ramanovo spektrum je z hlediska píků jednodušší než IR spektrum. Při Ramanově spektrometrii je vzorek prosvícen laserovým paprskem, který buďto vzorkem projde (většina záření), anebo reaguje se vzorkem tak, že jsou fotony absorbovány, elasticky rozptýleny nebo neelasticky rozptýleny. Interakce fotonů s molekulami vzorku může mít trojí charakter. Elastický rozptyl nastává, když dopadající záření excituje elektron na virtuální energetickou hladinu a následný přechod elektronu zpět do základního stavu je doprovázen vyzářením fotonu stejné vlnové délky, jako měl foton excitující, a to libovolným směrem – tento jev se nazývá Rayleighův rozptyl a z hlediska analýzy není nositelem informace o složení vzorku (i). Dále může dojít k Ramanovu rozptylu (označovanému též jako Ramanův jev), na němž je založen princip této analytické metody, neboť při něm dojde ke změně energie fotonů, ze které je možné zjistit složení vzorku. Během Ramanova jevu, který je ve své podstatě neelastickým optickým rozptylem, si dopadající foton laserového paprsku a elektron ze vzorku předávají energii a z pohledu klasické fyziky dochází ke změně dipólového momentu během vibračního pohybu molekuly. Foton interaguje s elektronem, který byl buďto již v excitovaném, nebo v základním stavu. Při předání kvanta energie elektronu v základním stavu dochází v tomto případě také k jeho excitaci, avšak následná deexcitace se neuskuteční zpět do stavu základního, nýbrž do hladiny energeticky bohatší (tzv. Stokesův rozptyl), přičemž je vyzářen foton s nižší energií tedy i frekvencí, než měl foton dopadající (ii). Oproti tomu během anti-Stokesova rozptylu jsou vyzářeny fotony s vyšší energií a frekvencí, než mělo dopadající záření, protože elektron v původně excitovaném stavu přešel do nižší energetické hladiny a energetický rozdíl mezi těmito

hladinami byl předán emitovanému fotonu (iii). Jednoduše řečeno Stokesův rozptyl nastává, když má emitovaný foton nižší energii (tzn. také frekvenci), než měl foton absorbovaný, a anti-Stokesův rozptyl nastává, když má emitovaný foton vyšší energii (tzn. také frekvenci), než měl foton absorbovaný – jedná se o opačný stav, jak už naznačuje předpona anti. Ramanovo spektrum, tedy grafický záznam analýzy (osa x – vlnočet, osa y - transmitance), poskytuje informace o vibračních případně rotačních pohybech molekul a obsahuje Stokesovy a anti-Stokesovy píky symetricky rozložené podle elastického Rayleighova rozptylu. Často se měří pouze linie Stokesova rozptylu a vždy je nutné odfiltrovat Rayleighův rozptyl, jehož intenzita je zhruba 10^5 – 10^{12} krát vyšší než intenzita Ramanova rozptylu. Posun frekvencí fotonů Ramanova rozptylu ve srovnání s frekvencemi fotonů laserového paprsku nám podává informaci o rozdílech jednotlivých kvantových hladin molekul ve vzorku, díky čemuž je možné určit jeho složení.

2.7.2 Teoretické metody výzkumu

2.7.2.1 *Strukturní databáze – RCSB Protein Data Bank (RCSB PDB)*

Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB) si klade za cíl spolupráci ve výzkumu na poli strukturní biologie vytvořením on-line databáze veškerých získaných 3D struktur biomakromolekul a jejich sekvencí. Na serveru <http://www.rcsb.org/> se nachází informace o biologických strukturách, jako jsou např. proteiny nebo nukleové kyseliny. Z této stránky čerpají jak studenti, tak i odborní pracovníci, jelikož tato databáze nabízí podklad pro zkoumání a zjišťování základů fungování biomakromolekul ve formě jejich publikovaných struktur.

RCSB PDB Deposit Search Visualize Analyze Download Learn More MyPDB Login

Structure Validation Hide

View the full validation report

Metric	Percentile Ranks	Value
Rfree		0.266
Clashscore		14
RSRZ outliers		4.6%
RNA backbone		0.71

Worse Better
 ■ Percentile relative to all X-ray structures
 ■ Percentile relative to X-ray structures of similar resolution

Source Hide

Polymer: 1
 Scientific Name: Synthetic construct [Taxonomy](#)

Polymer: 2
 Scientific Name: Synthetic construct [Taxonomy](#)

Polymer: 3
 Scientific Name: Synthetic construct [Taxonomy](#)

Related PDB Entries Hide

Identifier	Details
2P7F	The Novel Use of a 2',5'-Phosphodiester Linkage as a Reaction Intermediate at the Active Site of a Small Ribozyme
3B5A	
3B5F	
3B5S	
3B91	
3BBI	
3BCK	
3BBM	

Release: 2008-08-12
Last Modified (REVDAT): 2009-02-24

Revision History Hide

Mouse over text for details
 2011-07-13
 Version format compliance

Experimental Details Hide

Method: X-RAY DIFFRACTION
Exp. Data:
 Structure Factors
 EDS

Resolution(A): 2.65
R-Value: 0.237 (obs.)
R-Free: 0.262
Space Group: P 6₁ 2 2
Unit Cell:
 Length (A) Angles (°)
 a = 93.37 α = 90.00
 b = 93.37 β = 90.00
 c = 132.27 γ = 120.00

Obr. 15: RCSB PDB

RCSB PDB Deposit Search Visualize Analyze Download Learn More MyPDB Login

Summary 3D View Sequence Annotations Seq. Similarity 3D Similarity Literature Biol. & Chem. Methods Links

Minimally Junctioned Hairpin Ribozyme Incorporates A38G Mutation and a 2',5'-Phosphodiester Linkage at the Active Site

DOI: 10.2210/pdb/3b58/mbh - PDB ID: 3b58

Primary Citation

Structural effects of nucleobase variations at key active site residue Ade38 in the hairpin ribozyme.
 MacErevey, C.P., Salter, J.D.P., Krucinska, J.P., Wedekind, J.E.P.
 Journal: (2008) Rna 14: 1600-1616
 PubMed: 18596253
 PubMedCentral: PMC2491461
 DOI: 10.1261/rna.1055308

PubMed Abstract:
 The hairpin ribozyme requires functional groups from Ade38 to achieve efficient bond cleavage or ligation. To identify molecular features that contribute to catalysis, structures of position 38 base variants 2,6-diaminopurine (DAP), 2-aminopurine (AP), cytosine (Cyt), and guanine (Gua) were determined... [Read More & Search PubMed Abstracts]

Molecular Description Hide

Classification: RNA
Structure Weight: 20241.45
Molecule: Loop A Substrate strand

Polymer	Type	Length
1	ma	13
Chains: A		
Details: 2'5' phosphodiester linkage between A6 and G7		
Molecule: 29-mer Loop A and Loop B Ribozyme strand		
2	ma	30
Chains: B		
Details: Synthetic polyethylene glycol linker at hinge position 14		
Molecule: Loop B S-turn strand		
3	ma	19
Chains: C		
Mutation: A38G, U39C		

Structure Validation Hide

View the full validation report

Biological Assembly 2

3B58

3D View More Images...
 Biological assembly 1 assigned by authors and generated by PISA (software)
Downloadable viewers:
 Simple Viewer Protein Workshop
 Kiosk Viewer

MyPDB Personal Annotations Hide

To save personal annotations, please login to your MyPDB account.

Deposition Summary Hide

Authors: MacErevey, C.P., Krucinska, J.P., Wedekind, J.E.P.
Deposition: 2007-10-25
Release: 2008-08-12
Last Modified (REVDAT): 2009-02-24

Feedback

Obr. 16: RCSB PDB

Z webové stránky Celosvětové proteinové banky (angl. Worldwide Protein Data Bank, zkratka – wwPDB, web <http://www.rcsb.org/pdb/>) lze nahrát molekuly do PyMOLu pomocí čtyřmístného kódu uvedeného u každé struktury (na obr. 16 označeno pod číslem 1) a v tomto programu můžete se strukturou pracovat. Na webové stránce PDB se lze i bez nutnosti mít nainstalovaný PyMOL podívat, jak vypadá schéma molekuly (obr. 16, číslo 2) nebo dokonce její 3D podoba, se kterou však můžeme pracovat pouze omezeně. U každé molekuly je napsána anotace, jelikož každá struktura je spojená s vědeckým článkem, ve kterém byla publikována. Pod číslem 3 jsou na obr. 16 označeny informace o citaci původní práce. Číslo 4 na obr. 16 označuje základní popis kvality a původu molekuly (název a typ molekuly; strukturní podrobnosti; organismu, ze kterého byla struktura získána; genetické informace; odkazy a další). K dané struktuře bývají často přidruženy vedle primární citace také kódy odkazující na příbuzné struktury, které se často vztahují k jednomu výzkumu. Tyto struktury se v případě ribozymů mnohdy lišily především způsobem inhibice a my jsme je často porovnávali na základě rozdílných hodnot dihedrálů v aktivním místě, jak se můžete dočíst v praktické části.

2.7.2.2 *Molekulárně dynamické a kvantově mechanické studie*

Jelikož v jedné molekule může být několik tisíc atomů, bylo potřeba vymyslet matematický model, který by byl schopen pracovat s takovým obrovským množstvím dat za přiměřeně krátkou dobu. Proto se začal používat matematický model, ve kterém se atomy začaly uvažovat jako sféry, které mají poloměr získaný z měření nebo teorie, která je pro výpočet použita. (Z uvedeného vyplývá, že se protony a elektrony jako jednotlivé částice ve výpočtech vůbec nezohledňují.) Dále se vazby mezi jednotlivými atomy považují ze svého principu za pružiny.

Pro počítání s molekulami taky musíme předdefinovat jejich vlastnosti, což znamená, že musíme uvažovat, jaké interakce mezi sebou budou realizovat. Z toho vyplývá, že z interakcí mezi jednotlivými sférami a pružinami jsme schopni získat uspořádání atomů a jejich energií.

Silové pole. Co se energie týče, je dána konformací molekuly, přičemž rozdíl energií mezi jednotlivými uspořádáními není důležitý ve své absolutní hodnotě, ale z hlediska poměrů těchto energií. Mechanickou energii molekuly nám dává následující rovnice:

$$\text{Energie} = \text{Protahovací energie} + \text{Ohýbací energie} + \text{Torzní energie} + \text{Energie ne vazebních interakcí}$$

Tato rovnice společně s daty, která jsou potřeba pro popsání chování různých druhů atomů a vazeb, se nazývá silové pole.

Protahovací energie. Vztah vyjadřující tuto energii je založen na Hookově rovnici. Označuje velikost energie molekuly oproti jejímu ideálnímu stavu. Rovnice vypadá následovně:

$$E = \sum_{\text{vazba}} k_b (r - r_0)^2$$

Tento vztah sčítá všechny čtvercové vzdálenosti mezi ideální délkou vazby r_0 , kdy je energie nejnižší, a skutečnou délkou vazby r . Parametr k_b definuje tuhost vazby.

Ohýbací energie. Zde je opět popsáno, jakou energii mají molekuly, když se vychylují z ideálního stavu, tentokrát se však jedná o úhly:

$$E = \sum_{\text{úhly}} k_\theta (\theta - \theta_0)^2$$

kde k_θ je parametr tuhosti úhlu, θ je reálný úhel a θ_0 ideální úhel.

Torzní energie. Vztah pro tuto energii zahrnuje způsob, jakým je molekula natočená. Je to energie, kterou musíme přidat k energii ne vazebných interakcí, ohýbací a protahovací, abychom dostali celkovou energii molekuly. Zahrnuje způsob jakým je molekula natočená.

$$E = \sum_{\text{Torza}} A [1 + \cos(n\tau - \Phi)]$$

Parametr A , n a Φ jsou parametry rovnice určující její periodu a amplitudu při úhlu τ . Parametr n nám určuje typ symetrie molekuly.

Nevazebné energie. Zahrnují všechny možné nevazebné energie, které jsou možné mezi atomy i a j . Jedná se v zásadě o dvě hlavní interakce, van der Waalsovy síly (první část rovnice) a elektrostatická interakce (druhá část rovnice).

$$E = \sum_i \sum_j \frac{-A_{ij}}{r_{ij}^6} + \frac{B_{ij}}{r_{ij}^{12}} + \sum_i \sum_j \frac{q_i q_j}{r_{ij}}$$

A a B určují, jaký je poměr mezi atomy vytvářejícími van der Waalsovu sílu. Část rovnice pro energii elektrostatickou je založena na Coulombově zákoně, kde q je náboj a r_{ij} je vzdálenost mezi atomy.

2.7.2.2.1 Molekulární dynamika

Na rozdíl od předešlé kapitoly se zde nebudeme zabývat vnitřní energií molekuly, ale energií, kterou disponuje molekula díky pohybu.

Pro popsání dynamiky molekuly jsou důležité dvě věci. Termodynamika popisuje řídicí síly, které určují reakci a způsobují pohyb, a tudíž i rozdíl mezi jednotlivými energetickými stavy během reakce. Mechanismus, díky kterému pohyb nastane, je vyjádřen pomocí kinetiky, která nám popisuje, co se děje během přechodu z jednoho stavu do druhého.

Síla, která zapříčiní pohyb molekuly, se vypočítá lehce z Newtonovy rovnice:

$$F_i = m_i a_i$$

Simulace pohybu molekuly i se potom vytváří tak, že vypočítáme periodickou sílu (klasicky 10^{-12} sekundy) působící na každý atom, přičemž se využívá výpočtu síly za pomoci derivací, kdy počítáme změnu energie a pozice daného atomu i :

$$F_i = -\frac{dE}{dr_i}$$

Nakonec hlavní vztah využívaný v simulacích:

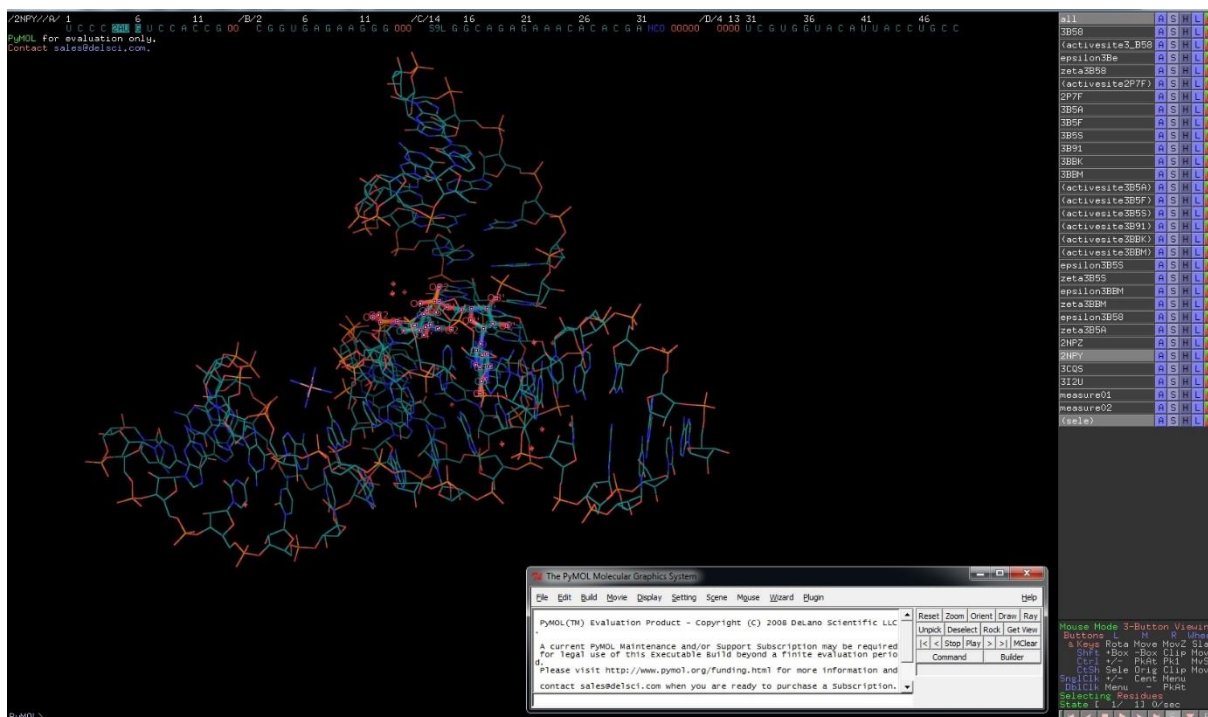
$$m_i \frac{d^2 r_i}{dt^2} = - \frac{dE}{dr_i}$$

Energie se při reakci vypočítá dvěma metodami. První je použitím molekulární mechaniky a druhá metoda využívá kvantovou mechaniku. Molekulární mechaniku lze použít v případě, že nedochází k velkým změnám v molekule, výpočty jsou proto jednodušší, než při použití kvantové mechaniky, kterou lze použít i při velkých změnách molekuly během reakce, ale výpočty bývají náročné nebo nespočítatelné za normálních okolností.

2.7.2.3 Chemický software – PyMOL

PyMOL je open-source grafický systém umožňující teoretické prohlížení a zkoumání molekul založený na programovacím jazyku Python, vyvinut a vydán Warrenem DeLanoem v roce 2000, který se narodil v Pensilvánii a byl velice angažován, co se týče programů pro vědeckou práci. S pomocí PyMOLu můžeme zkoumat detailní strukturu biomakromolekul, v našem případě ribozymů. Program obsahuje i určité možnosti výpočtu pro dopočet struktury, například Poisson-Boltzmannových rovnic nebo výpočty pro geometrii struktury – v této práci jsme této možnosti využili pro výpočet dihedrálů a in-line attack úhlů, se kterými jsme následně statisticky pracovali. Porovnávali jsme spoustu struktur, občas i více molekul odvozených z jednoho krystalu, ale aktivní místo bylo mnohdy různě inhibováno, takže se naměřené hodnoty více nebo méně lišily a díky funkci *pair fit* jsme mohli vzájemně porovnat deformace molekul. Také jsme byli schopni generovat obrázky ve vysokém rozlišení.

Na obr. 17 lze vidět nahranou strukturu hairpin ribozymu v PyMOLu. Uprostřed struktury je označené a zvýrazněné aktivní místo dvou ribozymů, jeden je zobrazen a druhý je skrytý. V pravé části je vidět sloupec s nahrávanými strukturami a provedená měření. Řádek nahoře zobrazuje sekvenci reziduí a slouží k snadnému a přehlednému označení bází v molekule.



Obr. 17: PyMOL

V PyMOLu je možné pomocí Pythonu vytvořit vlastní funkci, kterou můžeme nahrát pomocí konzole zobrazené na spodní straně obrázku. My jsme používali takto napsanou funkci na měření puckeru u aktivního místa. Struktury nahrané v PyMOLu jsme čerpali z RCSB protein data bank.

2.8 DĚLENÍ RIBOZYMŮ

V přírodě se vyskytující RNA s enzymatickou aktivitou můžeme rozdělit do dvou hlavních skupin lišících se průběhem štěpení ribonukleotidového řetězce. Jsou to tzv. velké ribozymy (large ribozymes) a malé samo-štěpící ribozymy nazývané též nukleolytické ribozymy (small self-cleaving ribozymes / nucleolytic ribozymes). Velké ribozymy se štěpí pomocí externího nukleofilního ataku a využívají při tom většinou dva ionty hydratovaného kovu, často Mg^{2+} . Jeden hydratovaný hořečnatý ion je koordinován na útočící nukleofil a druhý na opouštějící skupinu. Dvojmocné hořečnaté ionty mají několik funkcí, mezi které patří aktivace nukleofilu, stabilizace vysoce záporně nabitého přechodného stavu během štěpení ribózofosfátové kostry a neutralizace nábojů koncových skupin. Obě skupiny ribozymů se liší také produktem, který vzniká jejich štěpením. Produkt štěpení velkých ribozymů je RNA s volným 3'-hydroxyem a 5'-fosfátem na druhém konci. Oproti tomu u malých ribozymů se řetězec rozštěpí na dvě menší RNA, z nichž jedna nese 2',3'-cyklický fosfát a druhá 5'-hydroxyl.

2.9 MALÉ SAMO-ŠTĚPÍCÍ RIBOZYMY

V současnosti známe šest malých samo-štěpících ribozymů. Jejich strukturu, funkci, průběh autokatalytického štěpení a další zajímavosti popisujeme v praktické části společně s provedenou analýzou aktivních míst dostupných struktur daného ribozymu ze strukturní databáze RCSB PDB.

2.10 VYUŽITÍ NUKLEOLYTICKÝCH RIBOZYMŮ

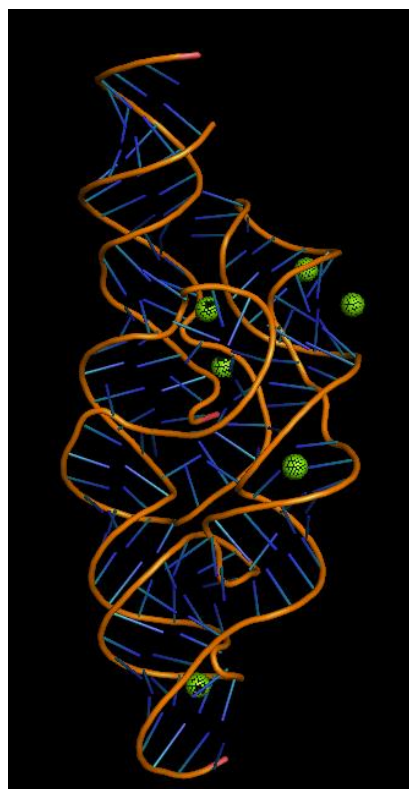
Nabízí se několik oblastí, ve kterých by bylo možné využít RNA katalýzy. Ribozymy by například mohly posloužit pro mapování funkce genů a bylo by možné uplatnit je v léčbě nebo prevenci virových onemocnění, při které by ve své trans-acting formě cílily patogenní RNA viru. Štěpením mRNA v buňkách by mohly regulovat množství genového produktu a upravovat důsledky disregulované exprese. Z hlediska terapeutického využití ribozymů jsou nejvíce diskutovaná závažná onemocnění, jako je rakovina, AIDS nebo Alzheimerova-Fischerova choroba – v této oblasti již nějakou dobu probíhá výzkum *in vivo*, který přináší zajímavé výsledky. Dříve nebylo u některých ribozymů zcela jasné, zda pozorovaná autokatalýza RNA řetězce probíhá také *in vivo* nebo zda je pouze výsledkem změněných podmínek během a po izolaci RNA, a tedy má-li pozorované samo-štěpení vůbec nějaký biologický význam. Bylo však na mnoha příkladech prokázáno, že ribozymy efektivně plní svou funkci také v intracelulárním prostředí [39].

3.1 Přírozené nukleolytické ribozymy

Na tomto místě uvádíme ribozymy vyskytující se v živých systémech – tedy takové, jejichž motiv nebyl připraven uměle.

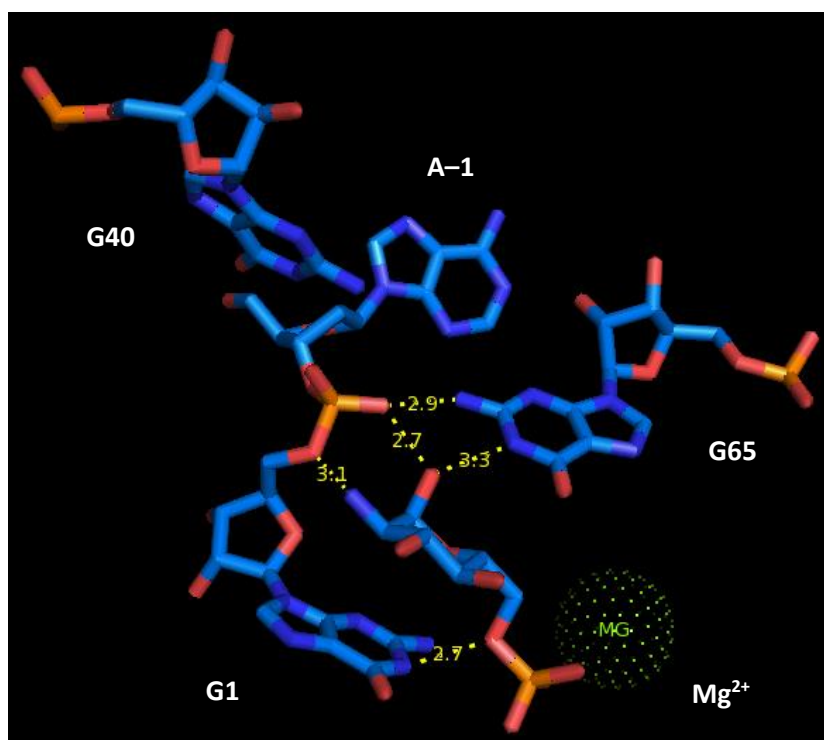
3.1.1 *glmS* ribozym

Název *glmS* ribozymu nás odkazuje na syntézu glukosamin-6-fosfátu (GlcN6P), která je katalyzována enzymem GlcN6P syntázou se zkratkou *glmS* (označení genu a jeho transkriptu pak *glmS*). Ve struktuře 5'-nepřekládané oblasti (5'UTR) mRNA kódující tento enzym můžeme najít právě *glmS* ribozym. Tento ribozym je zároveň také ribospínačem (ang. riboswitch) GlcN6P syntázy. Pro uskutečnění RNA katalýzy je nutné navázání GlcN6P jako kofaktoru umožňujícího samoštěpení – zde se projevují tzv. aptamerové vlastnosti RNA, tedy obecně popsáno schopnost oligonukleotidu specificky rozpoznávat a vázat pomocí slabých vazebných interakcí nejčastěji malé molekuly ligandu na základě svého prostorového uspořádání, což probíhá současně se změnou konformace nukleotidového řetězce. Navázání kofaktoru GlcN6P v tomto případě indukuje správnou konformaci pro in-line attack úhel a za aptamerovou konformační změnu můžeme považovat nanejvýš výsledné samoštěpení.



Obr. 18 *GlmS* ribozym (2GCS), zeleně zvýrazněny hořčnaté kationty

Reziduum G40, které se nachází v blízkosti aktivního místa, konkrétně 2'-OH skupiny A-1, se dle molekulárně dynamických studií podílí na stabilizaci in-line konformace nukleofilu nebo na elektrostatické stabilizaci tranzitního stavu. V mutantních strukturách s tranzicí G40A téměř nenastává snížení pKa aminoskupiny ani zvýšení pKa fosfátu po vstupu GlcN6P do aktivního místa, k čemuž však v přirozené formě ribozymu významně dochází. Tento druh mutace inaktivuje štěpení ribozymu v přítomnosti GlcN6P, díky čemuž mohou být pořízeny krystaly ribozymu s navázeným přirozeným kofaktorem v aktivním místě. Změna pKa aminové skupiny je přibližně dvakrát větší než změna pKa fosfátu [37]. Dále je důležité neopomenout také nukleotid G65, který nejspíš zastává důležitou úlohu ve věci správného navázání kofaktoru do aktivního místa, stabilizuje totiž vodíkový můstek mezi hydroxylem uhlíku C1 cukerného kruhu GlcN6P a fosfátovým *pro*-Rp kyslíkem (O2P kyslík nevytvářející esterovou vazbu) aktivního místa, čímž je v důsledku posílena také interakce mezi protonizovanou aminovou skupinou a opouštějícím kyslíkem G1 štípaného dinukleotidu. Výzkum nasvědčuje také tomu, že *pro*-Rp kyslík působí jako obecná báze, čemuž napomáhají zmínené interakce [36]. Rekognici molekuly GlcN6P zprostředkuje koordinace iontů Mg^{2+} na fosfátové skupiny v blízkosti aktivního místa a specifická interakce cukerného kruhu GlcN6P s nukleovými bázemi (viz také obr. 16).



Obr. 19

Aktivní místo *glmS* ribozymu s navázeným GlcN6P (PDB ID: 2Z75, rozlišení 1,70 Å), naznačeny následující slabé vazebné interakce:

- N1 z G1 – fosfát z GlcN6P (2,7 Å)
- N2 z GlcN6P – opouštějící O5' G1 (3,1 Å)
- O1 z GlcN6P – *pro*-Rp kyslík G1 (2,7 Å)
- O1 z GlcN6P – N1 z G65 (3,3 Å)
- N2 z G65 – *pro*-Rp kyslík G1 (2,9 Å)

Celý komplex aktivního místa *glmS* ribozym-GlcN6P je stabilizován přítomnými hořečnatými ionty, které se však štěpení nijak neúčastní [9]. Teoreticky je možné, aby aminoskupina molekuly GlcN6P vystupovala jako obecná báze, nebo za vhodných podmínek ve svém protonizovaném stavu působila jako obecná kyselina. Nicméně úloha amino skupiny jako obecné báze je znemožněna především velkou vzdáleností od 2'-OH skupiny A-1. Teoretickými výpočty bylo zjištěno a také experimentálně prokázáno, že aminoskupina je protonizovaná $-(NH_3)^+$ a působí tedy během štěpení jako obecná kyselina. V případě navázání glukóza-6-fosfátu (Glc-6-P), u kterého je amino skupina nahrazena hydroxy skupinou, je samo-štěpení *glmS* ribozymu inhibováno a vazba Glc-6-P na ribozym je nezávislá na přiměřené změně pH. Podobně, pokud se naváže glukosamin, který nemá na uhlíku C6 připojený fosfát, aktivuje ribozym slaběji, neboť nedojde ke stabilizačním interakcím mezi fosfátovou skupinou a Mg^{2+} ionty a celý komplex je tedy méně stálý. Koordinační vazbou Mg^{2+} iontů na fosfát se mění také jeho hodnota pK_a , což znesnadňuje protonace této skupiny. Navázání kofaktoru je snažší v případě plně deprotonovaného fosfátu s nábojem 2- oproti částečně protonizovanému fosfátu s nábojem 1- [36]. Se snižující se koncentrací Mg^{2+} iontů se snižuje také aktivita *glmS* ribozymu v přítomnosti GlcN6P. Studie *in silico* dále prokazují pokles pK_a amino skupiny ligandu při vstupu do aktivního místa, což usnadňuje bezprostřední uvolnění protonu. Jestliže GlcN6P není v reakci zahrnutý vůbec, štěpení *glmS* ribozymu je asi 10^6 krát pomalejší než s navázaným kofaktorem. Z výše uvedeného vyplývá důležitost amino skupiny a fosfátu v kofaktoru GlcN6P, přičemž amino skupina ve své protonizované formě $-(NH_3)^+$, která zajišťuje pevnější vazbu GlcN6P, odevzdává proton 5'-kyslíku za vzniku terminální 5'-OH skupiny po samoštěpení a fosfát je nezbytný ke stabilizaci komplexu ribozym-kofaktor. Navíc za použití substrátového analoga Glc-6-P můžeme sledovat pH nezávislou vazbu na ribozym a také byla zjištěna na pH závislá vazba GlcN6P, která je dána právě přítomností amino skupiny a ne fosfátu.

Rozštěpení *glmS* ribozymu má za následek degradaci mRNA kódující GlcN6P syntázu, konkrétně se rozštěpí ta část mRNA, která je stěžejní pro zahájení proteosyntézy. Jedná se tedy o down regulaci, kdy *glmS* ribozym-ribospinač reaguje na koncentraci konečného metabolitu, kterým je glukosamin-6-fosfát. V případě zvýšení koncentrace GlcN6P je dostupných více kofaktorů *glmS* ribozymu, dochází k četnějším degradacím mRNA, a tím se syntéza samotného GlcN6P v důsledku sníží – jedná se tedy o negativní zpětnou vazbu. Ribospinač představovaný *glmS* ribozymem se liší od běžných ribospinačů také tím, že navázání ligandu nezpůsobuje obvyklé rozsáhlé konformační změny, ale v tomto případě zastává GlcN6P funkci katalytického kofaktoru samoštěpící reakce. Funkce ligandu jako allosterického aktivátoru byla vyloučena rentgenostrukturní analýzou krystalů ribozymu před a po samoštěpení a konstruktů mimikujících tranzitní stav [10, 37].

Glukosamin-6-fosfát je prekurzorem pro výstavbu buněčné stěny grampozitivních bakterií, proto se *glmS* ribozym jeví jako potenciální cíl antibiotické léčby. Existují také spekulace, že podobné aptamerové vlastnosti ribozymů mohly sehrát roli ve vývoji RNA světa směrem k modernějšímu světu s proteiny. V případě *glmS* ribozymu byla zjištěna jeho aktivace regioselektivní vazbou L-serinu jako kofaktoru. Pokud by byl pomyslný primordiální ribozym schopen vázat aminokyselinový ligand kovalentně, např. v důsledku evolučního tlaku na vyšší variabilitu, mohlo by se jednat o jakési počátky aminoacylace RNA a první kroky k translaci [38].

3.1.2 *glmS* ribozym – měření

Výše popsanou teorii ohledně ribozymu jsme aplikovali na vytvoření databáze známých konkrétních vyřešených struktur nukleolytických ribozymů z databáze PDB. Zaměřili jsme se na následující parametry dinukleotidu aktivního místa: pseudorotace a amplituda ribózy, epsilon a zeta dihedrály a in-line attack úhel (IAA). Tyto parametry jsme po změření zaznamenali do tabulky s rozlišením zkoumaných struktur a PDB identifikačními čísly (PDB ID), pod kterými je možné dané struktury jednoduše nahrát do PyMOLu. Zapsané jsou také puckery pro obě strany štípaného fosfátu. Poslední sloupec slouží pro poznámky ke konkrétní struktuře (např. způsob inhibice, chemické modifikace, snaha o napodobení některého z kroků samo-štěpení nebo ligandy). Výsledkem je tabulka, která zaznamenává různé uspořádání molekul s rozličným způsobem inhibice, bodový graf pro epsilon a zeta dihedrály, histogramy každého z nich zvlášť a také histogramy pro IAA. IAA, epsilon a zeta dihedrály jsou uvedeny pouze u struktur, ve kterých bylo možné je změřit. Obdobné schéma zaznamenávání dat bylo využito i v případě dalších ribozymů.

U *glmS* ribozymu jsme se zabývali dvaceti dvěma strukturami, přičemž jsme v patnácti případech nemohli měřit IAA, kvůli způsobu inhibice (viz tabulka 2). Jelikož však byly mezi proměřovanými strukturami také krystaly se čtyřmi molekulami, u kterých bylo možné tento úhel měřit ve všech čtyřech aktivních místech, dostali jsme obsáhlou tabulku 2.

PDB ID	Rozlišení [Å]	IAA [°]	Epsilon [°]	Zeta [°]	Pucker z O3' strany	Pucker z O5' strany	Poznámka o inhibici aj.
4MEG	3,1	\	\	\	\	C3'-endo A 1	Rozštěpeno s C5'-(PO ₄) ²⁻ , trojtý mutant, <i>in vitro</i> vyselektovaná GlcN6P nezávislá forma
4MEH	3,12	\	\	\	\	C3'-exo A 1	
2HO6	2,8	\	\	\	\	\	Rozštěpeno s C5'-OH, 2-(N-morpholino)-ethansulfonová (MES)
2HO7	2,9	158,7	124,2	212	C3'-exo A 0	C3'-exo A 1	Glc6P
2HOZ	2,7	\	181,5	134,3	C2'-endo A 0	C3'-exo A 1	Deoxyribóza, Glc6P
2HOX	2,3	\	190,6	155,1	C2'-endo A 0	C2'-endo A 1	Bez GlcN6P, C2'-NH ₂
2HOW	2,4	\	\	\	\	\	Rozštěpeno s C5'-OH, MES
2HOS	2,35	\	177,6	146,1	C3'-exo A -1	C2'-endo A 1	Deoxyribóza, bez GlcN6P
2GCV	2,1	\	\	\	C2'-endo A 0	C2'-endo A 1	Rozštěpeno s volným C5'-OH, MES
2GCS	2,1	\	190,3	157,2	C2'-endo A 0	C2'-endo A 1	C2'-NH ₂ , bez GlcN6P
3B4A	2,7	155,8	192,3	149,9	C2'-endo A -1	C3'-exo A 1	G40A, obsahuje GlcN6P
3B4B	2,7	\	\	\	C4'-exo A -1	C3'-exo A 1	G40A, 2'5' linkage, obsahuje GlcN6P
3B4C	3	\	\	\	C3'-endo A -1	C2'-endo A 1	2'5' linkage, obsahuje GlcN6P
2Z74	2,2	\	179,3	144,8	C2'-endo A -1	C3'-exo A 1	Deoxyribóza, Glc6P
2Z75	1,7	\	181,7	141	C2'-endo A -1	C2'-endo A 1	Deoxyribóza, obsahuje GlcN6P
3G8S	3,1	158,7	188,1	109,7	C2'-endo E 0	C2'-endo E 1	C2'-O-Me, bez GlcN6P
		171,3	188,6	130,4	C2'-endo G 0	C2'-endo G 1	
3G8T	3	145,5	194,1	92,2	C2'-endo H 0	C2'-endo H 1	C2'-O-Me, G40A, obsahuje GlcN6P
		174,8	169	138,4	C2'-endo G 0	C2'-endo G 1	
		174,9	178,3	132,7	C2'-endo F 0	C2'-endo F 1	
		151,4	171,5	101,3	C2'-endo E 0	C3'-exo E 1	
3G95	2,85	\	\	\	\	\	Rozštěpeno s volným C5'-OH, jedno AS obsahuje GlcN6P
		\	\	\	\	\	
		\	\	\	\	\	
		\	\	\	\	\	
3G96	3,01	166,2	148,6	173,8	C1'-exo H 0	C3'-exo H 1	C2'-O-Me, jedno AS obsahuje manosamin-6-fosfát (MaN6P)
		174,4	144	172,3	C2'-endo G 0	C3'-exo G 1	
		154,9	166,7	167,7	C1'-exo E 0	C3'-exo E 1	
		166,6	136,2	177,5	C2'-endo F 0	C3'-exo F 1	

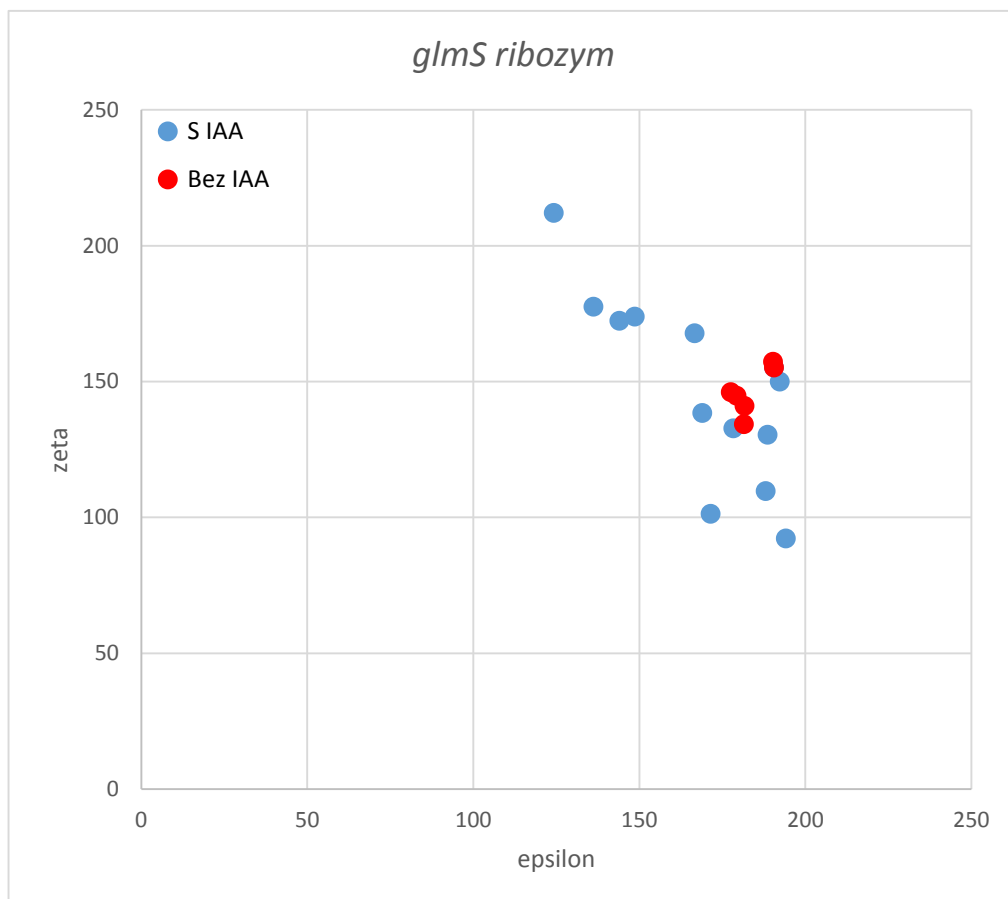
3G9C	2,9	\	\	\	\	\	Rozštěpeno s volným C5'-OH, jedno AS obsahuje GlcN6P
		\	\	\	\	\	
		\	\	\	\	\	
		\	\	\	\	\	
3L3C	2,85	173,1	185,2	131,9	C2'-endo H 0	C2'-endo H 1	C2'-O-Me, Glc6P
		175,2	180,9	134	C2'-endo G 0	C2'-endo G 1	
		171,3	169,5	134,5	C2'-endo F 0	C2'-endo F 1	
		133,4	205,1	73,9	C2'-endo E 0	C2'-endo E 1	
2NZ4	2,5	165,7	190,6	120,9	C2'-endo E 0	C2'-endo E 1	C2'-O-Me, obsahuje GlcN6P
		142,7	177,5	142,7	C2'-endo F 0	C2'-endo F 1	
		168,4	180	141,5	C2'-endo G 0	C2'-endo G 1	
		164,4	185,8	135,9	C2'-endo	C2'-endo H 1	

Tabulka 2 Analýza dinukleotidů aktivních míst zkoumaných glmS ribozymů

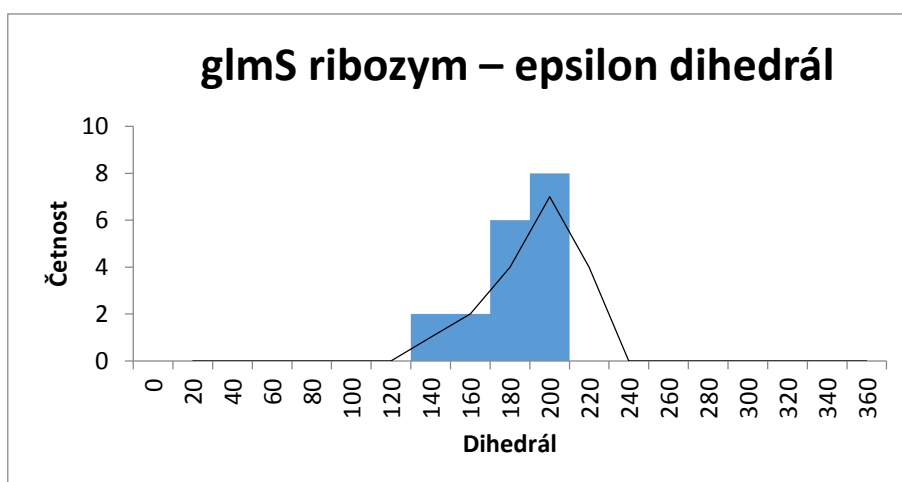
Do bodového grafu 1 jsou zapsána měření epsilon a zeta dihedrálů. Můžeme si povšimnout, že se nám pozorování shlukla do skupiny. Červená pozorování značí, že v dané struktuře nebylo možné změřit IAA.

Pozorování jsou roztažena přes celou osu y, která značí hodnoty pro zeta dihedrál. Můžete si toho povšimnout i v histogramu 1, kde je však hlavní koncentrace pozorování okolo 140°. Pro epsilon dihedrál je převládající oblast okolo hodnoty 190°.

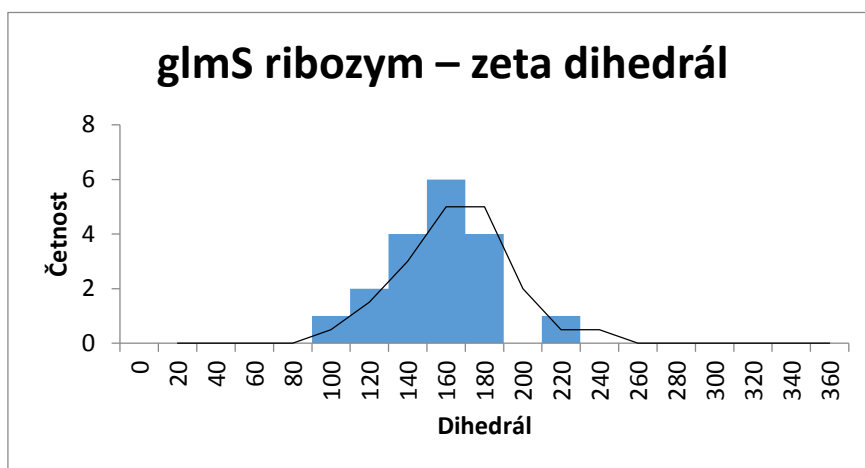
Pro struktury, kde bylo možno změřit IAA, je přiložen histogram 3, jenž ukazuje, že jednotlivé IAA jsou nejvíce nakupeny v okolí 170°–180°.



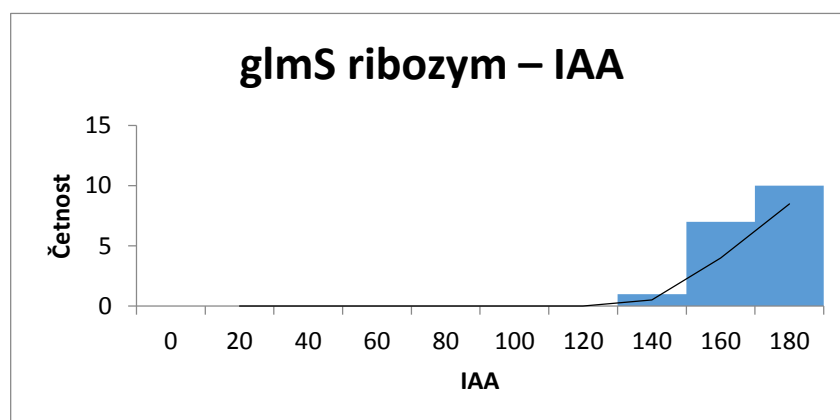
Bodový graf 1 Epsilon a zeta dihedrály v aktivních místech zkoumaných glmS ribozymů



Histogram 1 Epsilon dihedrály v aktivních místech zkoumaných glmS ribozymů



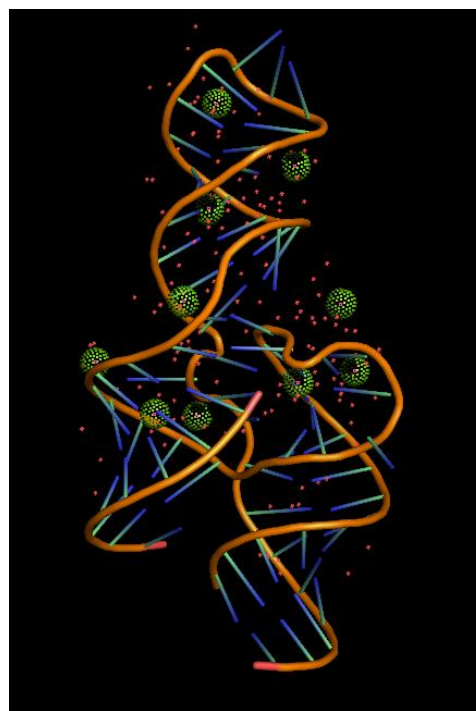
Histogram 2 Zeta dihedrály v aktivních místech zkoumaných glmS ribozymů



Histogram 3 In-line attack úhly z aktivních míst zkoumaných glmS ribozymů

3.1.3 Ribozym viru hepatitidy delta (HDV ribozym)

První struktura tohoto ribozymu byla vyřešena v roce 1998. Jednalo se o HDV ribozym v rozštěpeném stavu, ale tato struktura byla následována publikacemi dalších, již nerozštěpených struktur, různých mutantů nebo jiných variant s rozličnými ionty [13]. HDV ribozym je součástí nekódující RNA lidského patogenu – viru hepatitidy delta (jinak také D), který byl objeven již v roce 1980 v biopsiích jaterní tkáň pacientů chronicky nakažených hepatitidou B. Tehdy byl v jádrech infikovaných hepatocytů nalezen nový antigen a následně označen písmenem delta. Genetická informace infekční částice HDV je tvořena cirkulární jednořetězcovou negativní virovou RNA o necelých 1 700 nukleotidech a 70 % bází je spárovaných. Virus hepatitidy delta je jediný zástupce rodu *Deltavirus*, průměr infekční partikule činí 38 nm.



Obr. 20 HDV ribozym (3NKB), zeleně zvýrazněny hořečnaté kationty, červené tečky představují kyslíky z vod

Známe jeho 7 genotypů lišících se geografickým výskytem a patogenitou, protože je však HDV satelitem viru hepatitidy B, je jejich výskyt obecně vzájemně provázán. Sekvence HDV s autokatalytickou aktivitou – tedy HDV ribozym – je dlouhá asi 85–95 bází v závislosti na polaritě a konkrétním složení nukleotidů [14]. Jedná se o jediný živočišný virus s cirkulární RNA, neboť tento typ virů je normálně rostlinným patogenem, a také o doposud jediný známý ribozym, který pro svou existenci vyžaduje lidský patogen – virus hepatitidy B [11]. HDV je sám o sobě defektním virem, a aby se mohl rozmnožit, je tedy nutná koinfekce s HBV nebo superinfekce HDV na člověka již primárně napadeného HBV. Inkubační doba je mimo jiné závislá právě na druhu infekce. Koinfekce má mírnější průběh a probíhá většinou ve dvou fázích, zatímco superinfekce

je spojená s náhlým zhoršením jaterních funkcí a vede k rychlejšímu nástupu jak akutních, tak i chronických projevů hepatitidy, než při samotné infekci HBV. Infekce HDV může být proto zvláště nebezpečná pro lidi trpící chronickou hepatitidou B.

Genetická informace HDV je replikována takzvaným „rolling circle“ mechanismem pomocí RNA dependentních RNA polymeráz hostitelské buňky. Tomuto způsobu replikace nasvědčují hned dva poznatky a to, že v napadené buňce je možné detekovat multimerní RNA (i) a schopnost těchto RNA samo-štěpit se na jednotlivé monomery právě pomocí HDV ribozymu (ii). Jak již bylo naznačeno, infekce není uskutečnitelná bez HBV povrchového antigenu (HBsAg). Genom HDV je spojený s antigenem hepatitidy D (HDAg), což je jediný protein kódovaný tímto virem, a díky tomuto spojení je HDV RNA stabilnější. Tento komplex tvoří nukleokapsidu HDV [15,24]. HDAg je kódován antigenomovou sekvencí konzervovaným otevřeným čtecím rámcem (ORF). V HDV RNA se vyskytuje více ORF, jejichž úloha však není známá vyjma výše zmíněného.

Jistou podobnost, která se týká struktury RNA a způsobu její replikace, lze najít mezi HDV a rostlinnými patogeny viroidy nebo virusoidy, možná je zde i nějaká fylogenetická příbuznost. Přírozená forma HDV, viroidů i virusoidů je tvořena nedokonalou dvoušroubovicí. Tato sekundární struktura je dána velkým zastoupením kanonických párů bází mezi oběma polovinami cyklické molekuly RNA, které jsou však místy přerušovány krátkými sekvencemi bází nespárovaných. Je to způsobeno tím, že obě poloviny RNA obsahují nedokonalé invertované repetice, což znamená, že některé ribonukleotidy v těchto částech jsou vzájemně zrcadlově uspořádané sekvence. To má za následek, že sekundární struktura není větvená a v elektronovém mikroskopu se jeví jako tyčinka. Oba patogenní agens, tak i HDV využívají při rozmnožování autokatalytického štěpení multimerních produktů replikace na své monomerní části, které se poté stávají novými patogeny [23]. Samotný HDV se rozmnožuje mechanismem „double rolling circle“. Během replikace viru v hostitelské buňce vzniká antigenomová multimerní RNA, ta se rozštěpí působením HDV ribozymu a následně další replikací vzniká opět genomová RNA, která je patogenní.

HDV ribozym vykazuje ze všech v přírodě se vyskytujících ribozymů nejvyšší rychlost samo-štěpící reakce. Ke katalytickému štěpení přispívá jak cytosin C75 jako obecná kyselina, tak hydratované hořečnaté kationty jako obecná báze [12]. K provedení krystalografie nerozštěpeného ribozymu je nutné samo-štěpení inhibovat. V případě HDV ribozymu se často využívá bodové mutace C75U (tranzice). V takto mutovaném HDV chybí protonovaná aminoskupina cytosinu 75, která nese katalytický význam obecné kyseliny, čímž je samo-štěpení znemožněno. Další možností inhibice této reakce je napodobení funkce dvojmocného kovu v aktivním místě jeho nahrazením hexaamin-kobaltitým kationtem $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$, který svým prostorovým uspořádáním efektivně zastoupí hydratovaný Mg^{2+} , avšak štěpení znemožní.

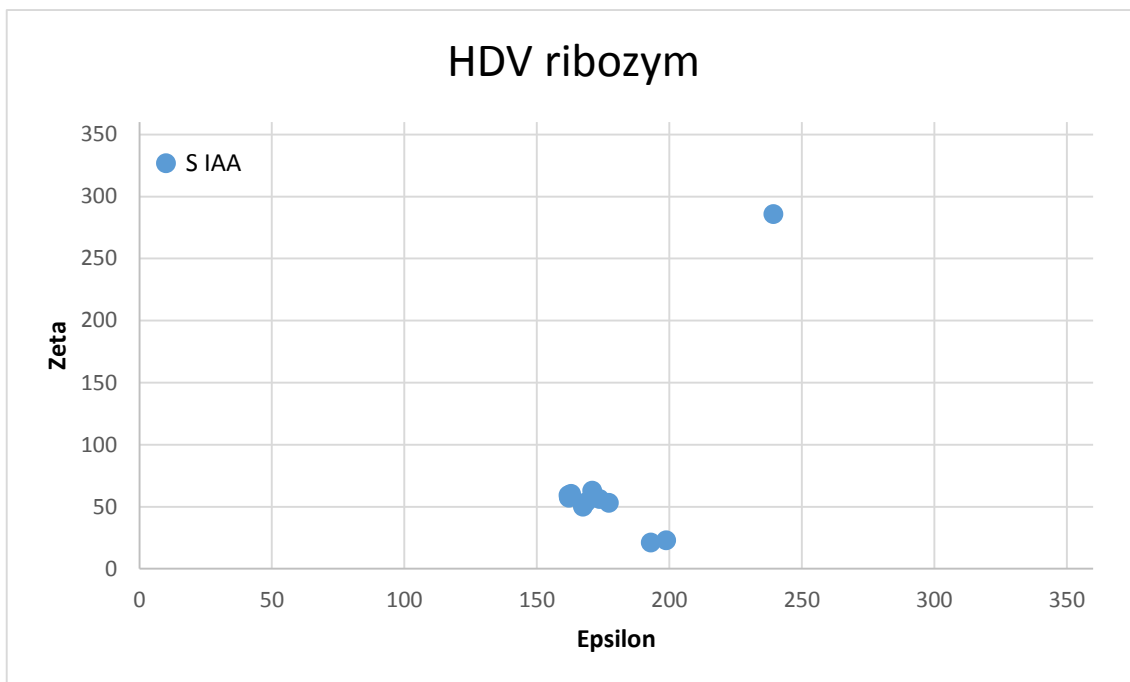
3.1.4 Ribozym viru hepatitidy delta (HDV ribozym) – měření

Poté, co jsme analyzovali šestnáct struktur, jsme u pěti z nich nemohli provést měření, ve většině případů z důvodu předešlého roštěpení RNA řetězce. U nerozštěpených struktur bylo možné vždy měřit hodnoty v aktivním místě.

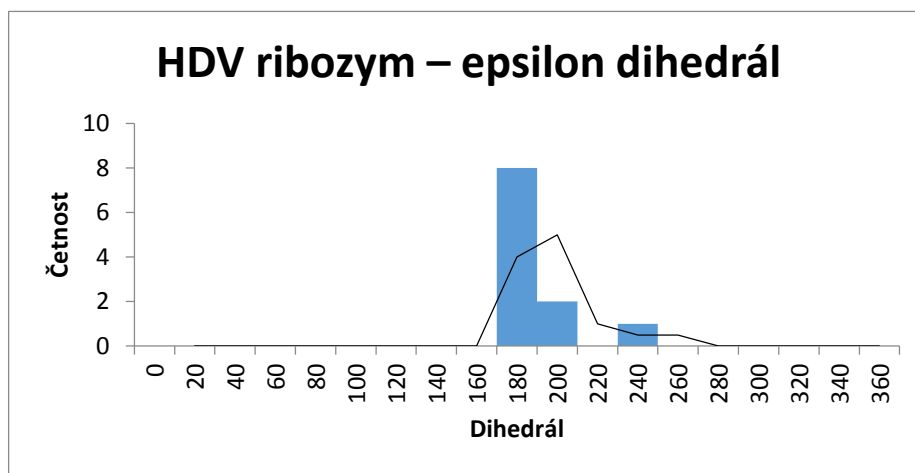
PDB ID	Rozlišení [Å]	IAA [°]	Epsilon [°]	Zeta [°]	Pucker a reziduum z O3	Pucker a reziduum z O5	Poznámka o inhibici aj.
4PRF	2,39	82,6	239,3	285,8	C3'-endo B 100	C3'-endo B 101	
4PR6	2,3	\	\	\	\	C3'-endo B 101	Rozštěpeno
2OIH	2,4	123,2	177,2	53,2	C3'-endo B 100	C3'-endo B 101	
2OJ3	2,9	120,5	173,7	56,3	C3'-endo B 100	C3'-endo B 101	
1DRZ	2,3	\	\	\	\	C3'-endo B 101	Rozštěpeno
3NKB	1,92	\	\	\	\	C3'-endo A 2	Rozštěpeno
1SJ3	2,2	119,4	163	60,4	C3'-endo R 100	C3'-endo R 101	
1SJ4	2,7	114,5	162,1	57,3	C3'-endo R 100	C3'-endo R 101	
1SJF	2,75	101,6	198,9	22,9	C3'-endo B 100	C3'-endo B 101	
1VBX	2,7	115,7	162	59,4	C3'-endo B 100	C3'-endo B 101	
1VBY	2,9	111,6	167,5	50,1	C3'-endo B 100	C3'-endo B 101	
1VBZ	2,8	101,2	193	21,2	C3'-endo B 100	C3'-endo B 101	
1VC0	2,5	124,5	170,9	62,8	C3'-endo B 100	C3'-endo B 101	
1VC5	3,4	\	\	\	\	C3'-endo B 101	Rozštěpeno
1VC6	2,8	\	\	\	\	C3'-endo B 101	Rozštěpeno
1VC7	2,45	103,3	168,6	53,6	C3'-endo B 100	C3'-endo B 101	

Tabulka 3 Analýza dinukleotidů aktivních míst zkoumaných HDV ribozymů

V bodovém grafu 2 lze vidět jeden shluk kombinací epsilon a zeta dihedrálů. Odlehlé hodnoty jsou způsobeny odlišným prolomením v úhlu P–O5'–C5'. U struktury 4PRF jsme zaznamenali velice atypickou konformaci aktivního místa.

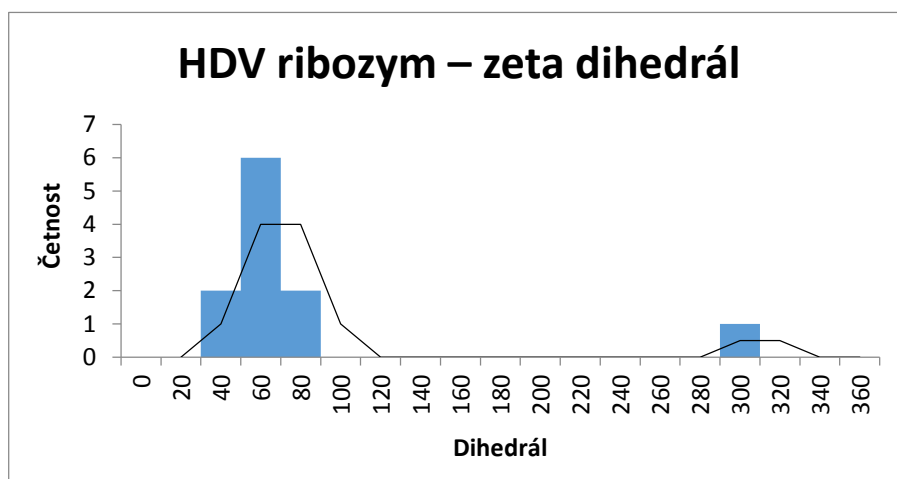


Bodový graf 2 Epsilon a zeta dihedrály v aktivních místech zkoumaných HDV ribozymů

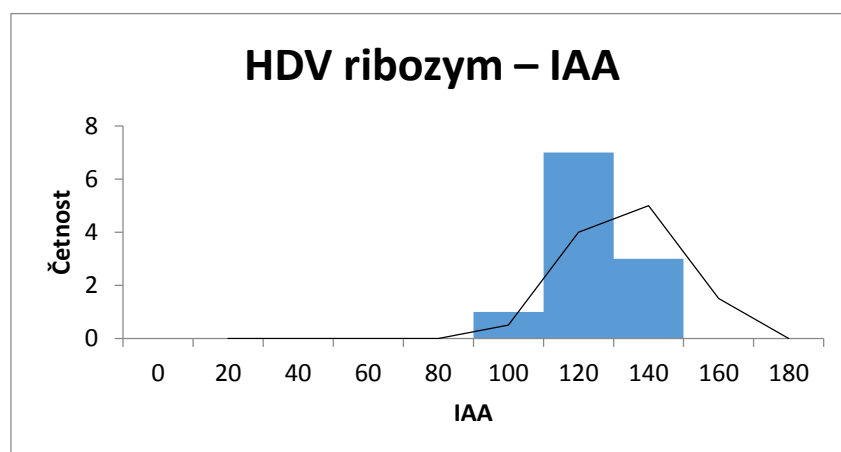


Histogram 4 Epsilon dihedrály v aktivních místech zkoumaných HDV ribozymů

IAA (histogram 6) se zde pohybuje hlavně kolem 120°, přičemž jedno pozorování u struktury 4PRF se dostalo až pod hodnotu 90°. Epsilon dihedrál (histogram 4) se nejvíce vyskytuje v okolí 170° a zeta (histogram 5) okolo 60°, přičemž, jak bylo napsáno výše, struktura 4PRF má obě hodnoty mimo.



Histogram 5 Zeta dihedrály v aktivních místech zkoumaných HDV ribozymů



Histogram 6 In-line attack úhly z aktivních míst zkoumaných HDV ribozymů

3.1.5 Hammerhead ribozym

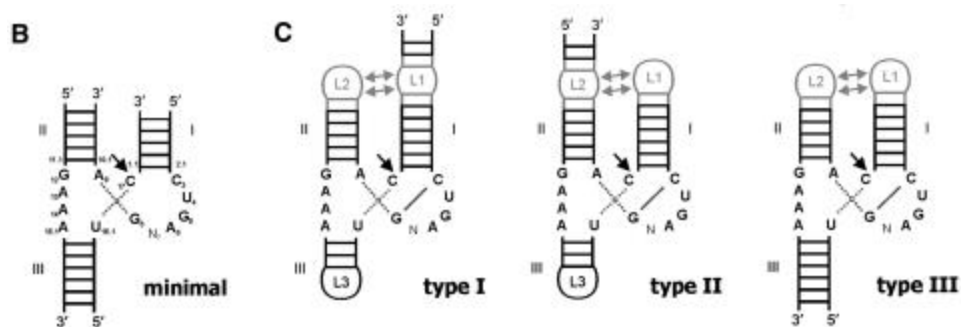
RNA motiv hammerhead ribozymu (HHR) je nejmenší sekvencí nukleolytických ribozymů vůbec. Hned po intronech první skupiny a RNáze P následoval objev tohoto RNA enzymu, který učinil George Bruening v roce 1986, první krystalografická struktura byla získána v roce 1994. Tento první HHR byl identifikován v sekvenci pozitivního řetězce satelitní RNA Tobacco ringspot viru. Minimální strukturu tvoří tři kmeny, které jsou v místě svého spoje vysoce konzervované, právě zde se nachází aktivní místo, a dva z nich se účastní terciální interakce nezbytné pro katalýzu. Přesto, že byl původně objeven pouze u rostlinných virů, je dnes známo, že se vyskytuje také v genomech fylogeneticky vzdálených organismů. Pro svou jednoduchost je považován za příklad konvergentní evoluce na molekulární úrovni poskytující možnost uskutečnit samo-štěpení malých sekvencí RNA. Dokonce některé z lidských mRNA vykazují katalytickou aktivitu po vzoru hammerhead ribozymu. Hammerhead ribozym byl prvním ribozymem vykrytalizovaným v biologicky aktivní formě [25, 32].



Obr. 21 Vlášenkový ribozym (1MME)

Štěpení HHR nevyžaduje přítomnost kofaktoru, přesto probíhá za fyziologických hodnot koncentrace Mg^{2+} iontů, avšak terciální interakce mezi dvěma kmeny je z hlediska funkce nezbytná. Většina HHR působí jako cis-acting enzymy, ale byly nalezeny i přírodní trans-acting formy. Dokonce byl v oocytech zástupců rodu *Triturus* (někteří čolci) objeven trans-acting HHR jako součást riboproteinového komplexu se schopností štěpit molekuly RNA, což dokazuje funkci ribozymů působit v buňkách ve spojení s proteiny jako plnohodnotné enzymy přímo zasahující do regulace RNA[35]. Mimo to byl u čolka zelenavého (*Notophthalmus viridescens*) také nalazen první genomový HHR, a to HHR prvního typu přítomný v tandemových sekvencích transkriptu satelitní DNA

(1987) [36]. Obdobné struktury byly později objeveny v transkriptech DNA satelitu 2 (sat2) i u jiných obojživelníků. Podobnost s HHR čolků vykazuje stejný ribozym přítomný v karafiátech ve struktuře cirkulární RNA o délce 275 nt zvané carnation small viroid-like RNA (CarSV RNA) a dále v retroviroidních elementech tandemových opakování DNA. Také krevničky (*Schistosoma*) a koníčky *Dolichopoda* představují zástupce s genomovým HHR, opět ve formě transkriptu DNA satelitu. Štěpení RNA pomocí HHR je dále využíváno například rostlinnými viroidy a RNA setelity rostlinných virů, kde zajišťuje vznik infekčních jednotek z multimerní sekvence vznikající replikací valivé kružnice (angl. rolling circle replication), Co se týče savců včetně člověka, můžeme tento motiv najít v nepřekládaných oblastech RNA (UTR). Například u hlodavců se ribozym nachází v 3'UTR genu Clec2 (C-type lectin domain family 2). Byla zaznamenána savčí genomová forma HHR s potenciálem trans-štěpení [33].

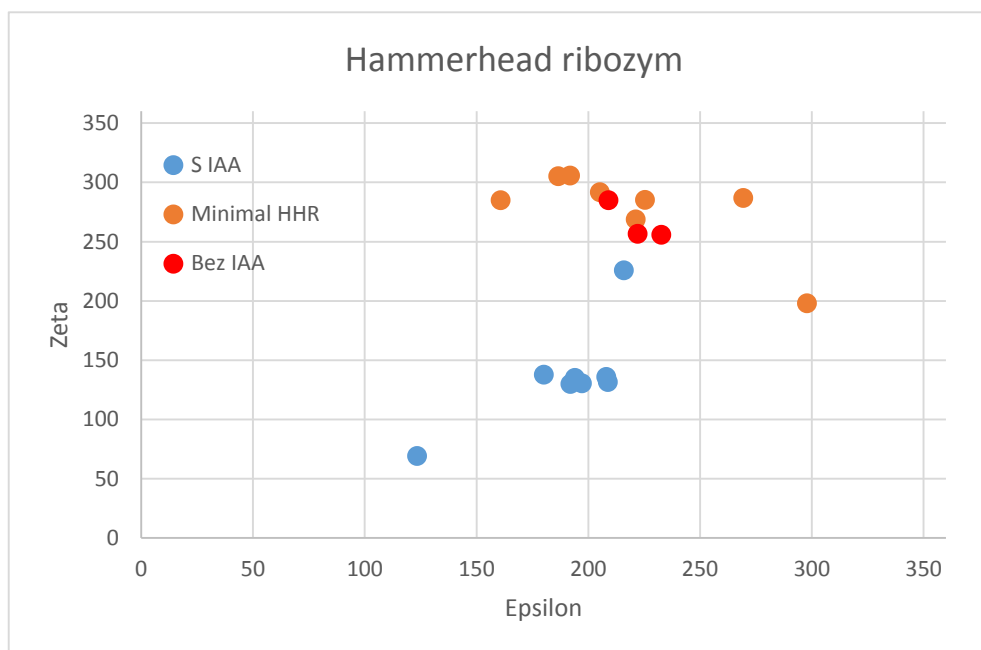


Obr. 22: Motiv hammerhead ribozymu (HHR), šipka označuje aktivní místo, B: Minimální struktura HHR, A: Jednotlivé typy HHR (I–III) s vyznačenou terciální interakcí smyčka-smyčka mezi smyčkami L1 z kmene I a L2 z kmene II [33]

Existuje již několik možností, jak by bylo možné využít katalýzu RNA zprostředkovanou HHR. Odzkoušeným příkladem je kontrola RNA replikace rostlinných patogenů [34]. Potenciál HHR lze aplikovat také v léčbě nemocí jako je např. Alzheimerova choroba [37].

3.1.6 Hammerhead ribozym – měření

Zde jsme poměřovali osmnáct struktur, z toho jeden krystal obsahoval tři molekuly a další dvě. Ve dvou případech jsme nemohli provést měření, jelikož struktura již byla rozštěpená. U krystalu se třemi ribozymy byla odstraněna OH skupina účastnící se IAA (v grafu zaznaménány jako červené body).

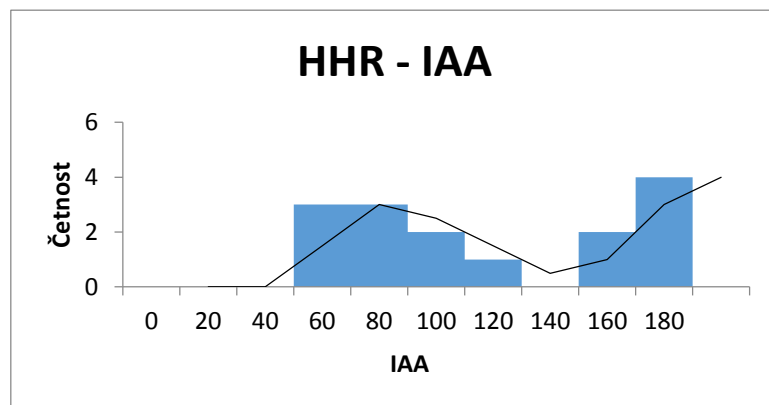


Bodový graf 3 Epsilon a zeta dihedrály v aktivních místech zkoumaných hammerhead ribozymů

V grafu jsou zaznamenány body ve třech různých barvách. Modré pro pozorování, kdy jsme měřili IAA. Tři červené body jsou pro ID 1HMH, kde byly tři struktury pod jedním ID, ale ani u jedné jsme kvůli chybějící C2'-OH skupině nemohli měřit IAA. V tomto bodovém grafu jako v jediném uvádíme i třetí druh bodů, a to pro minimal HHR, které jsou popsány výše. Velký výskyt těchto struktur nám vytvořil druhý peak v histogramu pro zeta dihedrál.

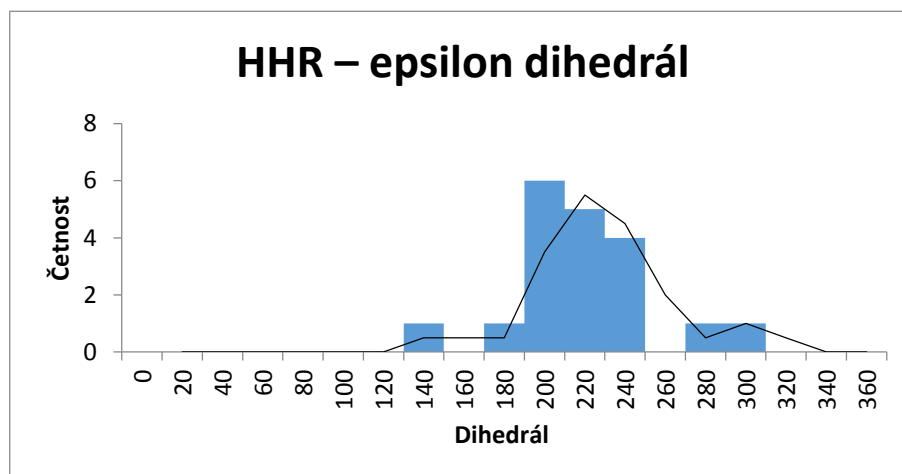
PDB ID	Rozlišení [Å]	IAA [°]	Epsilon [°]	Zeta [°]	Pucker z O3' strany	Pucker z O5' strany	Poznámka o inhibici aj.
1RMN	Fluorescence	84,4	216	225,8	C3'-endo A 44	C3'-endo A 45	Deoxyribóza
1HMH	2,6	\	209,1	284,8	C3'-endo B 11	C4'-exo B 170	Deoxyribóza
		\	222,2	256,4	C4'-exo D 11	C4'-exo D 170	
		\	232,8	255,8	C3'-endo F 11	C3'-endo F 170	
1MME	3,1	76,8	225,5	285,1	C3'-endo B 11	C2'-exo B 170	
		68	205,3	291,5	C3'-endo D 11	C3'-endo D 170	
299D	3	56,9	186,7	305,1	C3'-endo B 11	C3'-endo B 170	
300D	3	60	191,9	305,7	C3'-endo B 11	C3'-endo B 170	
301D	3	74,9	221,3	268,5	C3'-endo B 11	C2'-exo B 170	
359D	2,9	104,9	160,9	284,9	C3'-endo B 11	C3'-endo B 170	Rozštěpeno
379D	3,1	\	\	\	\	C3'-endo B 170	
488D	3,1	99,4	269,5	286,7	C3'-endo D 11	C2'-exo D 170	
1NYI	2,85	59,5	298	197,9	C2'-exo B 120	C3'-endo B 121	Modifikace fosfátu
1Q29	3	81,6	123,5	69	C4'-exo B 120	C2'-exo B 121	
2QUS	2,4	172,2	180,2	137,8	C2'-endo B 12	C3'-endo B 13	Modifikace fosfátu
2QUW	2,2	\	\	\	\	\	C2'-O-Me
3ZD4	2,2	168,2	192,1	129,9	40.89 C2'-endo B 6	C3'-endo B 7	C2'-O-Me
3ZD5	2,2	165,4	194,1	134,9	38.71 C2'-endo B 6	C3'-endo B 7	C2'-O-Me
3ZP8	1,55	156,6	208,9	131,6	36.36 C2'-endo B 6	C3'-endo B 7	C2'-O-Me
2G0Z	2,2	162	197,2	130,4	40.32 C2'-endo B 6	C3'-endo B 7	C2'-O-Me
2OEU	2	152	208,2	135,7	C2'-endo B 6	C3'-endo B 7	C2'-O-Me

Tabulka 4 Analýza dinukleotidů aktivních míst zkoumaných hammerhead ribozymů

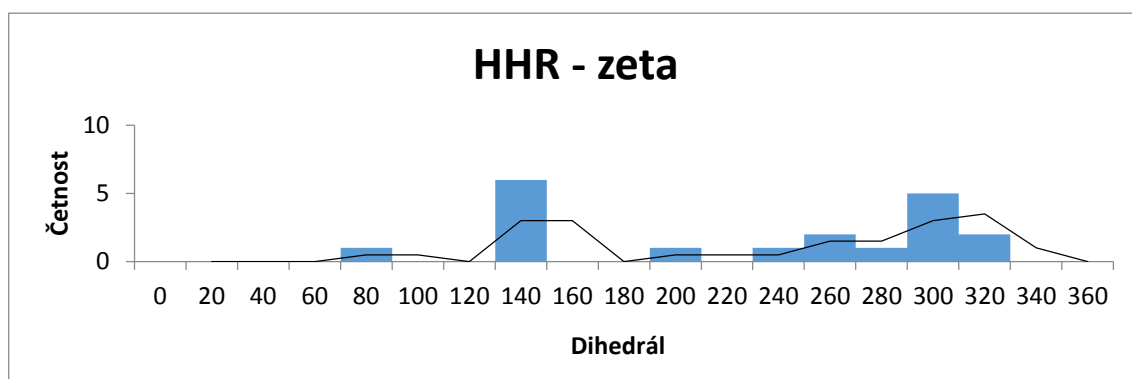


Histogram 7 *In-line attack úhly v aktivních místech zkoumaných hammerhead ribozymů*

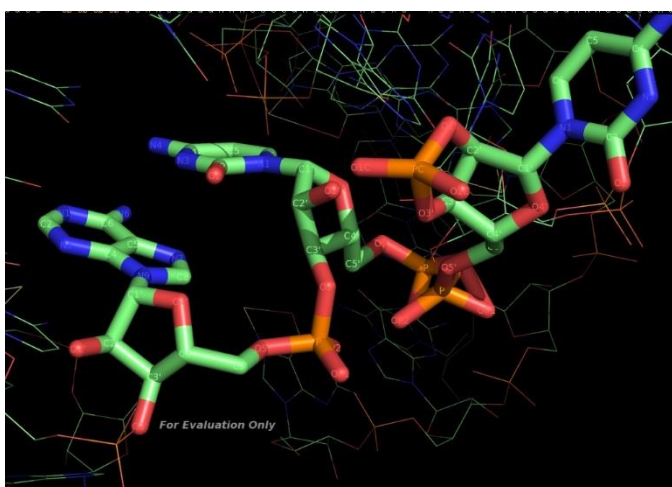
Pokud pomocí histogramů prozkoumáme epsilon dihedrál (histogram 8), zjistíme, že se nejčastěji vyskytuje kolem 200° až 220°. Zeta dihedrál (histogram 9) se potom nachází nejvíce kolem hodnot 140° a 300°. Jak bylo řečeno výše, druhý peak okolo hodnoty 300° je právě způsoben minimal HHR, tudíž za více relevantní shluk považujeme hodnoty v blízkosti 140°.



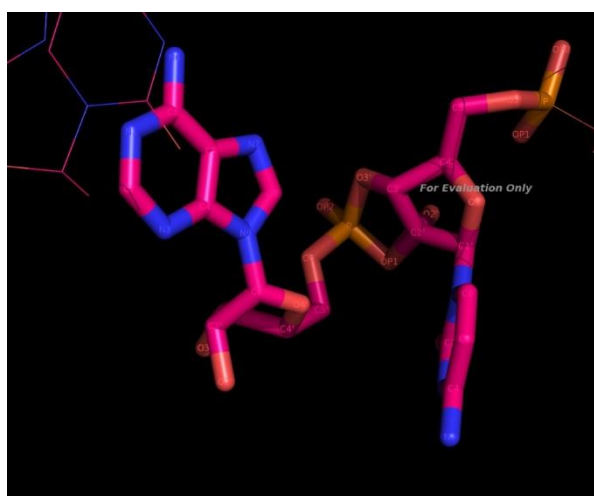
Histogram 8 *Epsilon dihedrály v aktivních místech zkoumaných hammerhead ribozymů*



Histogram 9 Zeta dihedrály v aktivních místech zkoumaných hammerhead ribozymů



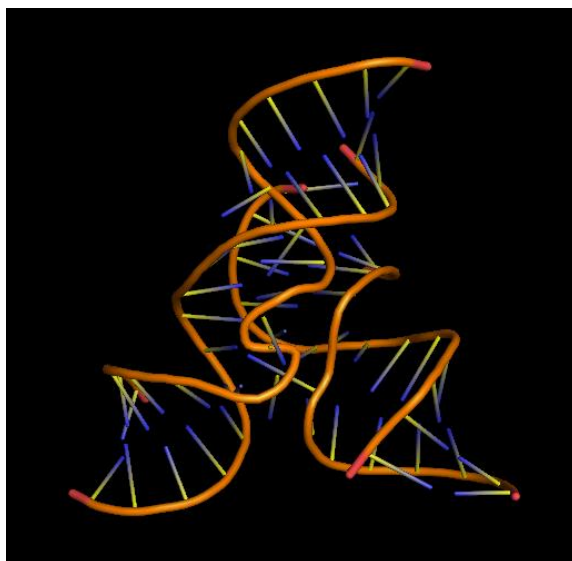
Obr. 23 Zobrazení „dvojitého“ aktivního místa: cytosin s volnou 2'-hydroxy skupinou a 2'-3'-cyklickým fosfátem, modifikací aktivního místa naznačeny konformační změny spojené se štěpením RNA řetězce



Obr. 24 2'-3'-cyklický fosfát v aktivním místě struktury 1Q29, modifikace nadbytečným kyslíkem je v zákrytu ribózy

3.1.7 Vlášenkový ribozym (hairpin ribozyme)

Vlášenkový ribozym můžeme nalézt v satelitech rostlinných virů. Jeho katalytická aktivita nevyžaduje kovové ionty a zahrnuje jak štěpení, tak i reverzní reakci, ligaci řetězců. Oba děje jsou důležité pro replikační mechanismus valivé kružnice RNA, ve kterých se motiv vlášenkového ribozymu vyskytuje. Na tomto místě katalyzuje ribozym štěpení multimerních produktů replikace na kratší až monomerní úseky, jejichž



Obr. 25 Vlášenkový ribozym (1X9K)

konce jsou poté zligovány, čímž se vytvoří kružnicový útvar schopný stabilizace v kompaktní strukturu s funkcí koinfekční částice. Oproti HHR probíhá v případě vlášenkového ribozymu ochotněji ligace, zatímco HHR vykazuje výrazně vyšší nukleázovou aktivitu.

Sekvence vlášenkového ribozymu byla poprvé objevena v negativním řetězci setelitní RNA Tobacco ringspot viru. Minimální strukturu tohoto RNA enzymu představují čtyři kmeny H1 až H4, interní smyčka A mezi kmeny H1 a H2, která obsahuje aktivní místo s nezbytným G1, a nakonec interní smyčka B mezi kmeny H3 a H4. Substituce nukleotidů v helikálních oblastech jsou při zachování komplementarity z hlediska aktivity vlášenkového ribozymu bez negativních dopadů, avšak G11 je pro štěpení nezbytný. Délka jednotlivých kmenů může mít také dopad štěpení. Například v případě prodloužení kmene H2 ze čtyř na pět párů bází již nedochází ke štěpení, délka kmene H2 a H3 ovlivňuje vzdálenost mezi smyčkami A a B, a tím pádem i jejich nezbytnou terciální interakci, a délka kmenů H1 a H4 je z hlediska katalýzy irelevantní. Přesto existuje určitý interval délky kmene H1 a H4, ve kterém dosahuje ribozym maximální aktivity: u kmene H1 je to od dvou alespoň do dvaceti sedmi párů bází

a u kmene H4 se jedná o dvacet pět párů bází. Většina nukleotidů ve smyčkách nemůže být nahrazena, protože se podílí na terciální loop-loop interakci a také přímo na katalýze, např. formou stabilizace tranzitního stavu. Krystalografické struktury a mutageneze prokázaly, že reziduum G8 působí jako obecná báze a A38 jako obecná kyselina. Právě A38 se nachází ve smyčce B, což je jeden z důvodů, proč štěpení vyžaduje kontakt smyčky A a B – donor protonu musí být v dostatečné blízkosti opouštějícího O5'. Nukleázová aktivita ribozymu započatá správnou konformací G8 a A38 v aktivním místě štípaného dinukleotidu se dosti podobá schématu katalýzy proteinovým enzymem rinonukleázou A, kde se podobné konformace obecné acidobazické katalýzy účastní aminokyseliny histidin na obou stranách aktivního místa [40,41]. Pro vytvoření krystalu nerozštěpeného ribozymu se na tomto místě využívá nejčastěji tranzice G8A a A38G, transverze A38C, případně záměna A38 za purin a jeho deriváty (viz tabulka 5), časté jsou také methoxy-inhibice nukleofilu a tranzice U39C, která také snižuje aktivitu ribozymu.

3.1.8 Vlášenkový ribozym (hairpin ribozyme) – měření

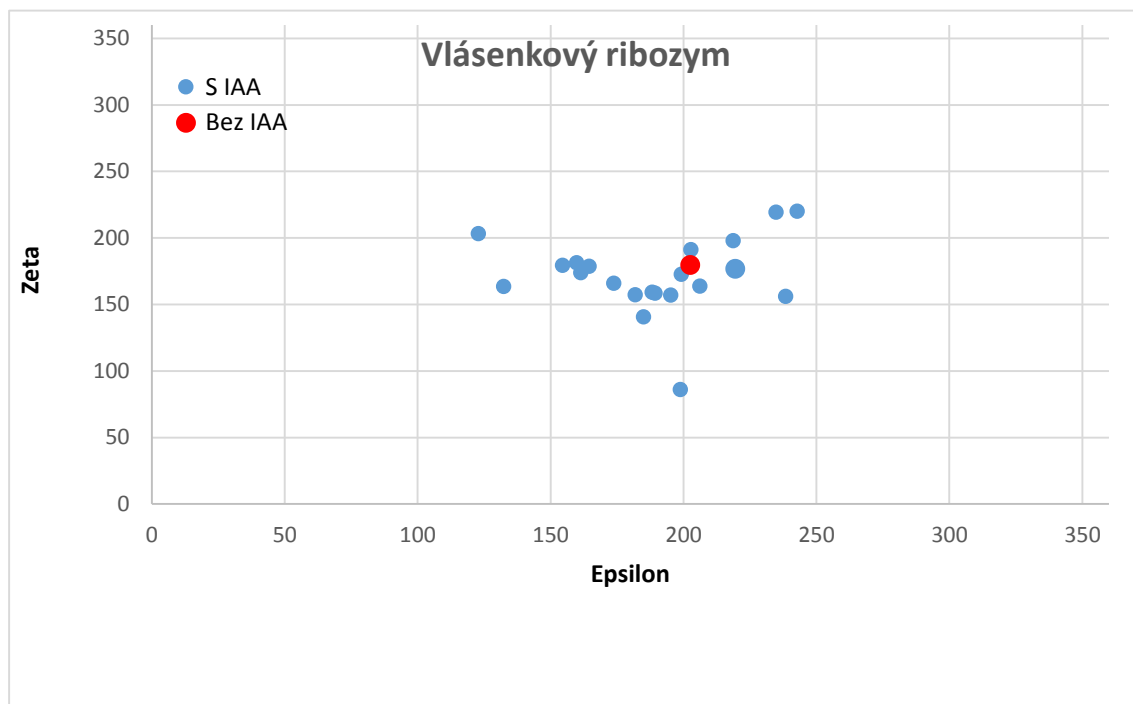
Měření vlášenkového ribozymu (tabulka 6) zahrnovalo největší množství struktur, a to celkem čtyřicet jedna. V některých z nich nebylo možné provést statistiku vybraných údajů aktivního místa z důvodu výrazné inhibice.

PDB ID	Rozlišení [Å]	IAA [°]	Epsilon [°]	Zeta [°]	Pucker z O3' strany	Pucker z O5' strany	Poznámka o inhibici aj.
2D2K	2,65	151,2	188,2	159,1	C2'-endo A 5	C3'-exo A 6	C2'-O-Me
1X9C	2,19	159,9	161,3	173,9	C2'-endo A 5	C3'-exo A 6	C2'-O-Me, U39C
1X9K	3,17	146,9	173,8	165,9	O4'-endo A 6	C2'-endo A 5	U39C
2D2L	2,5	159,9	181,8	157,2	C2'-endo A 5	C3'-exo A 6	C2'-O-Me, U39(P1P) – propyl linker
2P7D	2,25	\	\	\	\	C2'-endo A 5	U39C, rozštěpeno bez 2',3'-cyklického fosfátu
2P7E	2,05	\	\	\	\	C2'-endo A 5	U39C, 2',3'-vanadát
2P7F	2,35	\	\	\	\	C2'-endo A 6	U39C, 2'5' linkage
2OUE	2,05	155,1	164,5	178,6	C2'-endo A -1	C3'-exo A 1	U39C, C2'-O-Me
2FGP	2,4	108,7	195,2	156,9	C3'-exo A 5	C2'-endo A 6	U39C, G8DAP (2,6-diaminopurin)
2BCZ	2,4	\	202,6	179,5	C2'-endo A 5	C3'-exo A 6	Deoxyribóza, G8I (inosin), U39C
2BCY	2,7	112,4	206,1	163,8	C3'-exo A 5	C2'-endo A 6	U39C, G8AP (2-aminopurin)
1ZFV	2,4	92,9	234,8	219,2	O4'-exo A 5	C2'-endo A 6	U39C, G8A
1ZFT	2,33	116,3	202,8	191,1	C2'-endo A 5	C3'-exo A 6	C2'-O-Me, G8I, U39C
1ZFR	2,05	157,2	159,8	181,2	C2'-endo A 5	C3'-exo A 6	C2'-O-Me, U39C
1ZFX	2,38	95,6	218,7	197,9	C3'-endo A 5	C4'-exo A 6	G8U, U39C
4G6P	2,64	\	\	\	C2'-endo A -1	C2'-endo A 1	2x štípaný fosfát, C2'-O-Me, A38P – purin
4G6R	2,83	\	\	\	\	C2'-endo A 6	2'5' linkage, G8I, U39C
4G6S	2,84	\	\	\	\	C2'-endo A 6	2'5' linkage, A38P, U39C
3BBM	2,65	135,8	199,2	172,7	C2'-endo A 5	C2'-endo A 6	C2'-O-Me, A38C, U39C
3CR1	2,25	85,9	198,8	85,9	C3'-endo A 5	C2'-endo A 6	C2'-O-Me, A38C, U39C
3BBK	2,75	\	\	\	\	C2'-endo A 6	2'5' linkage, A38C, U39C
3BBI	2,35	\	\	\	C2'-endo A 5	C3'-exo A 6	2x štípaný fosfát, C2'-O-Me, A38AP, U39C
3B91	2,75	\	\	\	\	C2'-endo A 6	2'5' linkage, A38AP, U39C
3B5S	2,25	152,6	189,3	158,4	C2'-endo A 5	C3'-exo A 6	C2'-O-Me, A38DAP, U39C
3B5F	2,7	\	\	\	\	C2'-endo A 6	2'5' linkage, A38DAP, U39C
3B5A	2,35	166,4	185	140,6	C2'-endo A 5	C2'-endo A 6	C2'-O-Me, A38G, U39C
3B58	2,65	\	\	\	\	C2'-endo A 6	2'5' linkage, A38G, U39C
1M5K	2,4	169,4	122,8	203,1	C2'-endo D 12	C3'-exo D 13	C2'-O-Me

3GS1	2,85	94,3	242,8	220	C3'-endo A -1	C3'-exo A 1	U39C
3GS5	2,75	\	\	\	\	C3'-endo A 5	U39C, rozštěpeno bez 2',3'-cyklického fosfátu
3GS8	2,85	\	\	\	\	C2'-endo A 6	2'5' linkage, U39C
3I2Q	2,9	164,2	132,3	163,4	C3'-exo A -1	C3'-exo A 1	C2'-O-Me, A9(1DP) (N1-deaza-adenosin), U39C
3I2R	2,8	\	\	\	\	C3'-exo A 6	2'5' linkage, A9(1DP), U39C
3I2S	2,75	163,1	154,5	179,3	C2'-endo A -1	C3'-exo A 1	C2'-O-Me, A10(1DP), U39C
3I2U	2,8	\	\	\	\	O4'-endo A 6	2'5' linkage, A10(1DP), U39C
1M5O	2,2	\	\	\	O4'-endo D 12	C2'-endo D 13	2',3'-vanadát
		\	\	\	O4'-endo A 12	C2'-endo A 13	
1M5P	2,6	\	\	\	\	C3'-exo D 12	Rozštěpeno bez 2',3'-cyklického fosfátu
		\	\	\	\	C3'-exo A 12	
1M5V	2,4	\	\	\	\	\	Rozštěpeno: 2',3'-cyklický fosfát
		\	\	\	\	\	
2NPY	2,65	124,4	238,4	156,1	C2'-endo A 5	C2'-endo A 6	C2'-NH ₂ , U39C
2NPZ	3,35	\	219,5	176,8	C3'-exo A 5	C3'-exo A 6	Deoxyribóza, U39C
3CQS	2,8	\	\	\	\	C2'-endo A 6	2'5' linkage, U39C

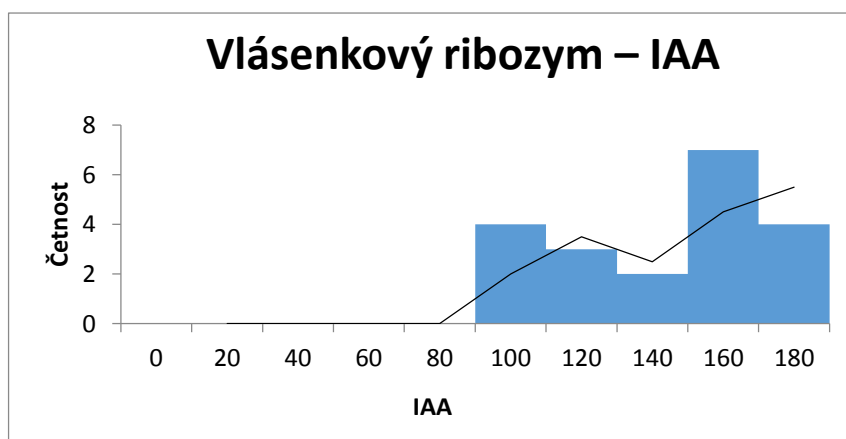
Tabulka 6 Analýza dinukleotidů aktivních míst zkoumaných vlásenkových ribozymů

Bodový graf 4 níže nám opět ukazuje kombinace epsilon a zeta dihedrálů. Vyjma jednoho případu, který je v grafu zaznačen červeně, bylo možné měřit IAA.

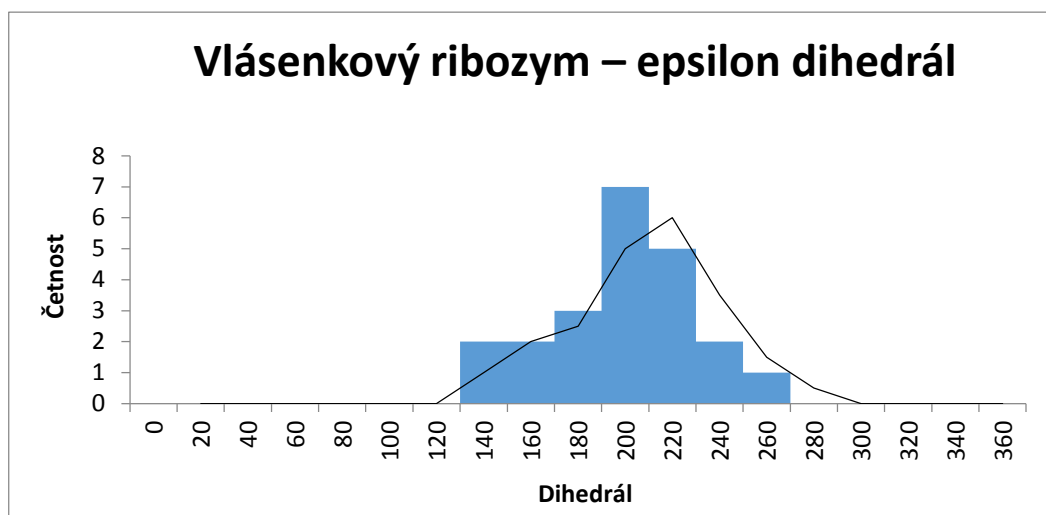


Bodový graf 4 Epsilon a zeta dihedrály v aktivních místech zkoumaných vlásenkových ribozymů

Ve dvaceti jedna případech bylo možno provést měření IAA, pro která zde uvádíme také histogram 10, na němž si lze povšimnout, že dominantě se hodnoty vyskytují okolo 160°. Největší IAA se vyskytl u struktury 2NPZ.

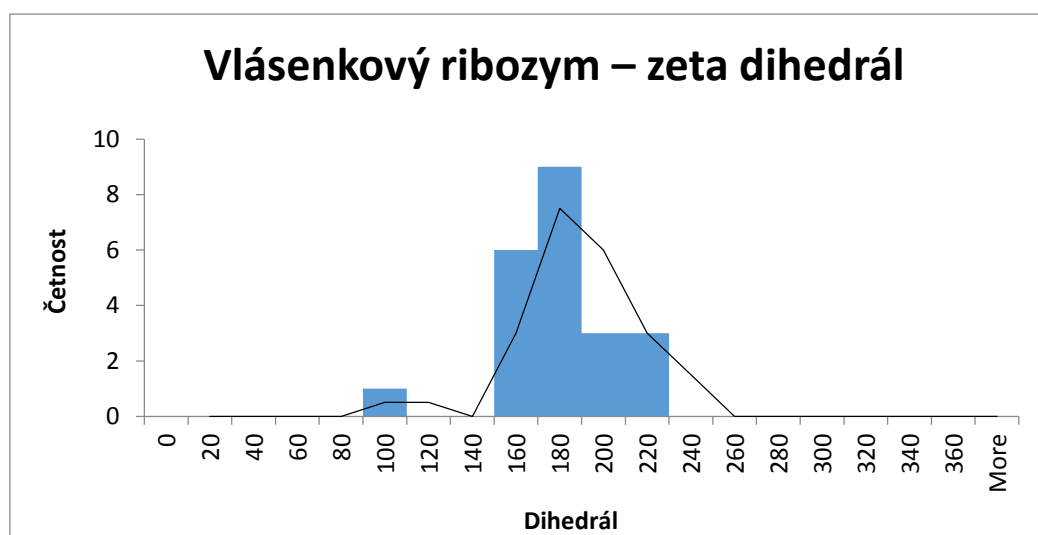


Histogram 10 In-line attack úhly z aktivních míst zkoumaných vlásenkových ribozymů



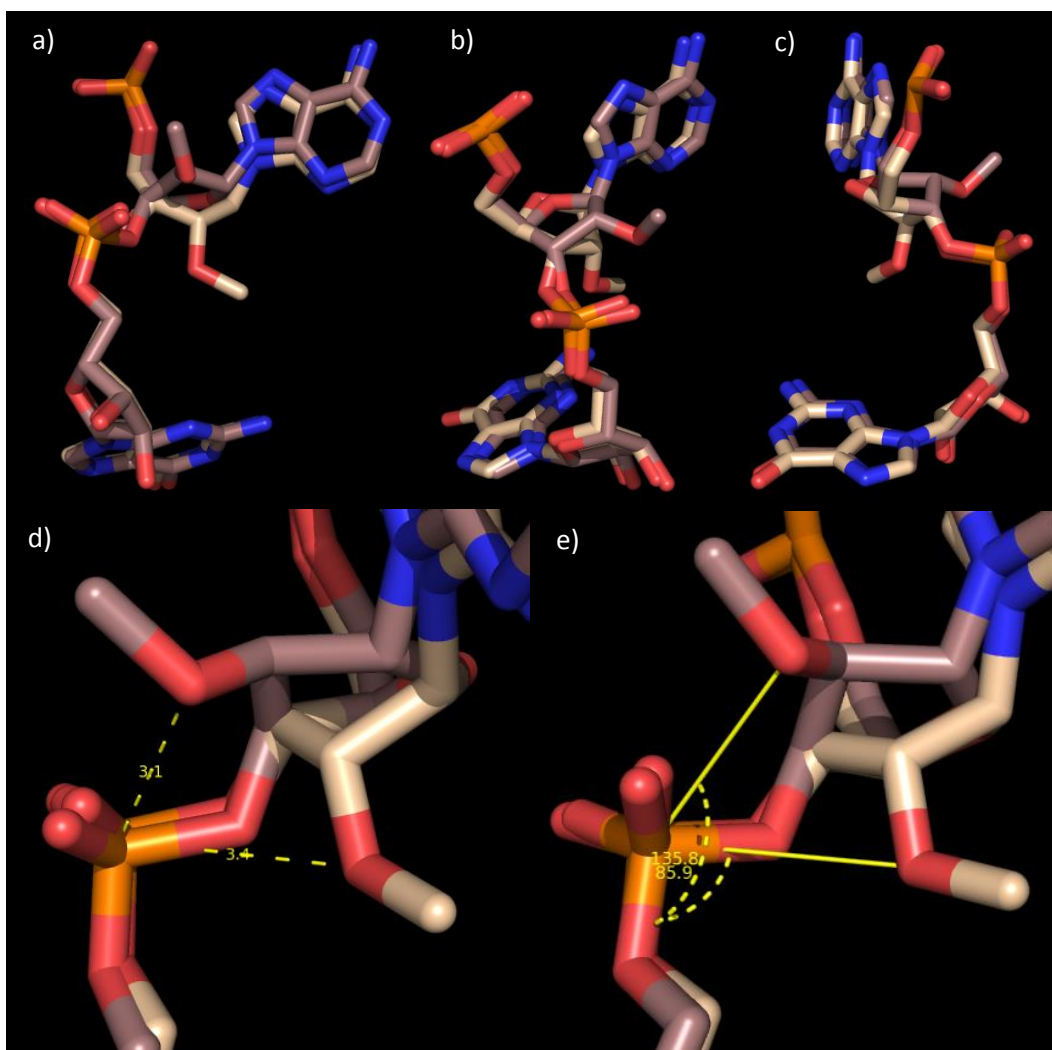
Histogram 11 Epsilon dihedrály v aktivních místech zkoumaných vlásenkových ribozymů

Hodnoty epsilon dihedrálů (histogram 11) se pohybují nejvýrazněji okolo hodnot 185° – 220° , ale vyskytly se i případy, kdy tento dihedrál byl výrazně nižší (až 125°) nebo naopak dosahoval i hodnot vyšších, avšak ne tak markantních (maximální naměřená hodnota $242,8^{\circ}$).



Histogram 12 Zeta dihedrály v aktivních místech zkoumaných vlásenkových ribozymů

Zeta dihedrál (histogram 12) měl potom největší zastoupení pro úhly pohybující se okolo 160° – 180° . Zde se vyskytlo jedno pozorování s úhlem 90° , což značí, že inhibice u této struktury (3CR1) výrazně zdeformovala aktivní místo.



Obr. 26

Vliv pseudorotace furanózového cyklu na vzdálenost nukleofilu a velikost in-line attack úhlu:

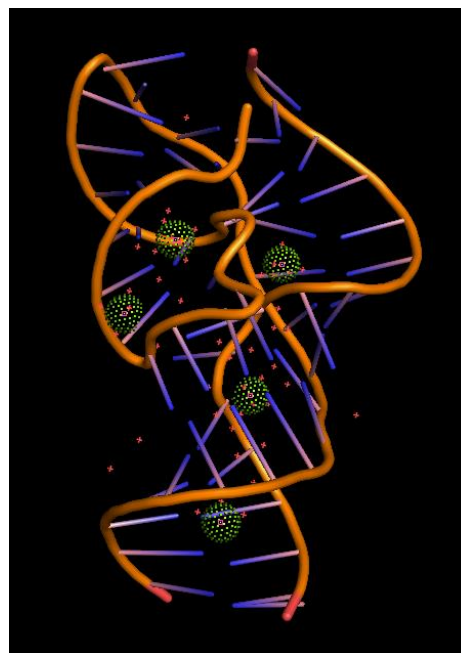
Obrázky **a)**, **b)** a **c)** ukazují vzájemně se překrývající aktivní místa vlásečkových ribozymů z krystalů s PDB ID 3BBM a 3CR1 z různých úhlů pohledu.

3BBM (uhlíky hnědě) s konformací C2'-endo, O2'-P: 3,1 Å (d), IAA 135,8° (e)

3CR1 (uhlíky béžově) s konformací C3'-endo, O2'-P: 3,4 Å (d), IAA 85,9° (e)

3.1.9 Twister ribozym

Označení twister ribozym zahrnuje rozsáhlou skupinu asi 2 700 zástupců malé, avšak komplexní sekvence, která se obecně skládá ze tří kmenů spojených interní smyčkou a zakončených smyčkou terminální. Pro katalytickou aktivitu je stěžejní přítomnost dvou pseudouzlů v terciální struktuře molekuly, které stabilizují její strukturu. V centru těchto dvou pseudouzlů se nachází aktivní místo. Adenin dinukleotidu aktivního místa a katalyticky významný guanin, který tvoří interakci Watson-Crickovou hranou se štípaným fosfátem, jsou silně konzervované. Mezi přirozeně se vyskytujícími nukleolytickými ribozymy dosahuje katalytická aktivita twisteru vysoké rychlosti. Při výzkumu tohoto ribozymu bylo velkou měrou využito práce bioinformatiků, který průzkumem známých sekvencí RNA objevili většinu zástupců skupiny twisteru. Tento ribozym byl objeven vědci z University of Yale v roce 2014, název „twister“ mu byl udělen na základě podobnosti s egyptským hieroglyfem svinutého lana (angl.. twisted flax). Můžeme jej nalézt jak u bakteriálních, tak i eukaryotických organismů.



Obr. 27 Twister ribozym (4OJ1), zvýrazněny hořečnaté kationty

Podrobné schéma katalýzy twister ribozymu nebylo dosud objasněno.

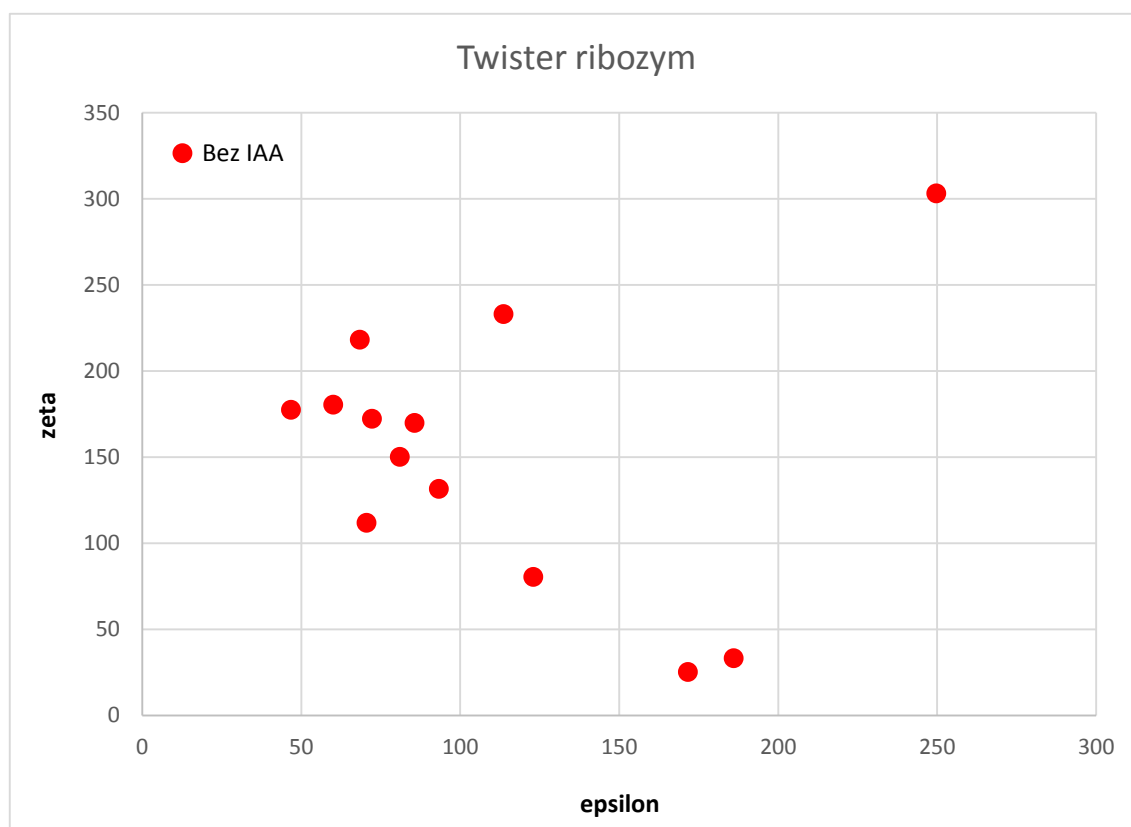
3.1.10 Twister ribozym – měření

Jelikož twister ribozym byl objeven teprve nedávno, mohli jsme analyzovat pouze pět struktur (tabulka 7), kde navíc ani jednou nebylo možné změřit IAA, a to ve všech případech kvůli deoxy-inhibici. Sledovaný soubor struktur se nám však rozšířil, neboť většina krystalů obsahovala více molekul.

PDB ID	Rozlišení [Å]	IAA [°]	Epsilon [°]	Zeta [°]	Pucker z O3' strany	Pucker z O5' strany	Poznámka o inhibici aj.
4RGE	2,89	\	60,2	180,3	C3'-endo A 5	C2'-endo A 6	Deoxyribóza
		\	46,9	177,3	C3'-endo B 5	C2'-endo B 6	Deoxyribóza
		\	93,4	131,4	C2'-exo C 5	C2'-endo C 6	Deoxyribóza
4RGF	3,20	\	72,3	172,2	C3'-endo A 5	C2'-endo A 6	Deoxyribóza
		\	85,7	169,7	C2'-exo B 5	C2'-endo B 6	Deoxyribóza
		\	68,5	218,1	C2'-exo C 5	C2'-endo C 6	Deoxyribóza
4QJD	3,10	\	81,1	150	C3'-exo A 5	C3'-exo A 6	Deoxyribóza
		\	113,7	233	C3'-exo C 5	C3'-exo C 6	Deoxyribóza
		\	123,1	80,4	C3'-exo E 5	C3'-exo E 6	Deoxyribóza
		\	70,6	111,7	C2'-exo G 5	C3'-exo G 6	Deoxyribóza
4QJH	3,88	\	171,7	25,2	O4'-exo A 9	C1'-exo A 10	Deoxyribóza
		\	186,1	33,1	C1'-endo C 9	O4'-endo C 10	Deoxyribóza
		\	249,8	303	C2'-exo E 9	C1'-exo E 10	Deoxyribóza
4OJI	2,30	\	\	\	C2'-endo A 6	C2'-endo A 7	Deoxyribóza

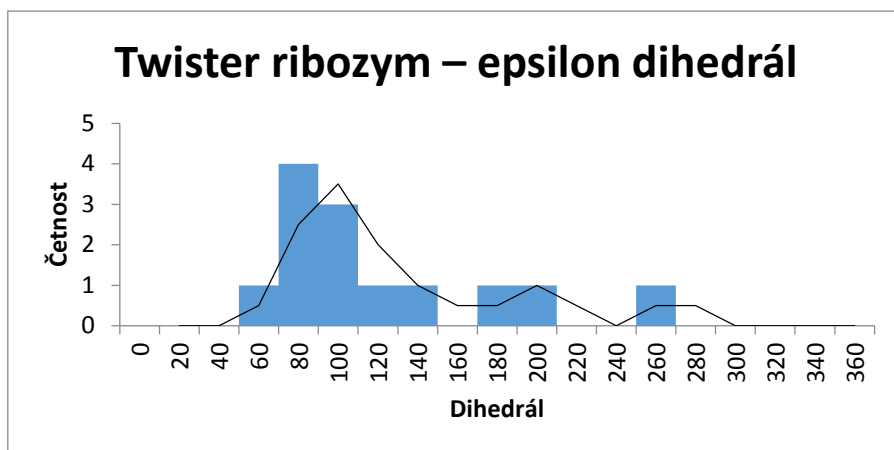
Tabulka 7 Analýza dinukleotidů aktivních míst zkoumaných twister ribozymů

Pozorování (bodový graf 5) nám vytvořila jeden shluk, který má poněkud větší rozptyl. Celkově jsou naměřená data u tohoto ribozymu rozporuplná. Struktury se od sebe často liší. V případě zeta dihedrálu se dokonce na histogramu 12 nevyskytla ani jedna četnost vyšší jak 1. Nemůžeme zde ani hovořit o vyšším výskytu kolem hodnoty 180° vždy v důsledku měření více podobných ribozymů v rámci jednoho krystalu. U epsilon dihedrálu je možné konstatovat obdobné tvzření, jelikož zde nemůžeme najít žádný výraznější datový shluk. Tento ribozym uvádíme tedy spíše pro zajímavost, než pro jeho vypovídající hodnotu.

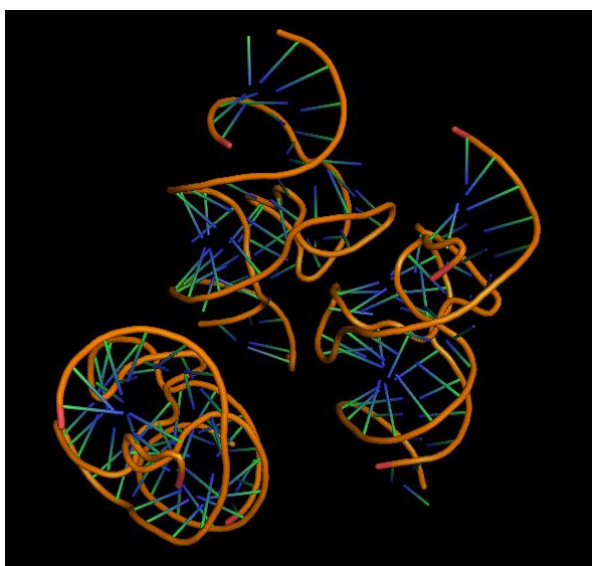


Bodový graf 5

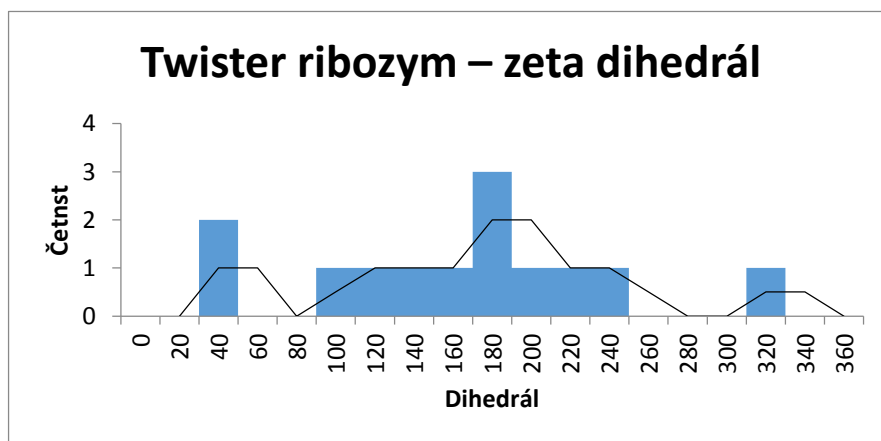
Epsilon a zeta dihedrály v aktivních místech zkoumaných twister ribozymů



Histogram 13 Epsilon dihedrály v aktivních místech zkoumaných twister ribozymů



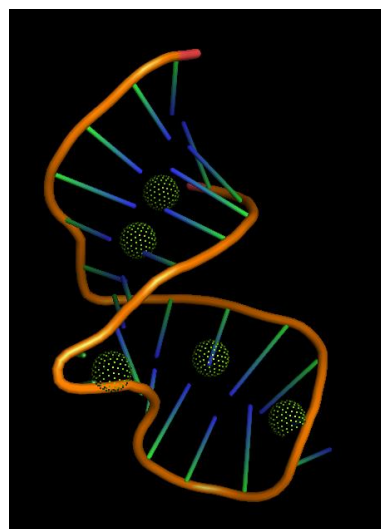
Obr. 28 Tři twister ribozymy v krystalu struktury 4RGE



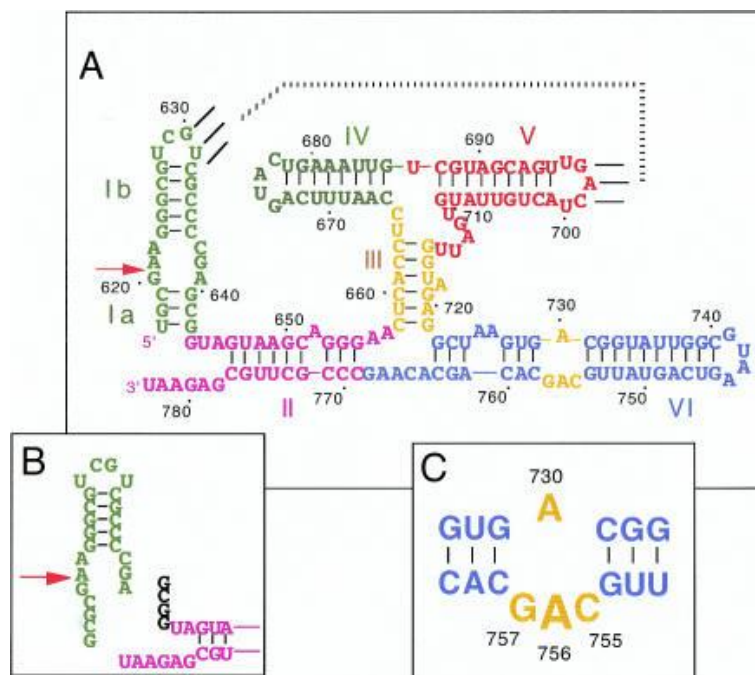
Histogram 14 Zeta dihedrály v aktivních místech zkoumaných twister ribozymů

3.1.11 Varkud satelit ribozym (VS ribozym)

VS ribozym je součástí RNA varkud satelitu (VS) a jedná se o největší známý nukleolytický ribozym nalezený v přírodě, který se však od této skupiny malých ribozymů v mnoha věcech odlišuje a disponuje jedinečnými vlastnostmi. Samotná VS RNA je dlouhá nekódující sekvence, satelitní RNA, která se nachází v mitochondriích některých zástupců kmene houby *Neurospora*, především se jedná o varkud-1C, a mezi jednotlivými zástupci *neurospor* se přenáší pomocí horizontálního genového transferu. VS RNA vzniká přepisem z plazmidové DNA v mitochondriích *neurospor* pomocí mitochondriální RNA polymerázy. Jedná se tedy o jednořetězcovou RNA komplementární k smysluplnému řetězci varkud plazmidu, která obsahuje katalytickou doménu. Primární transkript představuje multimerní sekvenci, která je pomocí VS ribozymu rozštěpena na monomery, které podstoupí ligační reakci, výsledkem čehož je cirkulární RNA složená z 881 nukleotidů, což je převažující forma VS RNA. Aktivita VS ribozymu spočívá tedy jak ve štěpení, tak i následné ligaci RNA řetězce. VS DNA kóduje také plazmidovou reverzní transkriptázu, která přepíše VS RNA do cDNA verze. Její promotor se nachází přímo naproti aktivního místa VS ribozymu.



Obr. 29: VS ribozym (2MIS),
zvýzarněny hořečnaté
kationty



Obr. 30: Schéma sekundární struktury VS ribozymu, **A:** Struktura nativní cis-acting formy enzymu, aktivní místo G•A vyznačeno šipkou, komplementární párování tripletů haipinové smyčky části kmene Ib a kmene V vyznačeno přerušovanou čárou, **B:** Rozpojení kmene I a II, zeleně substrát s šipkou vyznačeným aktivním místem, **C:** Katalyticky důležitá interní smyčka nacházející se v terciální struktuře v blízkosti šipaného fosfátu [31]

Trans-acting VS ribozym se skládá z pěti kmenů, které mezi sebou vytváří dvě spojení tří kmenů, a to spojení 2–3–6 a 3–4–5 (tzn. dvě three-way junction, jedno mezi kmeny II, III a VI – J236 – a druhé mezi kmeny III, IV a V – J345). Aktivní místo se nachází v interní smyšce helixu I mezi guaninem a adeninem. Kmen I obsahující katalytickou doménu je v případě trans-acting VS ribozymu oddělen od samotného enzymu a je pro něj substrátem (viz obr. 21). V cis-acting podobě je kmen I připojen svou částí Ia ke kmenu II třemi nukleotidy. Pro uskutečnění štěpení je zcela nezbytná typická terciální struktura molekuly, čímž se VS ribozym také odlišuje od ostatních nukleolytických ribozymů a svým způsobem připomíná ribozymy RNázu P nebo introny skupiny I. Nezbytná terciální interakce zahrnuje kontakt smyčka-smyčka mezi GUC tripletem vlásenky kmene I a tripletem GAC vlásenky kmene V (viz obr. 20, část A), komplementární párování těchto tripletů způsobí konformační změny substrátu a spustí tak jeho štěpení, proto je změna sekvence těchto koncových smyček spojena se zdatelnou ztrátou aktivity enzymu. Pro správnou funkci VS ribozymu jsou dále nezbytné tyto

strukturní parametry: nativní délka kmenů III a V, spojení tří kmenů J236 a J345 a přítomnost boule v kmenu II a asymetrické vnitřní smyčky v kmenu VI. Právě tato smyčka obsahuje katalyticky významný A730, který se v terciální struktuře dostává do kontaktu se štípaným fosfátem, a předpokládá se proto jeho účast na průběhu štěpení.



O31:br. Trans-acting VS ribozym [31]

3.1.12 Varkud satelit ribozym (VS ribozym) – měření

Většina publikovaných struktur VS ribozymu neobsahovala aktivní místo, nýbrž se jednalo hlavně o vlásenku kmene V. Měření v tomto případě tedy nemělo smysl v důsledku nedostatečného zastoupení krystalů obsahujících aktivní místo.

3.2 Umělé nukleolytické ribozymy

3.2.1 Leadzyme

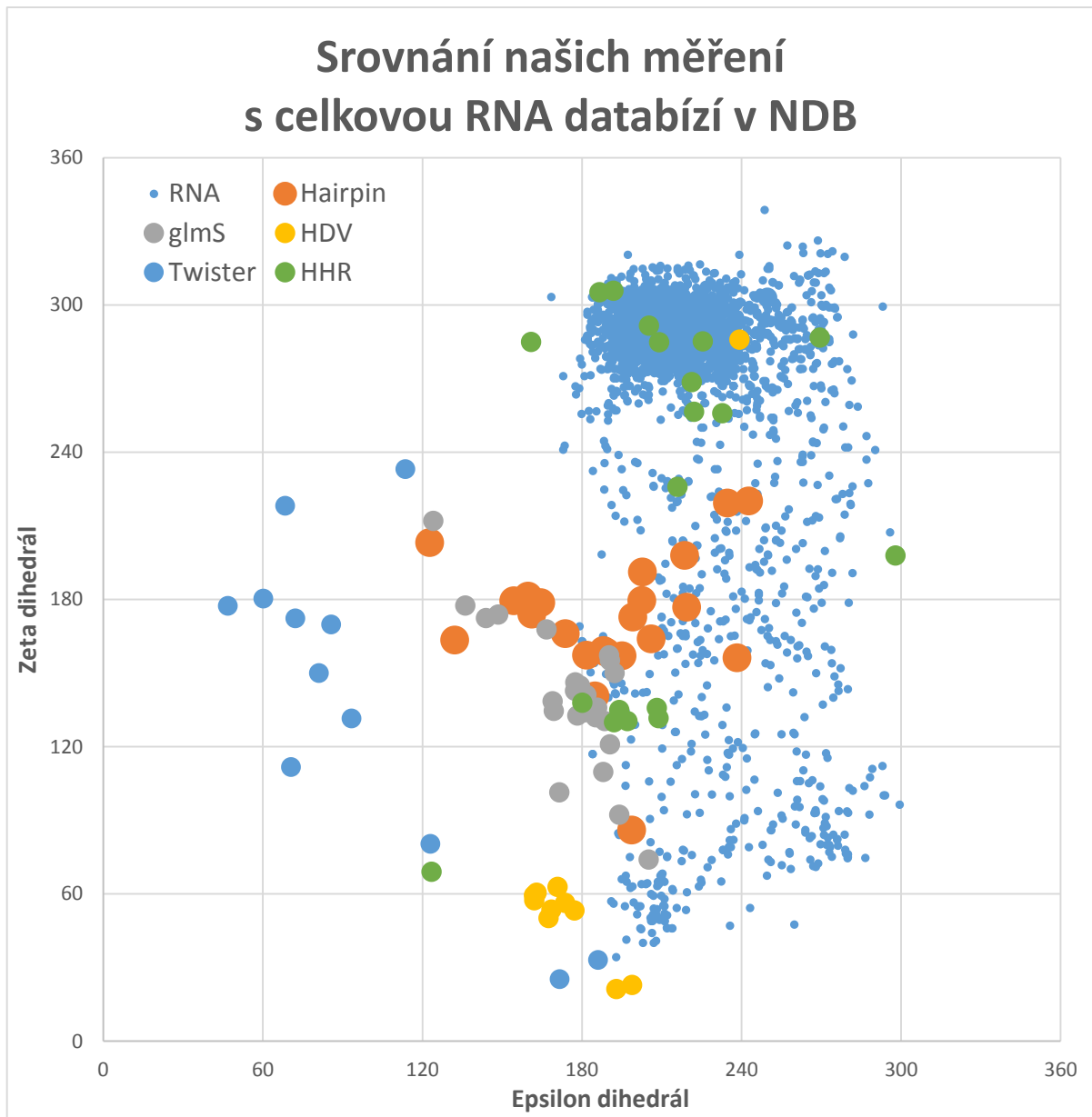
Jak již z názvu tohoto ribozymu vyplývá, bude mít taková struktura co dočinění s olovnatými kationty (ang. lead – olovo). Původní objev byl učiněn pomocí *in vitro* selekční techniky za použití tRNA katalyzující dvoukrokovou reakci štěpení 2',3'-fosfodiesterové vazby v přítomnosti Mg^{2+} a Pb^{2+} iontů. Výběr výchozí RNA nebyl náhodný, nýbrž byl založen na pozorováních krystalových struktur kvasničné tRNA-Phe derivatizované Pb^{2+} ionty, kde bylo zaznamenáno místně specifické štěpení mezi nukleotidy U(17) a G(18) v D-smyčce způsobené vazbou kationtů ve třech místech této oblasti, což dalo impuls pro vývoj ribozymu, který ke katalýze vyžaduje právě tyto ionty [27, 28]. Obdoba syntetického konstruktů vyselektovaného v roce 1992 ve své přírodní formě byla však poté nalezena v některých organismech [29]. Leadzyme tudíž stojí na pomezí umělých a přírodních ribozymů, ale vzhledem k jeho objevu bývá řazen k umělým ribozymům.

Samoštěpení leadzyme je katalyzované Pb^{2+} ionty, bez kterých se nemůže obejít, proto bývá tento ribozym klasifikován jako metaloribozym. Další zvláštností leadzyme je, že po rozštěpení cukr-fosfátové kostry, jak je typické pro nukleolytické ribozymy, nastane hydrolýza 2',3'-fosfodiesterové vazby, což se odráží v charakteru aktivního místa, které musí netypicky projít dvěma tranzitními stavy. Obecně se díky své krátké sekvenci motiv leadzyme vyskytuje ve struktuře poměrně mnoha RNA, a proto je dosti pravděpodobné, že štěpení jejich sekvence v přítomnosti Pb^{2+} iontů je zásadním mechanismem toxicity olova. Jedním takovým případem je savčí ribozomální 5S RNA, její D-smyčka totiž obsahuje sekvenci aktivního místa leadzyme podobnou té, kterou nacházíme u zmíněné kvasničné tRNA-Phe [41].

3.3 Srovnání našich měření s celou RNA databází

Na bodovém grafu přiloženém v této kapitole jsou zaznačeny tisíce bodů. Každý menší modrý bod značí konformaci epsilon a zeta dihedrálů v RNA strukturách publikovaných v NDB. Výrazný shluk, který lze v grafu vidět, je svým způsobem velký informační šum, jelikož toto shluknutí mnoha bodů neznačí, že těchto struktur je v přírodě tolik oproti ostatním, nýbrž že bylo vytvořeno tolik krystalů spadajících do této skupiny. Krystalografové se soustředili na struktury této skupiny RNA, protože na počátcích rentgenostrukturní analýzy bylo nejjednodušších vytvořit krystal stabilních RNA motivů, tudíž PDB obsahuje opravdu nespočeté množství těchto struktur, takže v histogramech máme výrazný velký peak. Z toho vyplývá, že bychom neměli srovnávat velikosti jednotlivých menších peaků s velkým, ale měli bychom je brát jako ukazatele, že v této podobě se místa v RNA vyskytují. Do této již dříve pracovníky Katedry fyzikální chemie Univerzity Palackého pořízené databáze, o které můžeme tvrdit, že je do jisté míry starší, jsme zanesli pro porovnání naše pozorování. Podle legendy lze rozpoznat o jakou skupinu ribozymů, které jsme měřili, se jedná.

Můžeme si povšimnout několika zajímavých věcí. Twister ribozym, jehož struktura se vyřešila až v roce 2014, se odchyluje od jakéhokoliv jiného shluku i od původní strukturní databáze. Hairpin ribozym se drží v prostředí grafu jak pro epsilon, tak i zeta dihedrál, ostatní ribozymy až na HDV se také drží okolo vyšších hodnot zety, zatímco HDV se jako jediný shlukuje u malého zeta dihedrálu. Jak již dříve bylo napsáno, pozorování, která u HHR mají vysoký zeta dihedrál, jsou minimal HHR, ale ostatní struktury se drží ve větším shluku našich pozorování okolo zety rovné 180° .



Bodový graf 6: Porovnání našich měření epsilon a zeta dihedrálů v aktivních místech nukleolytických ribozymů s celkovou databází RNA na NDB

Tento graf nám tedy může sloužit ke dvěma účelům. První srovnává celou RNA databázi s nukleolytickými ribozymy a ukazuje rozdíly mezi jejich druhy. Dalším účelem je celkové porovnání našich měření a vizualizace dat, které mají ukázat, jak se některé rodiny ribozymů podobají konformacím epsilon a zeta dihedrálů, zatímco jiné se právě naopak výrazně odchyľují od podoby aktivního místa jiného ribozymu.

V této práci jsme se věnovali základním otázkám RNA katalýzy nukleolytických ribozymů. Stručně jsme popsali doposud známé ribozymy spadající do této skupiny a zabývali jsme se otázkami jejich strukturních vlastností a funkčního významu. Bylo nutné naučit se pracovat s používaným chemickým a statistickým softwarem, ale také doplnit si znalosti z oblasti molekulární biologie a chemie na vyšší úroveň než byla ta, které dosahovaly předtím. V praktické části jsme pomocí základní statistiky diskutovali konformaci aktivního místa nativních a inhibovaných struktur a také jsme měřili základní úhly chemických vazeb kolem štípaného fosfátu. V konečném důsledku jsme tedy provedli statistickou analýzu struktur publikovaných na RCSB PDB těchto ribozymů: *glmS*, HDV, hammerhead, vlásenkový ribozym a twister. V bodových grafech, kde jsme zanášeli měření epsilon a zeta dihedrálů, jsme pro většinu konformací obdrželi kompaktní datový shluk, což značí, že se dané struktury budou nacházet s velkou pravděpodobností v těchto oblastech. Došli jsme tedy k závěru, že aktivní místo každého ribozymu má svoje do jisté míry stálé charakteristické parametry, které vyžaduje pro svoji katalýzu. Ukázali jsme také, proč se nám vyskytují při měření odlehlé hodnoty, a to přímo na konkrétních příkladech. V práci jsou uvedeny i tabulky, ve kterých jsou zapsány všechny naměřené hodnoty pro výše zmíněné ribozymy, a to včetně puckeru s označením rezidua pro obě strany štípaného fosfátu, což může sloužit pro další výzkumníky na poli problematiky nukleolytických ribozymů.

5 Seznam zdrojů

1. MLÝNSKÝ, Vojtěch. *Structure, Dynamics and Reaction Mechanism of RNA Enzymes*. Olomouc, 2014. Ph.D. Thesis. Univerzita Palackého Olomouc. Fakulta přírodovědecká. Vedoucí práce Michal OTYEPKA.
2. KLYCE, Brig. *The RNA World And Other Origin-of-Life Theories* [online]. [cit. 2014-11-23]. Dostupné z: <http://www.panspermia.org/rnaworld.htm#whatsnew>.
3. Příspěvatelé Wikipedie. *Ribozyme* [online], Wikipedie: Otevřená encyklopedie, ©2014 Poslední změna: 19.12.2014 [citováno 2014-11-23]. Dostupné z: <http://en.wikipedia.org/wiki/Ribozyme>.
4. Příspěvatelé Wikipedie. *TRNA* [online], Wikipedie: Otevřená encyklopedie, ©2014, Poslední změna: 3. 02. 2015, [citováno 23. 02. 2015] Dostupné z: http://en.wikipedia.org/wiki/Transfer_RNA.
5. Příspěvatelé Wikipedie. *Ribonuclease P* [online], Wikipedie: Otevřená encyklopedie, ©2014, Poslední změna: 26. 02. 2014, 21:45 UTC, [citováno 3. 02. 2015] Dostupné z: http://en.wikipedia.org/wiki/Ribonuclease_P.
6. ALTMAN, Sidney, CECH, Thomas. Ribonucleic acid (RNA) – a biomolecule of many function [online], The Royal Swedish Academy of Sciences ©1989, Poslední změna: 12. 10. 1989, [citováno 11.12.2014] Dostupné z: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1989/press.html.
7. Příspěvatelé Wikipedie. *Structural Biochemistry/ RNA World Hypothesis* [online], Wikibooks, The Free Textbook Project ©2012, Poslední změna: 20. 11. 2012, [citováno 18.12.2014] Dostupné z: http://en.wikibooks.org/wiki/Structural_Biochemistry/RNA_World_Hypothesis.
8. XIN, Yin, HAMELBERG, Donald. Deciphering the role of glucosamine-6-phosphate in the riboswitch action of glmS ribzyme. *RNA*. [online] ©2010, **16**(12) [cit. 29.11.2014]. ISSN 2455–2463. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2995406/>.
9. Hepatitida D. *WikiSkripta* [online]. ©2008 [cit. 21.02.2015]. Dostupné z: http://www.wikiskripta.eu/index.php?title=Hepatitida_D&oldid=286135.

10. KAPRAL, J., JAIN, S., NOESKE, J., DOUDNA, A., RICHARDSON, C., RICHARDSON, S. New tools provide a second look at HDV ribozyme structure, dynamics and cleavage. *Nucleic Acids Research* [online] ©2014, **42**(20) [cit. 29.11.2014]. ISSN 12833-46. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25326328>.
11. NAKANO, S., CHADALAVADA, M., Bevilacqua, C. General acid-base catalysis in the mechanism of a hepatitis delta virus ribozyme. *Science*. [online] ©2000, **287**(5457) [cit. 29.11.2014]. ISSN 1493-7. Dostupné z: <http://www.sciencemag.org/content/287/5457/1493>.
12. MACNAUGHTON, Thomas, SHI, Stephanie, MODAHL, Lucy, LAI, Michael. Rolling circle replication of hepatitis delta virus RNA is carried out by two different cellular RNA polymerases. *Journal of Virology*. [online] ©2002, **76**(8) [cit. 29.11.2014]. ISSN 3920-3927. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC22142/>.
13. PANNUCCI, A., HAAS S., HAIL, A., HARRIS, K., BROWN, W. Rnase P RNAs from some Archaea are catalytically active. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. [online] ©1999, **96**(14) [cit. 29.11.2014]. ISSN 7803-8. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC22142/>.
14. COCHRANE C., STROBEL, A. Catalytic strategies of self-cleaving ribozymes. *Accounts of chemical research*. [online] ©2008, **41**(8) [cit. 29.11.2014]. ISSN 1027-35. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18652494>.
15. WEDEKING, E., MCKAY, B. Crystal structure of the leadzyme at 1.8 Å resolution: metal ion binding and the implications for catalytic mechanism and allo site ion regulation. *Biochemistry*. [online] ©2003, **42**(32) [cit. 29.11.2014]. ISSN 9554-63. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12911297>.
16. PEČ, Pavel, PEČOVÁ, Danuše. *Učebnice středoškolské chemie a biochemie*. 1. vyd. Olomouc: Nakladatelství Olomouc, 2001. ISBN 8071820342.
17. MAREČEK, Aleš , HONZA, Jaroslav. *Chemie pro čtyřletá gymnázia: 3. díl*. 1. vyd. Olomouc: Nakladatelství Olomouc, 2005. ISBN 8071820571.
18. REYMOND, Cedric, BEAUDOIN, Jean-Denis, PERRAULT, Jean-Pierre. Modulating RNA structure and catalysis: lessons from small cleaving ribozymes. *Cellular and Molecular Life Sciences* ©2009, **66**(22) [cit. 29.11.2014]. ISSN 3937-3950. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2777235/>.
19. *RNA on the early Earth* [online] Museum of Science: Boston [citováno 12.02.2015], Dostupné z: <http://exploringorigins.org/nucleicacids.html>.

20. *Ribozymes* [online] Biowiki, [citováno 18.02.2015], Dostupné z: <http://biowiki.ucdavis.edu/Biochemistry/Catalysis/Ribozymes>.
21. Příspěvatelé Wikipedie. *Ribonuclease P* [online], Wikipedie: Otevřená encyklopedie, ©2014, Poslední změna: 05. 01. 2015, 18:39 UTC, [citováno 3. 02. 2015] Dostupné z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Dvou%C5%A1roubovice>.
22. *Klonování DNA*, [online], Univerzita Palackého [citováno 3. 11. 2014] Dostupné z: <http://biologie.upol.cz/metody/Klonovani%20DNA.htm>.
23. Příspěvatelé Wikipedie. *Dvoušrobovice* [online], Wikipedie: Otevřená encyklopedie, ©2014 Poslední změna: 5.01.2015 [citováno 2014-11-23]. Dostupné z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Dvou%C5%A1roubovice>.
24. DOOSELL S. David, *Bionanotechnology: Lessons from Nature* [online] 1.edice Wiley-Liss 29.04.2004 [cit. 23.12.2014] 1.edice, ISBN 978-0471417194 Dostupné z: <https://www.fbmi.cvut.cz/files/predmety/105/public/Biomolekul%C3%A1rn%C3%AD%20disign%20a%20biotechnologie.pdf>.
25. SONG, Cao, DAVID, P., Giedroc, SHI-JIE, Chen. Predicting loop–helix tertiary structural contacts in RNA pseudoknots. *RNA*. [online] ©2010, **16**(3) [cit. 29.11.2014]. ISSN 538-552. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20100813>.
26. RUBIN, John R., CANNON, John. Nonenzymic hydrolysis of RNA: lead(II)-catalyzed site specific hydrolysis of transfer RNA. The role of the tertiary folding of the polynucleotide chain. *International Journal of Quantum Chemistry*. [online] ©1984, **11** [cit. 29.11.2014] ISSN 0360-8832. Dostupné z: <http://chemport.cas.org/cgi-bin/sdcgi?APP=ftslink&action=reflink&origin=npg&version=1.0&coi=1:CAS:528:DyaL2MXht1Ontb0%3D&pissn=0028-0836&year=1992&md5=5de30127f3840cf980a363c880dc59fa>.
27. TAO, Pan, OLKE, C. A small metalloribozyme with a two-step mechanism. *Nature*. [online] ©1992, **358** [cit. 3.03.2015]. ISSN 560-563 Dostupné z: <http://www.nature.com/nature/journal/v358/n6387/abs/358560a0.html#close>.
28. MIROSLAWA, Z., BARCISZEWSKAA, Maciej Szymanska, WYSZKOA, Eliza, PASB, Jakub, RYCHLEWSKIB, Leszek, BARCISZEWSKIA, Jan. Lead toxicity through the leadzyme. *Elsevier* [online]. 2005, **589**(2) [cit. 28.11.2014]. ISSN 103-10. Dostupné z: <https://www.deepdyve.com/lp/elsevier/lead-toxicity-through-the-leadzyme-Y7uMPhYcv0>.

29. DAVID, M, LILLEY, J. The Varkud satellite ribozyme. *RNA* [online]. 2004, **10**(2) [cit. 01.12.2014]. ISSN 151-158
Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1370526/>.
30. HAMMAN, Christian, LUPTAK, Andrej, PERREAULT, Jonathan, DE LA PEÑA, Marcos. The ubiquitous hammerhead ribozyme. *RNA*. [online]. 2012, **18**(5), [cit. 24.02.2015]. ISSN 871-885. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3334697/>.
31. CARBONELL, Alberto, FLORES, Ricardo, GAGO, Selma. Trans-cleaving hammerhead ribozymes with tertiary stabilizing motifs: in vitro and in vivo activity against a structured viroid RNA. *Nucleic Acids Research* [online]. 2010, **39**(6) [cit. 05.12.2014]. ISSN 1362-4962.
Dostupné z: <http://nar.oxfordjournals.org/content/39/6/2432.short>.
32. ETTORE, Luzi, FRITZ, Eckestein, GIUSEPPINA, Barsacchi. The newt ribozyme is part of riboprotein complex. *PNAS* [online]. 1997, **94**(18) [cit. 06.01.2015]. ISSN 9711-9716. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC23255/>.
33. EPSTEIN, L.M., GALL, J.G. Self-cleaving transcripts of satellite DNA from the newt. *Cell* [online]. 1987, **48**(3) [cit. 12.01.2015]. ISSN 535-43.
Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2433049>.
34. DENMAN, R.B., SMEDMAN, M., KUNG, L. Differential activity of trans-acting hammerhead ribozymes targeted to beta amyloid peptide precursor mRNA by altering the symmetry of helices I and III. *Arch Biochem Biophys* [cit. 02.11.2014]. ISSN 71-8.
Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7487076>.
35. *What-when-how*. In Depth Tutorials and Information [online]. [cit. 3.5.2015]
Dostupné z: <http://what-when-how.com/molecular-biology/rna-structure-molecular-biology/>.
36. Banáš, Pavel, Walter, Nils, Šponer, Jiří, Otyepka, Michal. Protonation states of the key active site residues and structural dynamics of glmS riboswitch as revealed by molecular dynamics. *The journal of physical chemistry*. [online], 2011, **114**(26), [cit. 20.5.2015]. ISSN 1520-6106. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2900856>.
37. Gong, Bo, Klein, Daniel, Ferré-D'Amaré, Adrian, Carey, Paul. The glmS ribozyme tunes the catalytically critical pK_a of its coenzyme glucosamine-6-phosphate. *The journal of physical chemistry*. [online], 2011, **133**(36) [cit. 20.5.2015]. Dostupné z doi: 10.1021/ja205185g
38. Ferré-D'Amaré, Adrian. Use of a coenzyme by the glmS ribozyme-riboswitch suggests primordial expansion of RNA chemistry by small molecules. *Philosophical Transactions of the Royal Society Biological Science*. [online], 2011, **366**(1580) [cit. 20.5.2015]. Dostupné z doi: 10.1098/rstb.2011.0131

39. Seyhan, Attila, Amarel, Jillian, Burke, John. Intracellular RNA cleavage by the hairpin ribozyme. *Oxford Journals*. [online], 1998, 26(15) Dostupné z doi: 10.1093/nar/26.15.3494.
40. Fedor, Martha. Structure and function of the hairpin ribozyme. *Journal of Molecular Biology*. [online], 2000, **297**(2) [cit. 20.5.2015]. Dostupné z doi: 10.1006/jmbi.2000.3560
41. Schneider, Christoph. Nucleic Acid Nomenclature and Structure. *Jena Library of Biological Macromolecules*. [online], [cit. 20.5.2015]. Dostupné z doi http://jenalib.fli-leibniz.de/ImgLibDoc/nana/IMAGE_NANA.html
42. Damha M., Peng, G. 2005 Synthesis and hybridization studies of oligonucleotides containing 1-(2-deoxy-2- α -C-hydroxymethyl- β -d-ribofuranosyl)thymine (2'- α -hm-dT). *An Open Access Biomedical Image Search Engine*. [online]. [cit. 20.5.2015]. Dostupné z: http://openi.nlm.nih.gov/detailedresult.php?img=1322267_gki1003f2&req=4