



VYSOKÁ ŠKOLA
CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
V PRAZE

HABILITAČNÍ PRÁCE

Modelování mechanických vlastností nukleových kyselin

Ing. Filip Lankaš, Ph.D.

Praha, srpen 2017

Obsah

1. Úvod	1
2. Konformační charakteristiky nukleových kyselin	3
2.1 Popis na úrovni tuhých bází	5
2.2 Globální popis	7
2.3 Torsní úhly v páteři a žlábký	8
3. Mechanické modely	10
3.1 Deformační energie	11
3.2 Částečné deformace	12
3.3 Model alosterie	13
4. Molekulová dynamika	15
5. Aplikace	17
5.1 Sekvenčně závislé mechanické vlastnosti DNA	18
5.2 Mechanický model A-traktů	20
5.3 Modelování alosterických jevů	22
5.4 Mechanické vlastnosti poškozené DNA	25
5.5 Mechanika strukturních motivů RNA	26
6. Závěr	28
Seznam použité literatury	28
Seznam přiložených publikací	32

1. Úvod

DNA a RNA patří k nejdůležitějším biologickým makromolekulám. DNA slouží jako depozitář genetické informace, obsahující instrukce k tvorbě proteinů, které zajišťují většinu buněčných funkcí. Úseky, které kódují proteiny, tvoří ovšem jen část celého genomu (u člověka jen několik procent). Zbývající úseky, tzv. temná hmota genomu, mohou plnit další klíčové funkce, které se teprve v poslední době daří objasňovat. K nim patří účast na celé řadě mechanismů regulujících genovou expresi, tj. „realizaci“ genů ve formě proteinů ¹.

Informace je v DNA uložena ve formě sekvence jejích bazí. V kódujících oblastech souvisí tato sekvence přímo se sekvencí aminokyselin v příslušném proteinu prostřednictvím genetického kódu. Složitější je situace v nekódujících oblastech. Postupně se ukazuje, že existuje další informační vrstva přeložená přes prostou sekvenci bazí – i když si DNA v podstatě vždy zachovává svou dvoušroubovicovou helikální strukturu, modulují různé sekvence její strukturní, mechanické a další fyzikálně chemické charakteristiky. Tato variabilita hraje pak důležitou roli v mechanismech, které užívají proteiny pro rozpoznání svých vazebných míst na DNA. Vazba proteinů k DNA má zásadní význam v regulaci exprese genů, ve sbalování (packaging) DNA do buněčného jádra, v replikaci DNA a v přepisu (transkripci) genetické informace do RNA.

Molekuly RNA primárně slouží jako dočasná úložiště genetické informace, která do nich byla přepsána z DNA. Tyto molekuly (tzv. messenger RNA, mRNA) jsou pak užity jako templáty, z nichž je informace přeložena do sekvence aminokyselin proteinů. Tento překlad (translace) je ovšem vrcholně složitý a jemně regulovaný proces, který se uskutečňuje v makromolekulárních komplexech zvaných ribosomy. Jednotlivé aminokyseliny putují k ribosomu navázány na svou specifickou RNA (transfer RNA, tRNA), jejíž rozpoznání se děje na základě komplementarity s příslušným úsekem mRNA. Samotný ribosom se také z velké části skládá z RNA (ribosomální RNA, rRNA). Lze jej chápat jako molekulový stroj obsahující rigidní úseky RNA spojené částmi flexibilními, které zajišťují nezbytnou prostorovou koordinaci. Mimo tyto již dlouho známé (nikoli však plně pochopené) procesy jsou v genomu kódovány RNA, které neodpovídají žádným proteinům, ale mají regulační funkci. Tato oblast aktivity RNA není ještě ani zdaleka prozkoumána, je však zřejmé, že i zde hrají mechanické vlastnosti RNA důležitou roli.

Na rozdíl od DNA, která se vyskytuje převážně ve formě dvoušroubovice ², tvoří RNA vedle dvoušroubovicové struktury (poněkud odlišné od DNA) také celou řadu nehelikálních (též nekanonických) prostorových motivů. Ty jsou pak stavebními prvky větších struktur RNA ³. Specifické strukturní a mechanické vlastnosti těchto prvků spoluurčují jejich funkční roli v rámci rozsáhlejších struktur.

Vedle základní úlohy, kterou mají molekuly DNA a RNA v biologických systémech, vzrůstá i jejich význam v oblasti uměle připravených struktur pro nanotechnologické aplikace ^{4, 5}. V syntéze se primárně využívá komplementarity bazí, která umožňuje velkou strukturní variabilitu i dynamické efekty spojené s rozpojováním (melting) a opětovným spojováním (hybridizací) párů bazí. Základní výhodou nanostruktur založených na RNA je možnost vytvořit tyto struktury přímo v buňce přepisem vhodně upraveného genomu, uloženého v DNA. Samotný proces transkripce realizují běžné buněčné mechanismy bez zásahu zvenčí. Je-li daná sekvence vhodně navržena, sbalí se RNA v buňce sama do požadované struktury ⁶. I v případě nanostruktur hrají mechanické vlastnosti důležitou roli – určují například, nakolik bude struktura tvarově stabilní vůči tepelnému pohybu a nakolik ji lze zdeformovat vazbou malých molekul (ligandů).

Strukturu nukleových kyselin lze studovat řadou experimentálních metod. Rentgenová krystalografie, určující prostorovou konfiguraci molekuly v atomovém rozlišení, se stala nepostradatelnou, široce užívanou metodou pro stanovení struktur nukleových kyselin a jejich komplexů. Již první model dvoušroubovice DNA navržený Watsonem a Crickem v roce 1953 byl založen na difrakčních charakteristikách svazků DNA, první krystal oligomeru DNA z osmdesátých let odhalil závislost tvaru dvoušroubovice na sekvenci bazí ⁷. Metoda má však také svá omezení – předně poskytuje velmi omezené informace o konformační dynamice dané molekuly, za druhé konformace molekuly v krystalu nemusí odpovídat její konformaci ve vodném roztoku. Naproti tomu nukleární magnetická rezonance (NMR) zachycuje konformační dynamiku v roztoku, její přesnost však v současnosti nezaručuje zcela spolehlivou strukturní charakterizaci molekuly ⁷. Z dalších metod vyniká kryoelektronová mikroskopie (kryo-EM), jejíž rozlišovací schopnost se stále zvyšuje a která zásadně přispěla k charakterizaci makromolekulárních komplexů, jako je ribosom ⁸. Důležitou metodou je také tzv. cyklizace, založená na měření pravděpodobnosti, že daný oligomer DNA vytvoří cyklickou strukturu spojením svých konců. Tato pravděpodobnost závisí na globálních strukturních vlastnostech oligomeru ⁹.

Chceme-li experimentálně studovat nejen strukturu, ale i mechanickou tuhost (rigiditu), je rejstřík metod omezenější. Krystalové a kryo-EM struktury jsou v podstatě statické, NMR poskytuje jen dílčí, nepřímou informaci. Užitečné informace lze získat cyklizací, neboť pravděpodobnost vytvoření kruhové struktury závisí nejen na tvaru oligomeru, ale i na jeho mechanické tuhosti ¹⁰. Samostatnou, hojně rozšířenou třídou metod jsou techniky mikromanipulace. V nich se dlouhé vlákno DNA nebo RNA zachytí na jednom konci na podložku a k druhému konci se připojí mikroskopická kulička, kterou lze pak manipulovat pomocí magnetů nebo optických pastí. Takto byly získány některé základní mechanické charakteristiky DNA a helikální RNA ¹¹. S ohledem na nutnou délku vlákna (typicky tisíce až desetitisíce párů bazí) je ovšem detailní studium mechanických vlastností a jejich sekvenční závislosti obtížné.

Nezbytným doplňkem experimentálních metod jsou metody výpočetní. Simulace molekulové dynamiky umožňují studovat strukturní změny v rozlišení jednotlivých atomů a při pokojové teplotě, což nedokáže žádná experimentální metoda. Mohou tak poskytnout detailní obraz konformační dynamiky a podklad pro návrh mikroskopických mechanismů pozorovaných jevů. Mezi jejich hlavní omezení patří nezbytně zjednodušený popis meziatomových interakcí a limitovaná velikost systému i časová škála simulací^{12, 13}.

Tato práce je věnována teoretickému a výpočetnímu studiu mechanických vlastností molekul DNA a RNA. Nejprve jsou představeny způsoby charakterizace konformací nukleových kyselin, poté jejich mechanické modely. Krátce je zmíněna problematika simulací molekulové dynamiky. Další část je pak věnována aplikacím. Z autorovy časopisecké produkce je představeno deset reprezentativních prací, které pojednávají jednotlivá témata.

2. Konformační charakteristiky nukleových kyselin

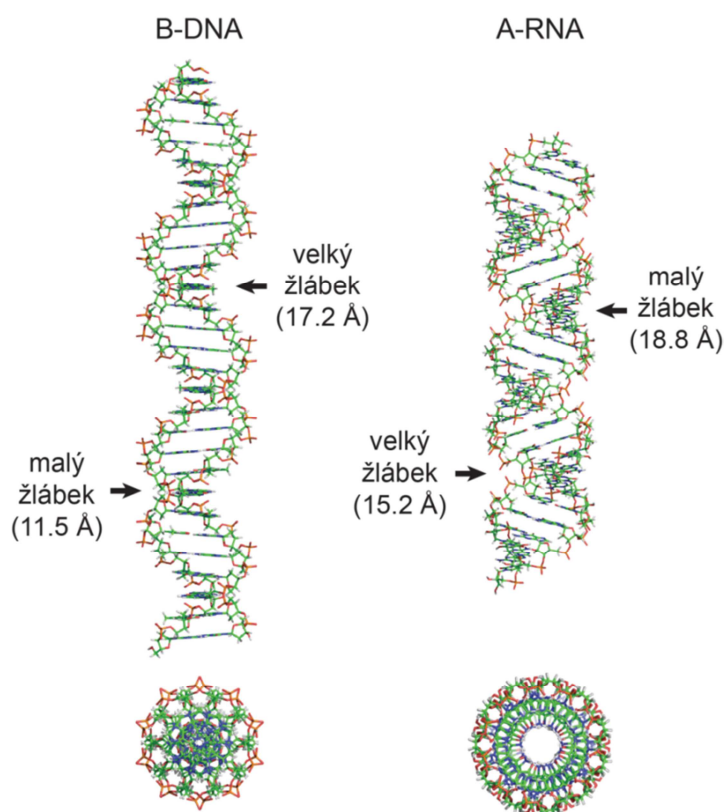
DNA se převážně vyskytuje jako dvoušroubovice, kde každé ze dvou vláken tvoří cukr-fosfátová páteř s navázanými bázemi. Každé vlákno má charakteristický směr (polaritu) od 5' konce k 3' konci (značení je zvoleno podle atomů cukru a charakterizuje směr syntézy vlákna v buňce). Vlákna probíhají antiparalelně a jsou spojena pouze nekovalentně, vodíkovými vazbami mezi bázemi v každém páru. Za fyziologických podmínek má dvoušroubovice DNA průměr asi 20 Å s páry kolmými na helikální osu a se stoupáním asi 10.5 párů bází na jednu otočku (tzv. B-DNA, obr. 1). Dvoušroubovice RNA se vyznačuje poněkud větším průměrem, sklonem párů vzhledem k ose a dutinou uvnitř (A-RNA). Jak už bylo řečeno, tvoří RNA kromě helixu také celou řadu nehelikálních (nekanonických) motivů^{2, 7}.

Nejúplnější strukturní informaci představují kartézské souřadnice všech atomů dané makromolekuly, jakož i atomů okolních molekul vody a iontů. Takový obraz, ovšem statický, může v principu poskytnout rentgenová krystalografie (která však nezachycuje vodíkové atomy). Také atomistická molekulová dynamika poskytuje souřadnice všech atomů, a to v tepelném pohybu. Tato detailní charakterizace je někdy nezbytná – například lokalizace vody a iontů těsně souvisí s výskytem konformačních substavů v páteři DNA a se šířkou jejích žlábků, popsanych níže. Pro řadu aplikací je však uvedený popis zbytečně podrobný. Proto byly vyvinuty zjednodušené konformační charakteristiky, které zachycují rysy podstatné pro mnoho problémů.

Výrazné zjednodušení umožňuje fakt, že báze, tvořené jedním kruhem nebo dvěma spojenými kruhy, jsou samy o sobě velmi rigidní. Je tedy nasnadě považovat je za tuhá tělesa (obr. 2). Tím je prostorová konfigurace každé báze charakterizována pouze šesti souřadnicemi, z nichž tři popisují polohu

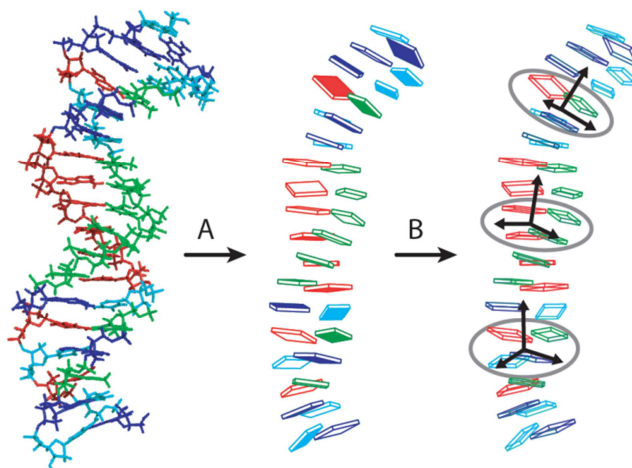
zvoleného referenčního bodu a tři charakterizují orientaci báze v prostoru ¹⁴. Jelikož poloha a orientace studované molekuly jako celku je často irelevantní, užívají se vhodné souřadnice popisující jen relativní polohu a orientaci bází a párů bází v molekule ¹⁵.

Leckdy je vhodné ještě další zjednodušení, kde nikoli jednotlivé báze, ale celé jejich skupiny jsou popisovány jako tuhá tělesa (obr. 2). Typickým příkladem je globální chování dlouhého oligomeru, kde stačí jen jedna skupina (handle) na každém konci ¹⁶. Ve strukturách RNA je také často výhodné považovat za tuhá tělesa krátké úseky dvoušroubovice spojující nekanonické motivy ¹⁷.



Obr. 1. Základní helikální formy DNA a RNA. V obrázku jsou vyznačeny šířky velkého a malého žlábku. Změna geometrie do A-formy mění šířky žlábků, takže velký se stává užším než malý.

Pokud jde o cukr-fosfátovou páteř, lze vazebné délky a vazebné úhly považovat s dobrou přesností za konstantní. Naopak torsní úhly v páteři se mohou výrazně měnit a zaujímat definované oblasti konformačního prostoru, tzv. substavy páteře ¹⁸. Dalším charakteristickým znakem dvoušroubovice DNA i RNA jsou žlábkové vinoucí se podél celé struktury a vzniklé jako volný prostor mezi oběma cukr-fosfátovými páteřemi (obr. 1). Vzhledem k nesymetrickému napojení páteře a bází mají oba žlábkové nestejnou šířku – rozlišujeme velký žlábek (major groove) a malý žlábek (minor groove).

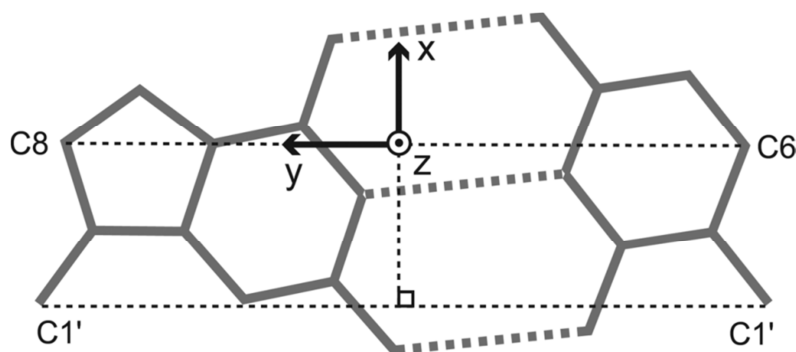


Obr. 2. Tři úrovně konformačního popisu nukleových kyselin. Od atomického rozlišení lze přejít k úrovni tuhých bází (A) a odtud k popisu, kde skupiny bází tvoří tuhá tělesa (B).

2.1 Popis na úrovni tuhých bází

V tomto popisu jsou báze považovány za tuhá tělesa. Abychom udali polohu a orientaci dané báze v prostoru, musíme s ní především pevně spojit jistou souřadnou soustavu - referenční bod a pravotočivou orthonormální trojici vektorů. Po jistých diskusích se vědecká komunita sjednotila na standardním způsobu, jak to provést¹⁴. Definici ilustruje obr. 3. Východiskem je idealizovaná geometrie Watson-Crickova páru, která je dokonale planární. Referenční bod je zvolen v polovině úsečky spojující atomy C6 a C8, osa x je kolmá na spojnici obou atomů C1'. Předpokládejme, že pár je součástí dvoušroubovice, kde vlákno obsahující bázi vpravo je zvoleno jako referenční a stoupá ve směru od 5' k 3' konci z roviny nákresny. Pak osa y je kolmá na x a směřuje od referenčního ke komplementárnímu vláknu. Osa z , která doplňuje pravotočivou trojici, ukazuje ve směru od 5' k 3' podél referenčního vlákna.

Zvolený referenční bod a trojici vektorů je možno vyjádřit pomocí souřadnic atomů buďto jedné nebo druhé báze. Takto má každá z obou bází přiřazen souřadný systém, přičemž pro idealizovanou geometrii páru souřadné systémy obou bází splývají (obr. 3).



Obr. 3. Definice souřadné soustavy pevně spojené s bází.

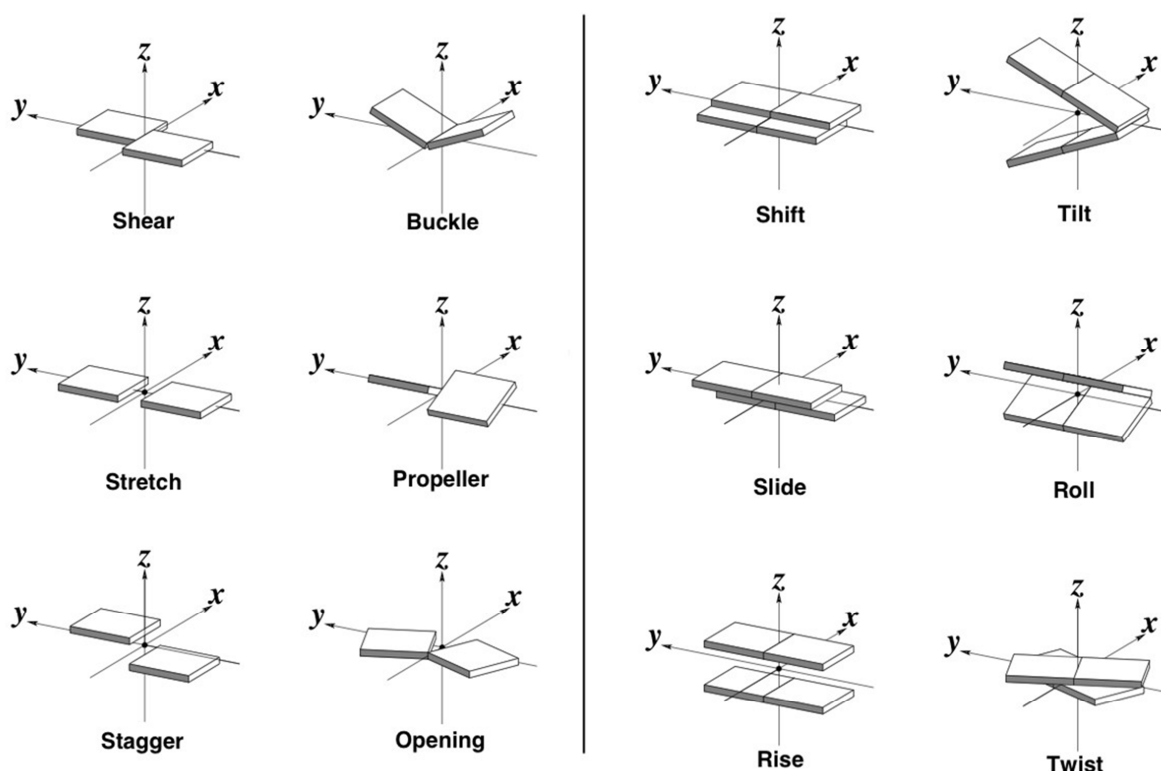
Na první pohled by se zdálo výhodnější volit souřadný systém fyzikálně přirozeněji, např. umístit počátek do těžiště báze a osy volit jako hlavní směry tensoru setrvačnosti. Takto by však byly jednotlivé souřadné systémy oligomeru značně heterogenní v závislosti na sekvenci. Přijatá definice má naopak tu výhodu, že v idealizované geometrii splývají počátky a osy obou bází v páru a navíc počátky a osy z leží na ose celé dvoušroubovice. Obecně se ovšem geometrie liší od ideální, ale tyto perturbace vzhledem k ideální struktuře bývají malé.

Také geometrie jednotlivých bází se obecně poněkud liší od ideální, a to zejména v simulacích molekulové dynamiky, kdy následkem tepelného pohybu mají báze, jakkoli rigidní, přece jistou konformační dynamiku. Prvním krokem tedy bývá fitování ideální struktury báze na danou geometrii. S touto ideální strukturou je pak spojen popsání souřadný systém.

Poloha a orientace každé báze je takto vyjádřena šesti souřadnicemi, z nichž tři charakterizují polohu referenčního bodu a tři orientaci trojice os v prostoru. Oligomer o N párech obsahuje $2N$ bází a je tedy charakterizován $12N$ souřadnicemi. V řadě problémů ale nehraje žádnou roli poloha a orientace oligomeru jako celku. V tom případě mají význam jen relativní posunutí a rotace bází, což charakterizuje pouze $12N-6$ souřadnic (neboť např. souřadný systém první báze lze volit jakkoli, třeba totožný s laboratorním souřadným systémem).

Souřadnice lze volit mnoha různými způsoby, ustálila se však jistá obecná pravidla, tzv. Cambridgeská konvence¹⁵. Podle ní se souřadnice volí tak, aby charakterizovaly jednak relativní polohu a orientaci dvou bází v páru (intra-basepair coordinates), jednak relativní polohu a orientaci dvou sousedních párů (inter-basepair coordinates). Hodnota souřadnic obecně závisí na tom, které ze dvou vláken DNA se zvolí jako referenční. Podle pravidel musí být souřadnice zvoleny tak, aby při změně referenčního vlákna se buďto vůbec nezměnily (sudé souřadnice), nebo jen změnily znamení (liché souřadnice). Toho se dosahuje volbou pomocných souřadných soustav (middle frames) mezi bázemi v páru a mezi sousedními páry. Souřadnice definované podle těchto pravidel nesou standardní jména, uvedená na

obr. 4. Tak twist charakterizuje relativní otočení párů kolem osy z (pro B-DNA asi 34°), roll je úhel ohybu do žlábků (kladný do velkého, záporný do malého) atd. I v rámci obecných pravidel zbývá ještě prostor pro různé matematické definice souřadnic. V praxi se nejčastěji používají dvě definice. Program pro konformační analýzu zvaný 3DNA¹⁹ užívá pro popis rotací v podstatě varianty Eulerových úhlů, zatímco definice v programu Curves+²⁰ je založena na „axis-angle“ parametrech, tj. souřadnicích vektoru, jehož délka je rovna úhlu otočení a který má směr osy otočení. Pro obě definice jsou lichými souřadnicemi shear, buckle, shift a tilt, ostatní jsou sudé.



Obr. 4. Schematické znázornění a standardní jména vnitřních souřadnic v popisu tuhých bazí. V každé části jsou vlevo uvedeny souřadnice translační a vpravo rotační. První řádek obsahuje liché souřadnice (při změně referenčního vlákna mění znaménko), ostatní jsou sudé (zůstávají beze změny).

2.2 Globální popis

V tomto popisu jde o seskupení bazí v daném fragmentu nukleové kyseliny do jednoho celku, který je pak chápán jako tuhé těleso. Úloha není zcela triviální. Klíčová je vhodná volba souřadné soustavy, která by s takovým tělesem byla spojena. Přitom požadujeme, aby byly do jisté míry zachovány strukturní charakteristiky původního fragmentu, např. směry do žlábků. Těmto požadavkům vyhovuje

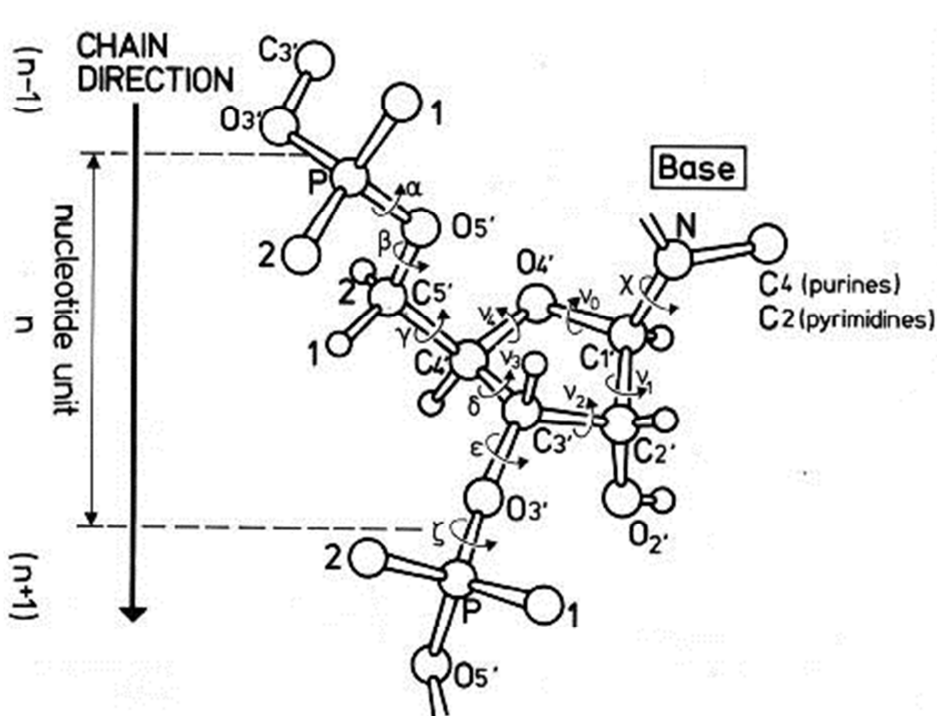
průměrování souřadných soustav jednotlivých bazí ¹⁶. Přirozenou volbou počátku je aritmetický průměr počátků soustav spojených s bázemi. Tato volba je založena na variační vlastnosti aritmetického průměru – je to onen bod, pro nějž součet kvadrátů vzdáleností k jednotlivým průměrovaným bodům je ze všech nejmenší.

Složitější je volba trojice orthonormálních vektorů, které charakterizuje orthogonální matice jejich souřadnic v laboratorní soustavě. V analogii s body hledáme průměr jako takovou orthogonální matici, která má součet kvadrátů vzdáleností od jednotlivých průměrovaných matic minimální. Zde ovšem odpověď závisí na použitém pojmu vzdálenosti matic. Pro euklidovskou vzdálenost podal řešení v uzavřené formě M. Moakher ²¹, v kontextu DNA bylo poprvé použito v naší studii o struktuře A-traktů ¹⁶. Vzorce jsou však výpočetně dosti náročné a hlavně příliš spleťité pro další teoretické odvozování (vyžadují výpočet vlastních hodnot, tj. nalezení kořenů polynomu 3. stupně). Proto jsme navrhli a otestovali zjednodušenou metodu ¹⁷, v níž se nejprve převedou matice na kvaterniony a z těchto se pak utvoří aritmetický průměr, který po normování na jednotku představuje výslednou orthogonální matici. Numerické testy ukázaly, že metoda je v praxi velmi přesná (odchylka rotací 1-2°).

Jsou-li takto skupiny bazí převedeny na efektivní tuhá tělesa, je mezi nimi možno definovat vnitřní souřadnice zcela analogicky k souřadnicím mezi bázemi či páry bazí. V případě, že efektivní tělesa představují skupiny bazí na koncích oligomeru, bývá vhodné definovat vzdálenost mezi nimi nikoli úsečkou v prostoru, ale podél oligomeru (contour length).

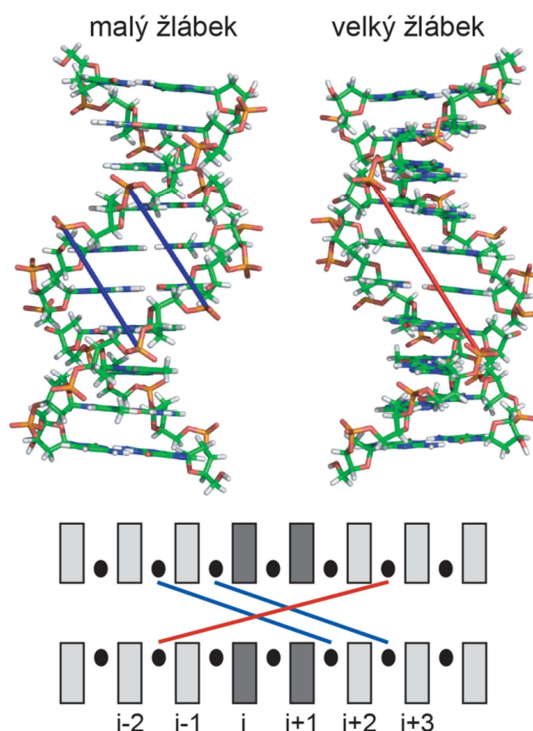
2.3 Torsní úhly v páteři a žlábký

Páteř DNA a RNA je v každém nukleotidu charakterizována šesticí torsních úhlů, standardně označovaných alfa až zeta (obr. 5). Při popisu se s výhodou uplatňují standardní jména jejich intervalů: *gauche+*, *trans*, *gauche-*. V izolované DNA je obvykle alfa v *g-*, beta v *t* a gama v *g+*. Jiná konfigurace byla pozorována jen v ojedinělých speciálních případech. Naopak epsilon a zeta mohou zaujímat dva různé substavy ²². Kromě obvykle převažujícího epsilon/zeta v *t/g-* (substav BI) se vyskytuje ještě epsilon/zeta v *g-/t* (substav BII). Při přechodu mezi nimi se tedy epsilon a zeta mění společně, jako části ojnice (crankshaft motion). Zdůrazněme, že tyto preference platí pouze pro izolovanou DNA – v komplexu s proteiny obsazují všechny úhly spojitě kontinuum stavů ¹⁸. Úhel delta je součástí cukrového kruhu, který se však spíše charakterizuje pseudorotačním fázovým úhlem (sugar pucker).



Obr. 5. Torsní úhly v páteři vlákna DNA nebo RNA. Obrázek je převzat z knihy W. Saenger², která stále představuje základní pramen ke struktuře nukleových kyselin.

Důležitou charakteristikou dvoušroubovice DNA i RNA je šířka jejich žlábků (obr. 6). Žlábků jsou častými vazebnými místy malých molekul (ligandů) i postranních řetězců proteinů a jejich šířka umožňuje vazbu nebo naopak ji stericky znemožňuje²³. Šířka žlábků je v podstatě dána minimální vzdáleností fosforových atomů mezi oběma vlákny. Zvolíme-li pevně jeden atom fosforu a měříme-li vzdálenost ke všem fosforům v druhém vlákně, najdeme dvě lokální minima, jedno pro fosfor ve 3. následujícím nukleotidu podél vlákna, druhé pro fosfor v čtvrtém nukleotidu (obr. 6). První minimum odpovídá šířce malého žlábků, druhé velkého. Z pohledu sekvence jsou tedy šířky žlábků nelokální souřadnice, spojující místa vzdálená několik nukleotidů.



Obr. 6. Definice šířky malého a velkého žlábků. Dané dvojici sousedních párů (tmavě šedá) je přiřazena šířka velkého žlábků (červeně vyznačená vzdálenost mezi atomy fosforu) a malého žlábků (průměr modře vyznačených vzdáleností).

3. Mechanické modely

Jsou-li definovány souřadnice popisující konformaci molekuly DNA nebo RNA, vzniká otázka volné energie spojené s těmito souřadnicemi. Znalost funkce volné energie umožňuje udat její změnu způsobenou odchylkou souřadnic od jejich rovnovážných hodnot, tedy volnou energii vynaloženou na deformaci molekuly. Volná energie jako funkce souřadnic určuje tedy mechanické vlastnosti dané molekuly^{24, 25}.

Zde se nejdříve zaměříme na volnou energii v popisu tuhých bazí pro dvoušroubovici DNA nebo RNA. Jak už bylo uvedeno, určují souřadnice relativní posunutí a rotaci bazí modelovaných jako tuhá tělesa. Přitom je výhodné definovat jednak skupinu souřadnic pro dvojici bazí v každém páru, jednak skupinu souřadnic pro dva sousední páry – viz obr. 4. Předpokládáme, že tyto souřadnice mají vlastnosti dané Cambridgeskou konvencí, tj. při změně referenčního vlákna buďto mění znaménko (liché souřadnice) nebo zůstávají beze změny (sudé).

3.1 Deformační energie

Volná energie jako funkce těchto souřadnic má obecně složitý tvar, zachycující i roztržení (melting) na dvě samostatná vlákna. Zde se však omezíme na malé deformace, které již zachycují řadu biologicky významných konformačních změn. Pak lze předpokládat ²⁶, že volná energie (též deformační energie) je kvadratickou funkcí souřadnic (harmonická aproximace), tedy

$$E(\mathbf{w}) = \frac{1}{2}(\mathbf{w} - \hat{\mathbf{w}}) \cdot \mathbf{K}(\mathbf{w} - \hat{\mathbf{w}}), \quad (1)$$

kde $\mathbf{w}$ je vektor souřadnic, $\hat{\mathbf{w}}$ vektor jejich rovnovážných hodnot a $\mathbf{K}$ symetrická pozitivně definitní matice tuhostních konstant (tuhostní matice). Je-li systém v kontaktu s tepelným rezervoárem o teplotě T , má kanonické rozdělení pravděpodobnosti souřadnic tvar

$$p(\mathbf{w}) = A \exp\left(-\frac{E(\mathbf{w})}{k_B T}\right), \quad (2)$$

kde jsme symbolem A označili normující konstantu. Dosazením kvadratické funkce pro deformační energii (1) nabývá rozdělení tvaru vícerozměrného Gaussova rozdělení. Užitím vztahů pro jeho momenty pak dostaneme

$$\hat{\mathbf{w}} = \langle \mathbf{w} \rangle, \quad k_B T \mathbf{K}^{-1} = \langle \Delta \mathbf{w} \otimes \Delta \mathbf{w} \rangle, \quad (3)$$

kde jsme označili $\Delta \mathbf{w} = \mathbf{w} - \hat{\mathbf{w}}$. Vidíme, že první moment (střední hodnota) je přímo roven hodnotám souřadnic v minimu energie a druhý moment (kovarianční matice) souvisí jednoduše s tuhostní maticí. Kovarianční matice

$$\mathbf{C} = \langle \Delta \mathbf{w} \otimes \Delta \mathbf{w} \rangle \quad (4)$$

má prvky

$$\mathbf{C}_{ij} = \langle \Delta w_i \Delta w_j \rangle, \quad (5)$$

kde w_i jsou složky vektoru $\mathbf{w}$, $\hat{w}_i$ jsou složky vektoru $\hat{\mathbf{w}}$ a $\Delta w_i = w_i - \hat{w}_i$.

Tyto vztahy určují souvislost mezi momenty kanonického rozdělení a parametry funkce deformační energie (mechanického modelu), tj. $\hat{\mathbf{w}}$ a $\mathbf{K}$. Jsou-li momenty odhadnuty z nějaké realizace kanonického souboru (např. ze simulací molekulové dynamiky), umožňují tyto vztahy vypočítat parametry modelu.

Parametry $\hat{\mathbf{w}}$ a $\mathbf{K}$ úplně charakterizují mechanické vlastnosti molekuly v popisu tuhých bazí a v harmonické aproximaci. Pro jednoduchou charakterizaci tuhosti molekuly jako celku může sloužit konformační entropie²⁷, daná Gibbsovým vztahem

$$S_c = -k_B \int p(\mathbf{w}) \ln p(\mathbf{w}) d\mathbf{w}. \quad (6)$$

Po dosazení vícerozměrného Gaussova rozdělení z rovnice (2) dostaneme

$$S_c = \frac{1}{2} k_B \ln \left[(2\pi e)^N \det \mathbf{C} \right], \quad (7)$$

kde $e = 2,718 \dots$ je základ přirozených logaritmů. Výhodné je pracovat s entropií na jednu souřadnici,

$$s_c = S_c / N, \quad (8)$$

kteřá je intenzivní veličinou a umožňuje tedy porovnávat systémy s různým počtem souřadnic.

3.2 Částečné deformace

Častý je případ, kdy deformaci nepodléhají všechny souřadnice, ale jen některé. Označíme-li $\mathbf{w}_1$ deformované souřadnice a $\mathbf{w}_2$ ostatní, můžeme psát

$$\mathbf{w} = \begin{pmatrix} \mathbf{w}_1 \\ \mathbf{w}_2 \end{pmatrix} \quad (9)$$

kde jsme přerovnali složky tak, že jsou nejdříve vypsány deformované souřadnice a pak ostatní. Tomuto zápisu odpovídá rozdělení kovarianční a tuhostní matice na bloky (submatice) ve tvaru

$$\mathbf{C} = \begin{pmatrix} \mathbf{C}_{11} & \mathbf{C}_{12} \\ \mathbf{C}_{12}^T & \mathbf{C}_{22} \end{pmatrix}, \quad \mathbf{K} = \begin{pmatrix} \mathbf{K}_{11} & \mathbf{K}_{12} \\ \mathbf{K}_{12}^T & \mathbf{K}_{22} \end{pmatrix} \quad (10)$$

Lze rozlišit dva krajní případy – buďto jsou zbylé souřadnice $\mathbf{w}_2$ fixovány, nebo jsou volné a relaxují do svých energeticky optimálních hodnot. V případě fixovaných $\mathbf{w}_2$ lze tuhost vzhledem k $\mathbf{w}_1$ snadno určit přímo ze vztahu pro deformační energii (1) – je to submatice $\mathbf{K}_{11}$ tuhostní matice $\mathbf{K}$, odpovídající deformovaným souřadnicím.

V případě, že nedeformované souřadnice $\mathbf{w}_2$ jsou volné, má deformační energie pro každé dané $\mathbf{w}_1$ hodnotu minima vzhledem k $\mathbf{w}_2$. Protože deformační energie je kvadratickou formou, lze minimum nalézt analyticky. Výsledná deformační energie nabývá tvaru

$$\tilde{E}(\mathbf{w}_1) = \frac{1}{2} \Delta \mathbf{w}_1 \cdot \tilde{\mathbf{K}} \Delta \mathbf{w}_1, \quad (11)$$

kde $\Delta \mathbf{w}_1 = \mathbf{w}_1 - \hat{\mathbf{w}}_1$, a je tedy opět kvadratickou formou. Její parametry jsou dány vztahy

$$\hat{\mathbf{w}}_1 = \langle \mathbf{w}_1 \rangle, \quad k_B T \tilde{\mathbf{K}}^{-1} = \mathbf{C}_{11}. \quad (12)$$

Efektivní tuhostní matice vzhledem k $\mathbf{w}_1$ je tedy určena submaticí $\mathbf{C}_{11}$ kovarianční matice $\mathbf{C}$, odpovídající deformovaným souřadnicím²⁸.

3.3 Model alosterie

V aplikacích představíme model alosterické interakce mezi dvěma proteiny vázanými na DNA, která je zprostředkována elastickou vazbou přes úsek dvoušroubovice mezi oběma vazebnými místy²⁹. Alosterický efekt je dán rozdílem deformační energie vazby druhého proteinu za přítomnosti prvního a bez jeho přítomnosti.

Úlohu lze snadno formulovat v termínech právě uvedeného mechanického modelu, předpokládáme-li, že vazba proteinu se projeví fixací některých souřadnic. Pišme

$$\mathbf{w} = \begin{pmatrix} \mathbf{w}_1 \\ \mathbf{w}_2 \\ \mathbf{w}_3 \end{pmatrix}, \quad (13)$$

kde souřadnice $\mathbf{w}_1$ jsou fixovány vazbou prvního proteinu, souřadnice $\mathbf{w}_2$ vazbou druhého a $\mathbf{w}_3$ jsou relaxované. V souladu s tím rozdělme tuhostní matici na bloky, takže

$$\mathbf{K} = \begin{pmatrix} \mathbf{K}_{11} & \mathbf{K}_{12} & \mathbf{K}_{13} \\ \mathbf{K}_{12}^T & \mathbf{K}_{22} & \mathbf{K}_{23} \\ \mathbf{K}_{13}^T & \mathbf{K}_{23}^T & \mathbf{K}_{33} \end{pmatrix}. \quad (14)$$

Další krok spočívá v blokové faktorizaci tuhostní matice na tvar LDU (dolní trojúhelníková, diagonální, horní trojúhelníková). Ježto tuhostní matice je symetrická, máme pouze

$$\mathbf{K} = \mathbf{U}\mathbf{D}\mathbf{U}^T.$$

Provedeme-li vynásobení na pravé straně a porovnáme odpovídající bloky s levou stranou, zjistíme, že

$$\mathbf{U} = \begin{pmatrix} \mathbf{I} & \mathbf{K}_{ab}\mathbf{K}_{bb}^{-1} & \mathbf{K}_{13}\mathbf{K}_{33}^{-1} \\ \mathbf{0} & \mathbf{I} & \mathbf{K}_{23}\mathbf{K}_{33}^{-1} \\ \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{I} \end{pmatrix}, \quad (15)$$

$$\mathbf{D} = \begin{pmatrix} \mathbf{K}_{aa} - \mathbf{K}_{ab}\mathbf{K}_{bb}^{-1}\mathbf{K}_{ab}^T & \mathbf{0} & \mathbf{0} \\ \mathbf{0} & \mathbf{K}_{bb} & \mathbf{0} \\ \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{K}_{33} \end{pmatrix}, \quad (16)$$

kde

$$\begin{aligned} \mathbf{K}_{aa} &= \mathbf{K}_{11} - \mathbf{K}_{13}\mathbf{K}_{33}^{-1}\mathbf{K}_{13}^T \\ \mathbf{K}_{ab} &= \mathbf{K}_{12} - \mathbf{K}_{13}\mathbf{K}_{33}^{-1}\mathbf{K}_{23}^T \\ \mathbf{K}_{bb} &= \mathbf{K}_{22} - \mathbf{K}_{23}\mathbf{K}_{33}^{-1}\mathbf{K}_{23}^T \end{aligned} \quad (17)$$

Dosazením faktorizované tuhostní matice do výrazu pro deformační energii E dostaneme

$$E = E_1 + E_2 + E_3 \quad (18)$$

kde jednotlivé členy jsou dané vztahy

$$\begin{aligned} E_1 &= \frac{1}{2} \Delta \mathbf{w}_1 \cdot [\mathbf{K}_{aa} - \mathbf{K}_{ab}\mathbf{K}_{bb}^{-1}\mathbf{K}_{ab}^T] \Delta \mathbf{w}_1 \\ E_2 &= \frac{1}{2} [\mathbf{K}_{bb}^{-1}\mathbf{K}_{ab}^T \Delta \mathbf{w}_1 + \Delta \mathbf{w}_2] \cdot \mathbf{K}_{bb} [\mathbf{K}_{bb}^{-1}\mathbf{K}_{ab}^T \Delta \mathbf{w}_1 + \Delta \mathbf{w}_2] \\ E_3 &= \frac{1}{2} [\mathbf{K}_{33}^{-1}\mathbf{K}_{13}^T \Delta \mathbf{w}_1 + \mathbf{K}_{33}^{-1}\mathbf{K}_{23}^T \Delta \mathbf{w}_2 + \Delta \mathbf{w}_3] \cdot \mathbf{K}_{33} [\mathbf{K}_{33}^{-1}\mathbf{K}_{13}^T \Delta \mathbf{w}_1 + \mathbf{K}_{33}^{-1}\mathbf{K}_{23}^T \Delta \mathbf{w}_2 + \Delta \mathbf{w}_3] \end{aligned} \quad (19)$$

Lze ukázat, že každý z těchto tří členů je pozitivně definitní kvadratickou formou. Každý člen je tedy nezáporný a je nulový tehdy a jen tehdy, je-li argument kvadratické formy nulový. To umožňuje přímé vyčíslení deformační energie i výpočet hodnot relaxovaných souřadnic. Jsou-li fixované pouze $\mathbf{w}_1$, a to na hodnotách $\mathbf{w}_1^{(1)}$ (odpovídá vazbě pouze prvního proteinu v modelu alosterie), je deformační energie daná pouze prvním členem,

$$E^{(1)} = \frac{1}{2} \Delta \mathbf{w}_1^{(1)} \cdot [\mathbf{K}_{aa} - \mathbf{K}_{ab} \mathbf{K}_{bb}^{-1} \mathbf{K}_{ab}^T] \Delta \mathbf{w}_1^{(1)}, \quad (20)$$

kde odchylku vektoru souřadnic $\mathbf{w}_1$ od rovnovážné hodnoty jsme označili $\Delta \mathbf{w}_1^{(1)} = \mathbf{w}_1^{(1)} - \hat{\mathbf{w}}_1$. Zbylé souřadnice relaxují na hodnoty minima deformační energie při pevném $\mathbf{w}_1$, tedy na hodnoty, pro něž

$$E_2 = E_3 = 0. \quad (21)$$

S ohledem na pozitivní definitnost je toto minimum dosaženo v jediném bodě, totiž pro ty hodnoty $\mathbf{w}_2^{(1)}$, $\mathbf{w}_3^{(1)}$ souřadnic $\mathbf{w}_2$ a $\mathbf{w}_3$, které anulují příslušné argumenty kvadratických forem, tedy

$$\begin{aligned} \Delta \mathbf{w}_2^{(1)} &= -\mathbf{K}_{bb}^{-1} \mathbf{K}_{ab}^T \Delta \mathbf{w}_1^{(1)} \\ \Delta \mathbf{w}_3^{(1)} &= -\mathbf{K}_{33}^{-1} \mathbf{K}_{13}^T \Delta \mathbf{w}_1^{(1)} - \mathbf{K}_{33}^{-1} \mathbf{K}_{23}^T \Delta \mathbf{w}_2^{(1)} \end{aligned} \quad (22)$$

kde jsme označili $\Delta \mathbf{w}_2^{(1)} = \mathbf{w}_2^{(1)} - \hat{\mathbf{w}}_2$, $\Delta \mathbf{w}_3^{(1)} = \mathbf{w}_3^{(1)} - \hat{\mathbf{w}}_3$.

Tyto vzorce ukazují, jak se mění relaxované souřadnice $\mathbf{w}_2$, $\mathbf{w}_3$ v důsledku fixování $\mathbf{w}_1$ (tj. navázání pouze prvního proteinu). Analogický výpočet se provede pro fixované $\mathbf{w}_2$ (pouze druhý protein) a pro fixované $\mathbf{w}_2$ i $\mathbf{w}_1$ (oba proteiny současně). Alosterický efekt je pak dán rozdílem deformační energie pro oba proteiny navázané současně a pro první a druhý vázané samostatně, tj.

$$\Delta E = E^{(1,2)} - E^{(1)} - E^{(2)}. \quad (23)$$

Negativní hodnoty tohoto rozdílu značí kooperativitu (první protein zvyšuje afinitu druhého), kladné hodnoty antikooperativitu, nula nepřítomnost jakékoli vazby.

4. Molekulová dynamika

Kanonický soubor statistické mechaniky, nutný pro parametrizaci výše uvedených mechanických modelů, je aproximován trajektorií molekulové dynamiky v atomistickém rozlišení, s explicitním zahrnutím vody a iontů. Protože simulace molekulové dynamiky (MD) slouží pouze jako zdroj dat a nejsou těžištěm předložené práce, zmíníme se o nich jen stručně.

Simulace molekulové dynamiky v atomovém rozlišení spočívají v numerickém řešení Newtonových pohybových rovnic pro jednotlivé atomy, modelované jako hmotné body³⁰. Meziatomové interakce

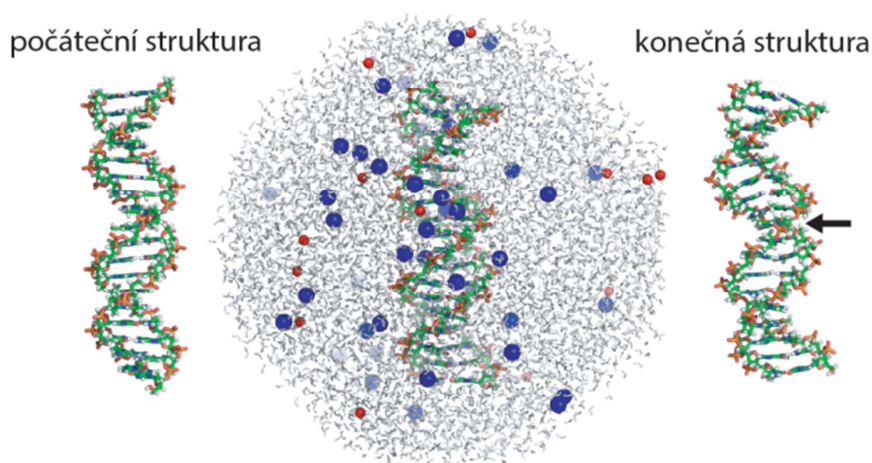
jsou vyjádřeny funkcí potenciální energie (tzv. silové pole, force field), která závisí na souřadnicích všech atomů. Silové pole obvykle zahrnuje příspěvky v důsledku deformace délek vazeb a vazebných úhlů (kvadratické členy), dihedrálních úhlů (pro každý úhel jeden nebo několik členů Fourierovy řady vyjadřující periodický potenciál), jakož i elektrostatické interakce mezi bodovými parciálními náboji na jednotlivých atomech a Lennard-Jonesovy interakce. Podmínku konstantní teploty a tlaku lze aproximovat zavedením vhodného algoritmického termostatu a barostatu. Typická biomolekulární simulace zahrnuje desítky až stovky tisíc atomů. Největší část simulačního času spotřebuje výpočet nevazebných interakcí.

Na počátku je vždy nutné v počítači sestavit simulovaný systém. V případě dvoušroubovice DNA nebo RNA stačí znát sekvenci – výchozí konformace se pak volí pro všechny sekvence stejná, totiž standardní (kanonická) B-DNA, resp. A-RNA. Pro nekanonické motivy RNA je třeba znát strukturu, vzatou obvykle z krystalových dat (např. krystaly ribosomu obsahují řadu RNA motivů). Molekula se pak solvuje, tj. obklopí molekulami vody a ionty. Nukleové kyseliny jsou za fyziologických podmínek záporně nabitě – každý fosfát nese jeden záporný náboj. Je tedy třeba přidat odpovídající počet kationtů (typicky K^+ nebo Na^+), aby byl systém neutrální. Navíc se často přidává další sůl, obvykle ve fyziologické koncentraci 150 mM KCl nebo NaCl. Užívá se oktahedrál ní simulační box, který umožňuje volnou rotaci molekuly. Periodické okrajové podmínky dávají virtuálně nekonečný systém a odstraňují tak povrchové jevy. Navíc jsou nezbytné pro efektivní výpočet elektrostatických interakcí (Ewaldova metoda).

Systém nejprve prochází tzv. ekvilibrací, kdy se v několika cyklech minimalizace energie a krátké molekulové dynamiky odstraní eventuální sterické zábrany či vakuové bubliny v rozpouštědle, vzniklé při sestavování systému. Následuje produkční fáze, tj. volná (unrestrained) molekulová dynamika, většinou za podmínek konstantní (pokojové) teploty a konstantního (atmosférického) tlaku. V pravidelných intervalech se zaznamenávají souřadnice jednotlivých atomů (snapshots). Takto vznikne časová řada struktur, aproximujících kanonický soubor statistické mechaniky. Na každé struktuře lze pak změřit požadované souřadnice a následně analyzovat jejich časové řady. Takto byly např. provedeny a vyhodnoceny simulace souboru oligomerů DNA obsahujících všechny tetranukleotidové sekvence³¹. Momenty souřadnic lze užít pro odhad parametrů mechanických modelů, jak je uvedeno výše²⁸.

Základním předpokladem pro kvalitní simulace je volba vhodného popisu meziatomových interakcí, tj. silového pole^{12, 13}. Skutečné interakce jsou v silovém poli drasticky zjednodušeny a stanovení optimálních parametrů pole (tj. konstant v jednotlivých členech) je velmi obtížnou úlohou. V oboru simulací nukleových kyselin jsou nejkritičtější parametrizace torsních úhlů v páteři. Není proto divu, že vývoj silových polí je předmětem intenzivního zájmu^{32, 33}. Obecně lze doporučit volbu aktuálního, avšak již prověřeného silového pole.

Dalšími limitujícími faktory simulací molekulové dynamiky jsou omezená velikost systému (typicky ne více než asi 30 párů bazí v rovné dvoušroubovici) a dosažitelného simulačního času (jedna nebo několik mikrosekund). Z těchto důvodů je třeba nepodlehnout pokušení příliš dalekosáhlé interpretace výsledků bez uvážení experimentálních skutečností. Podle názoru autora je molekulová dynamika pouze jednou z metod, která v kombinaci a v dialogu s ostatními experimentálními a výpočetními metodami může posunout naše znalosti přírody o krůček dále.



Obr. 7. Ilustrace principu molekulové dynamiky fragmentu DNA. Startovní struktura (vlevo), mající formu kanonické dvoušroubovice B-DNA nezávislé na sekvenci, je solvatována vodou a ionty (modré K⁺, červené Cl⁻) v oktahedrálním periodickém simulačním boxu (uprostřed). Struktura samovolně během simulací přejde do formy charakteristické pro danou sekvenci a z jejích tepelných fluktuací lze odvodit mechanické vlastnosti. Vpravo je poslední struktura celé časové řady, ohnutá do malého žlábků (černá šipka).

5. Aplikace

V tomto oddíle představíme vybrané aplikace uvedené teorie. Nejprve se zaměříme na tematiku mechanických vlastností standardní dvoušroubovice DNA. Větší pozornost budeme věnovat speciálním sekvencím, tzv. A-traktům, které tvoří několik adeninů nebo thyminů za sebou (nesmí však obsahovat podsekvenci TA)³⁴. Mechanika A-traktů má přímé biologické konsekvence. V poslední době přitahují pozornost rovněž jevy alosterie, tj. ovlivnění afinity ligandu vazbou jiného ligandu na vzdáleném místě, zprostředkované DNA³⁵. Mechanický model alosterie, který jsme navrhli, je popsán v další části. Tematiku DNA uzavírají práce o mechanice dvoušroubovice s oxidativním poškozením. V závěru krátce pojednáme o mechanice strukturních motivů RNA.

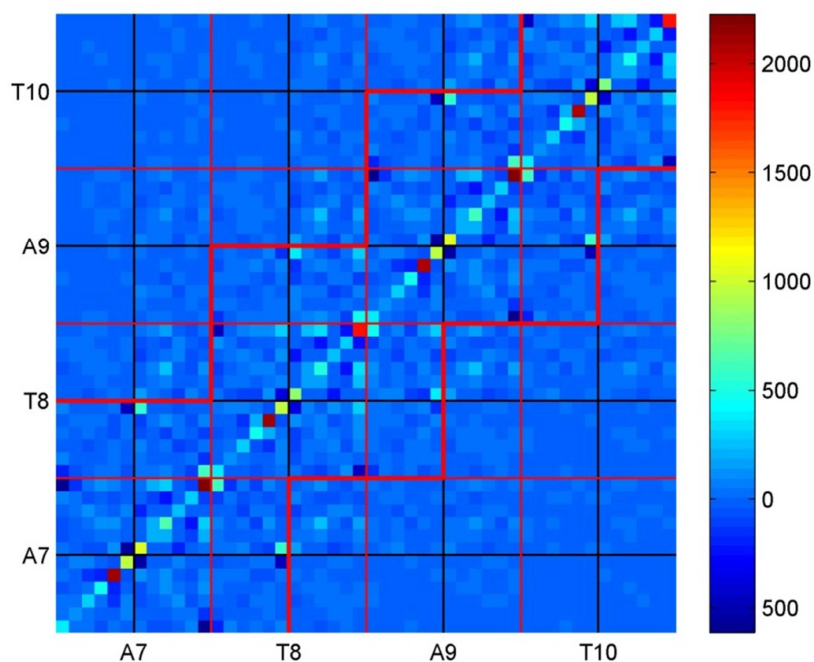
5.1 Sekvenčně závislé mechanické vlastnosti DNA

Naším cílem je přiřadit libovolné sekvenci DNA parametry mechanického modelu na úrovni tuhých bazí – tedy ke každé sekvenci udát její rovnovážnou prostorovou konfiguraci (tj. rovnovážné hodnoty souřadnic jejich bazí) a její tuhostní matici. Pro libovolnou deformaci daného fragmentu DNA lze pak vypočítat příslušnou deformační energii. V tomto modelu jsme omezeni harmonickou aproximací, která však je zcela dostačující pro mnohé biologicky relevantní situace (tvoření smyček, deformace v nukleosomu, sbalování genomu ve virech atd.)

Jelikož báze DNA jsou čtyř druhů (A, G, C a T), lze vytvořit 16 dvojic (často se mluví o dimerech, ačkoli se tím myslí dva po sobě následující páry bazí – daná dvojice bazí v jednom vlákně už s ohledem na komplementaritu určuje dvojici bazí ve druhém vlákně). Někdy tvoří různé dvojice stejný dimer, např. sekvence AA značí stejný dimer jako TT. Vyloučením této redundance dospějeme k deseti unikátním dimerům, které lze rozdělit do tří skupin podle toho, jaké typy bazí jdou za sebou: purin, (tj. A nebo G – značí se R) nebo pyrimidin (tj. C nebo T – značí se Y). Unikátními dimery typu YR jsou např. CG, TA a CA, pro RR můžeme zvolit AG, GG, AA a GA a pro RY AT, AC a GC. Nejjednodušší verze mechanického modelu je založena na předpokladu, že jednotlivé dimery, tak jak jdou v dané sekvenci za sebou, jsou nezávislé (předpoklad lokality). Jinak řečeno, neexistují žádné křížové členy (coupling terms) ve funkci deformační energie, které by obsahovaly zároveň souřadnice dvou různých dimerů. Celková deformační energie je pak součtem deformačních energií všech po sobě následujících dimerů. Podle toho lze tedy mechanické vlastnosti např. sekvence ACTG složit z vlastností dimerů AC, CT (= AG) a TG (= CA). Omezíme-li se na souřadnice mezi páry bazí (inter-basepair, obr. 4), máme určit pro každý unikátní dimer šestici rovnovážných souřadnic a tuhostní matici 6x6. Celkový vektor rovnovážných souřadnic dané sekvence je pak pouze zřetěžením těchto šestic odpovídajících jednotlivým dimerům a celková tuhostní matice je blokově diagonální s bloky 6x6 pro jednotlivé dimery. Na těchto předpokladech byl založen vůbec první odhad strukturních a tuhostních parametrů všech deseti dimerů, publikovaný v roce 1998 na základě analýzy souboru krystalových struktur²⁴. Zde je však třeba doufat, že krystalový soubor reprezentuje kanonický soubor statistické mechaniky, přičemž efektivní teplota tohoto souboru není známa a je třeba ji odhadnout jiným způsobem. Tyto obtíže odpadají v simulacích molekulové dynamiky. Stanovení parametrů pro všech 10 unikátních dimerů ze simulací vybraných oligomerů bylo provedeno v naší práci, uvedené v Příloze 1. Ačkoli předpoklad lokality je dosti radikální, je tento model úspěšný v řadě biologických problémů a parametry z této práce jsou stále užívány v několika zahraničních laboratořích. Nedlouho poté jsme publikovali analogický model (Příloha 2) pro souřadnice v rámci jednotlivých párů (intra-basepair). Zde jsou pouze dva soubory parametrů, odpovídající párům A-T a G-C.

Opuštění předpokladu nezávislých dimerů vede k nelokálnímu modelu, kde jakákoli souřadnice může být vázána (coupled) s jakoukoli jinou – nevylučujeme tedy žádné členy ve funkci deformační energie.

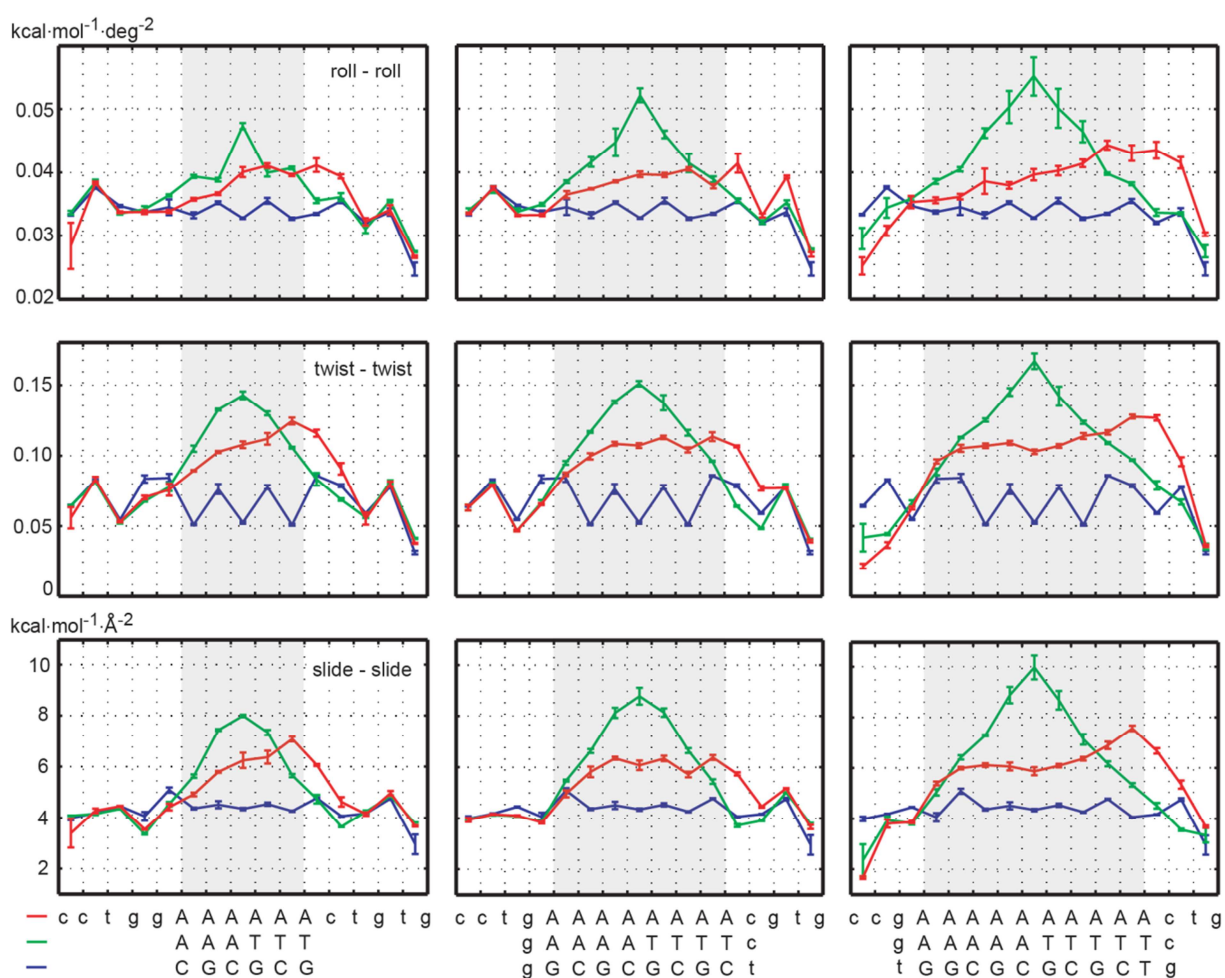
Přitom lze očekávat, že vazba (coupling) mezi souřadnicemi bude největší, jsou-li báze blízko sebe, a bude slabá pro vzdálené báze. Detailní teoretická a výpočetní studie jedné sekvence (Příloha 3) vskutku ukázala, že tuhostní matice sice není blokově diagonální, ale členy se vzdáleností od diagonály rychle klesají.



Obr. 8. Tuhostní matice sekvence $G(TA)_7C$ (výřez střední části). Vyznačené čtvercové bloky 6x6 odpovídají souřadnicím pro jednotlivé páry (intra-basepair) a pro jednotlivé dvojice následujících párů (inter-basepair). Uvažovaná funkce potenciální energie je obecnou kvadratickou formou všech souřadnic, nejsou tedy vyloučeny žádné křížové členy (vazby, couplings) mezi souřadnicemi. Přesto má matice v podstatě pásovou strukturu, kde výrazně nenulové křížové členy jsou soustředěny kolem diagonály. Největší jsou ty, které popisují vazbu mezi danou bází a jejími nejbližšími sousedy (červeně obtažená zóna). Každá báze mimo krajních má 5 nejbližších sousedů – jednoho partnera v páru a 4 báze ve dvou nejbližších okolních párech.

5.2 Mechanický model A-traktů

Právě uvedený nelokální model představuje úplný popis mechanických vlastností dané sekvence na úrovni tuhých bazí a v harmonické aproximaci. Aplikovali jsme jej nejprve na speciální sekvence, tzv. A-trakty. Jsou to sekvence několika (aspoň 4) adeninů a thyminů, které neobsahují dimer TA. A-trakty mají pozoruhodné strukturní vlastnosti, např. velmi vysoký negativní propeler (úhel rotace mezi bázemi v páru podél jeho dlouhé osy, obr. 4) a malý žlábek výrazně se zužující ve směru od 5' k 3' konci adeninové sekvence³⁴. Je-li A-tract vnořen do molekuly DNA s obecnou sekvencí, způsobuje ohyb do malého žlábků, a to asi o 17-21 stupňů na každý A-tract⁹. Struktura A-traktů je dosti studována, ale jejich mechanické vlastnosti zůstávaly dlouho neznámé.

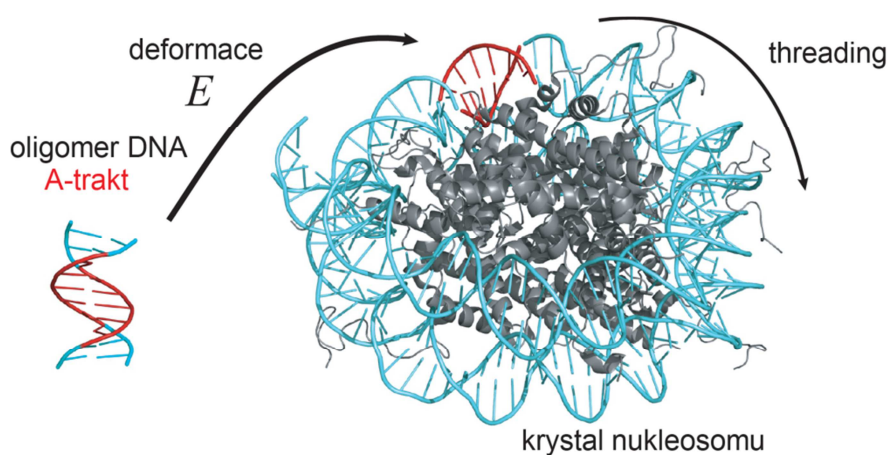


Obr. 9. Diagonální elementy tuhostních matic symetrických (zelená) a nesymetrických (červená) A-traktů, spolu s kontrolní sekvencí neobsahující A-tract (modrá). Symetrické trakty vykazují výraznou nelokalitu – růst tuhosti směrem ke středu traktu.

V naší práci (Příloha 4) jsme se zaměřili na srovnání různých způsobů měření ohybu DNA. Tato problematika má mj. význam pro určení ohybu experimentálních struktur – je známo, že např. krystalové struktury A-traktů dávají v důsledku mezimolekulových kontaktů v krystalu (packing forces) ohyb ve směru kolmém k tomu, který je pozorován v roztoku ³⁴. Naproti tomu převládal názor, že NMR zachycuje ohyb v podstatě správně ³⁶. V práci jsme však ukázali, že některé struktury NMR dávají ohyb A-traktu sice ve správném směru, ale nerealisticky velký.

Další práce (Příloha 5) je již věnována mechanickým vlastnostem A-traktů. Studovali jsme jednak asymetrické trakty o sekvenci A_{2n} , jednak symetrické A_nT_n . Výsledky ukázaly výraznou nelokalitu mechanických vlastností symetrických traktů – diagonální prvky tuhostní matice vzrůstají ke středu traktu, a ani pro nejdelší studovaný trakt A_5T_5 nejeví známky saturace (obr. 9).

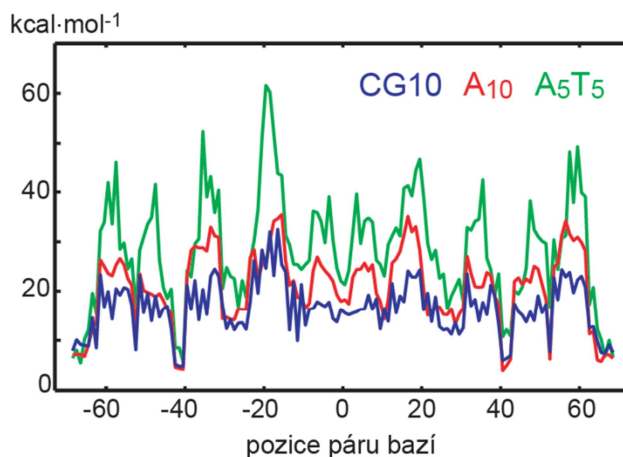
Biologický význam A-traktů spočívá především v jejich schopnosti bránit tvorbě nukleosomů. DNA v buněčném jádře je sbalena pomocí velkých komplexů zvaných nukleosomy, v nichž je 147 párů bází obtočeno v téměř dvou otočkách kolem proteinového (histonového) jádra (obr.10).



Obr. 10. Stanovení deformační energie úseku DNA (A-traktu) v nukleosomu. Úsek je vkládán do DNA na různá místa v komplexu a příslušně deformován (threading). Výsledkem je profil deformační energie jako funkce polohy fragmentu v nukleosomální DNA.

Volná energie tvorby těchto komplexů závisí na sekvenci DNA. Podle současných znalostí je rozhodujícím faktorem mechanická deformabilita DNA – flexibilní sekvence tvoří nukleosomy snáze než sekvence rigidní. A-trakty prakticky nukleosomy vůbec netvoří. Jejich přítomnost v genomu tedy zajišťuje oblast bez nukleosomů, kde je DNA vystavena působení dalších regulačních proteinů ³⁷. Tento mechanismus využívají organismy k jemné regulaci exprese genů. V poslední době byl tento účinek vyvolán i uměle, vsunutím A-traktů do genomu ³⁸. Spekulovalo se, že v pozadí jevu stojí

neobvyklé mechanické vlastnosti A-traktů, ale přímý důkaz chyběl. V naší práci (Příloha 5) jsme mechanický model A-traktu použili k výpočtu jeho deformační energie v nukleosomu. Výsledky ukazují nejen větší deformační energii A-traktů ve srovnání s kontrolní sekvencí, ale naznačují, že symetrické trakty jsou ještě obtížněji deformovatelné než asymetrické, takže by měly bránit vzniku nukleosomů ještě více. Toho by bylo možné využít v budoucích experimentech, kde efekt vyloučení nukleosomů (nucleosome exclusion) by měl být při použití symetrických A-traktů silnější.



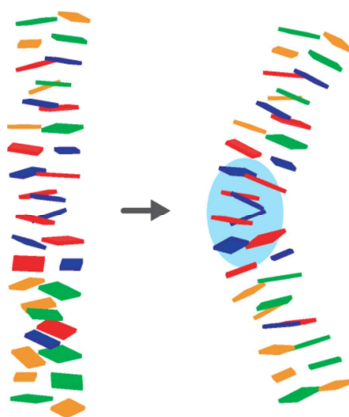
Obr. 11. Deformační energie spojená s vložením A-traktu na různé pozice v nukleosomu. Deformace asymetrického traktu (červená) vyžaduje vyšší energii než kontrolní sekvence (modrá). Symetrický trakt (zelená) má energii ještě vyšší než asymetrický.

5.3 Modelování alosterických jevů

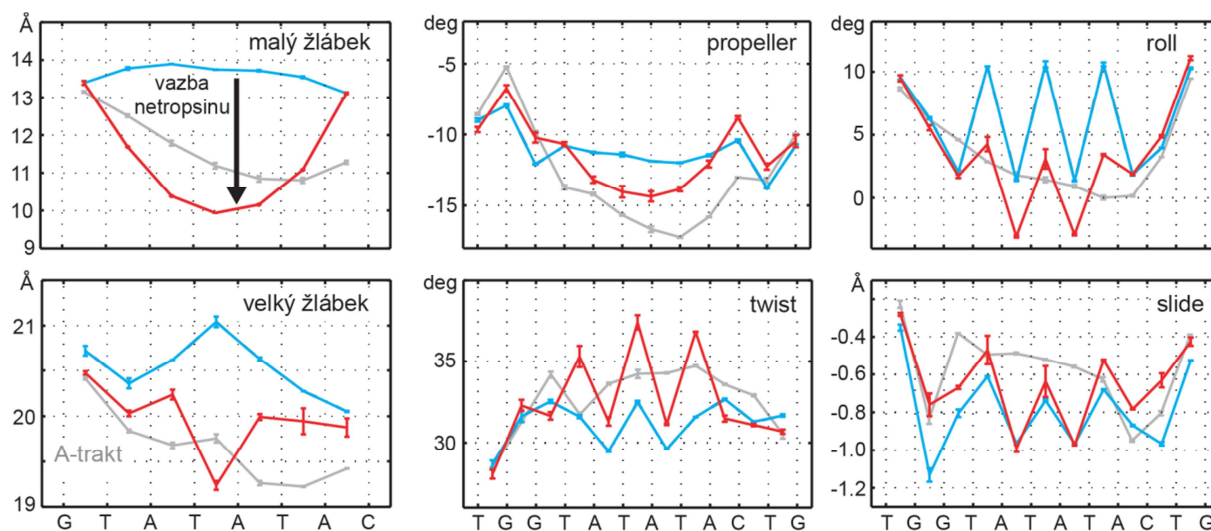
Jev alosterie je velmi dobře znám v oboru proteinů. Spočívá v tom, že ligand změnou svým navázáním vlastností proteinu tak, že dochází k ovlivnění afinity jiného ligandu s vazebným místem vzdáleným od prvního. Ligandy tedy neinteragují přímo, ale pouze účinkem zprostředkujícího proteinu. Méně je známo, že alosterické jevy existují i v oboru DNA³⁹⁻⁴¹. Jeden ligand změnou svým navázáním strukturu a mechanické vlastnosti DNA, což ovlivní afinitu jiného ligandu (obr. 12). Tento efekt má použití při vývoji léčiv, kde první ligand se často váže do malého žlábků (jde typicky o diaminy nebo pyrolimidazolové sloučeniny). Změněná struktura a flexibilita dvoušroubovice DNA pak působí inhibičně na dané patologické procesy.

Pro popis tohoto jevu jsme rozšířili mechanický model o další skupinu souřadnic, definující šířky žlábků (Příloha 6). Vazba prvního ligandu je modelována fixováním (constraining) souřadnic ve vazebném místě na hodnoty známé ze struktury komplexu. Ostatní, nefixované souřadnice pak nabývají svých energeticky optimálních hodnot v souladu s touto vazbou (constraint). Takto jsme

modelovali efekt vazby netropsinu k sekvenci TATATA a předpověděli, že netropsin zdeformuje tuto sekvenci neobsahující A-trakt do tvaru, který je velmi podobný skutečnému A-traktu (obr. 13). Jde tedy o způsob jistého strukturního mimikry jen s pomocí malého ligandu. Ohyb předpovězené struktury je v kvantitativní shodě s experimentálními daty³⁹.

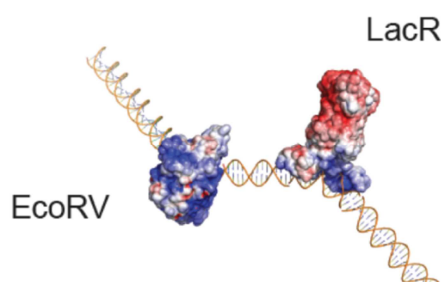


Obr. 12. Princip alosterie v DNA. Navázání ligandu (modrá oblast) změní strukturu a deformabilitu dvoušroubovice, což ovlivní afinitu dalších ligandů.

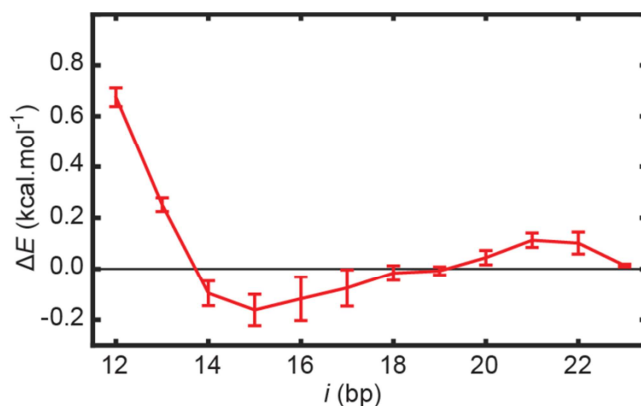


Obr. 13. Navázání netropsinu zúží malý žlábek, ostatní souřadnice pak relaxují tím způsobem, že výsledný komplex (červená) je strukturně podobný A-traktu (šedá), ačkoli daná sekvence A-trakt neobsahuje a v nepřítomnosti ligandu mu není vůbec podobná (modrá).

Další aplikací mechanického modelu alosterie je popis elastické interakce mezi dvěma proteiny vázanými na DNA (Příloha 7). Proteiny jsou tak daleko, že nemohou interagovat přímo, přesto vazba jednoho ovlivňuje afinitu druhého (obr. 14). Experimentálně pozorovaný efekt ³⁵ se mění z kooperativního na antikooperativní se vzdáleností mezi proteiny, a to periodou asi 10 párů bazí, tj. s helikální periodou DNA, a vyhasíná, jak se proteiny vzdalují. Tomu odpovídá i předpovězený energetický profil (obr. 15). Na rozdíl od experimentu však model poskytuje i detaily příslušných strukturních změn.



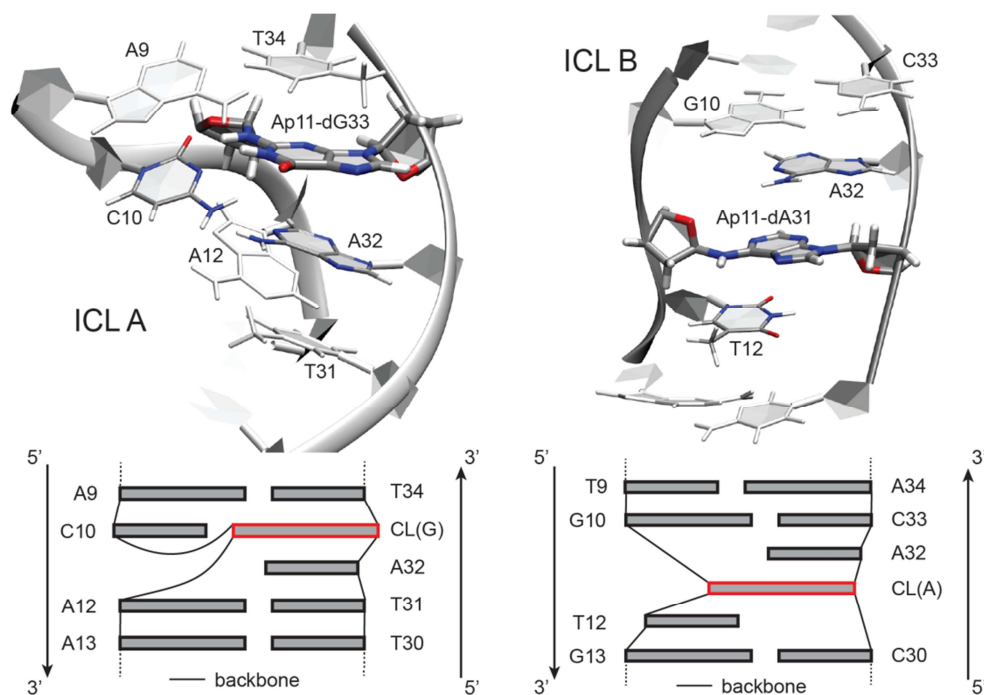
Obr. 14. Schematické znázornění elastické vazby mezi dvěma proteiny prostřednictvím DNA spojující jejich vazebná místa.



Obr. 15. Energetický rozdíl vazby druhého proteinu za přítomnosti a bez přítomnosti prvního. Nulová hodnota značí absenci kooperativity – proteiny se neovlivňují. Zde ale míra kooperativity kolísá s periodou 10 párů bazí pozorovanou i experimentálně a vyhasíná se vzdáleností proteinů. Energetické změny jsou poměrně malé, přesto je model dokáže zachytit.

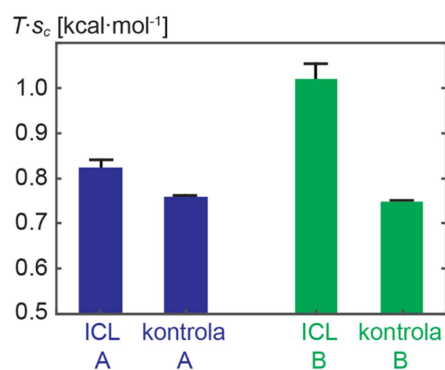
5.4 Mechanické vlastnosti poškozené DNA

Oxidativní poškození vede k celé řadě strukturních anomálií v dvoušroubovici DNA, jako jsou abazická místa nebo nově vzniklé kovalentní vazby v daném vlákně (intrastrand cross-link) či mezi vlákny (interstrand cross-link). Taková místa mohou mít neobvyklé mechanické vlastnosti, což pak ovlivňuje biologickou funkci DNA. Rovněž proteiny určené k opravě mohou vyhledávat tato poškození na základě jejich mechanických charakteristik. Naše studie (Příloha 8) vzniklá ve spolupráci se skupinou Elise Dumontové (ENS Lyon, Francie) se zaměřila na dvě zdánlivě příbuzné varianty kovalentní struktury spojující obě vlákna (interstrand cross-link), kde v jedné se vazby účastní guanin (ICL A), ve druhé adenin (ICL B, obr. 16). Rozsáhlé kvantové výpočty provedené E. Dumontovou se spolupracovníky doplňují simulace molekulové dynamiky a analýza mechanických vlastností. Ačkoli se vazby účastní v obou případech purin, vede každý systém ke zcela odlišné struktuře (obr. 16), které odpovídá i zcela odlišná mechanika.



Obr. 16. Struktury a schematická znázornění interakcí studovaných oxidativních poškození DNA, zahrnujících vznik nové kovalentní vazby (cross-link) mezi oběma vlákny.

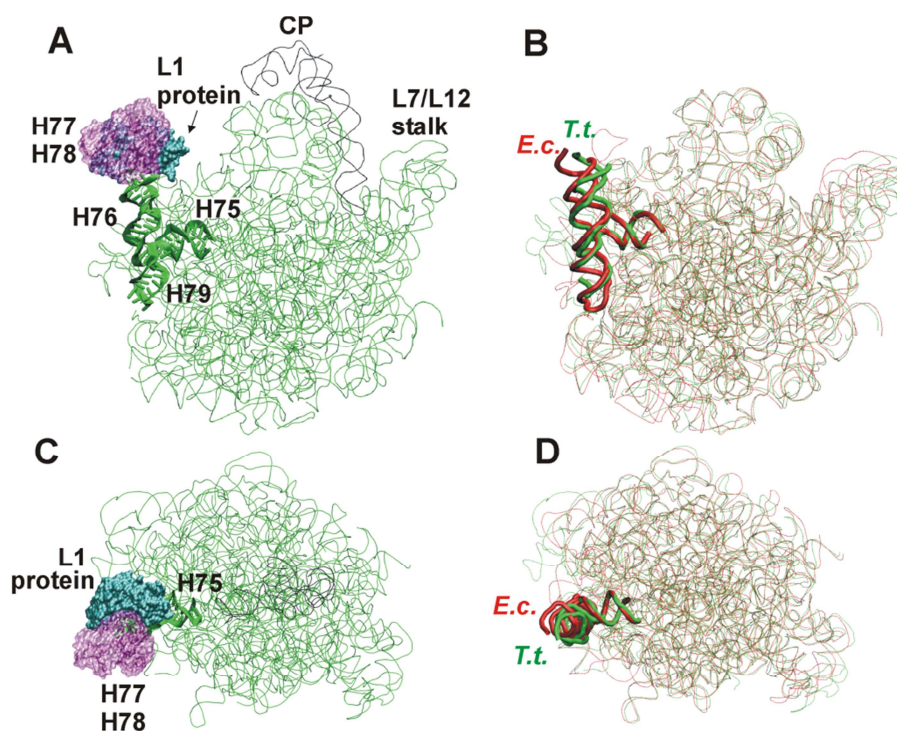
Zatímco tuhost ICL A se téměř neliší od kontrolního duplexu, je ICL B podstatně flexibilnější (obr. 17). Tato větší flexibilita zajišťuje entropickou stabilizaci dané struktury a tím přispívá k větší výtěžnosti oxidativní reakce ve srovnání s ICL A, pozorované experimentálně⁴².



Obr. 17. Entropie struktur s oxidativním poškozením z obr. 16.

5.5 Mechanika strukturních motivů RNA

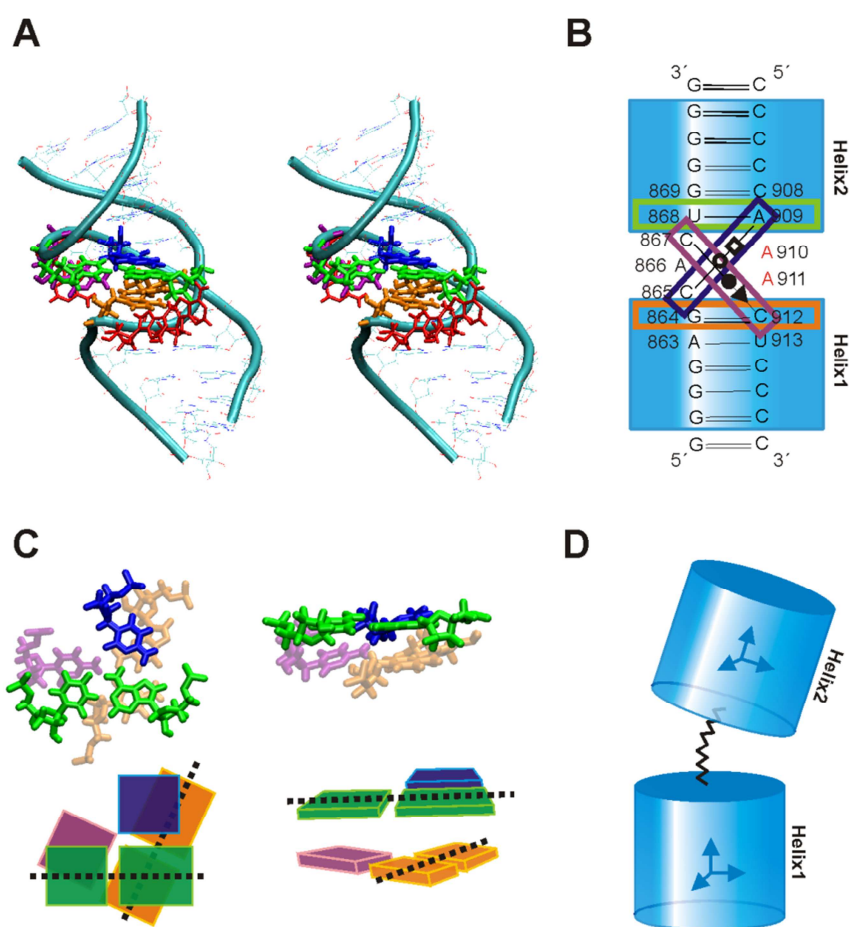
Obdobný přístup jako v případě DNA lze použít i pro studium mechaniky strukturních prvků RNA. Jde typicky buďto o kratší dvoušroubovice nebo o různé nehelikální (nekanonické) motivy. První uvedená práce (Příloha 9) se týká vlastností důležitého pohyblivého prvku v ribosomu, tzv. L1 stalku (obr. 18), který reguluje posun RNA při syntéze proteinů⁴³ Struktura je tvořena spojením tří helixů (three-way junction), k němuž je připojen jeden z ribosomálních proteinů.



Obr. 18. Struktura L1 stalku a jeho umístění v ribosomu.

Mechanický model parametrizovaný ze simulací molekulové dynamiky prokázal, že flexibilita L1 stalku není jen důsledkem flexibility v místě, kde se helixy spojují, ani jen výsledkem flexibility samotného helixu nesoucího protein, jak se dříve spekulovalo. Oba příspěvky jsou podstatné, přičemž spojení helixů přispívá asi 25-40 procenty k celkové variabilitě v ohybu (podle druhu organismu).

Druhá zde uvedená práce (Příloha 10) je zaměřena na studium vlastností jiného důležitého motivu, tzv. C-loopu, vyskytujícího se na třech místech v ribosomu a užívaného i jako stavební prvek v nanostrukturách RNA ⁴⁴. Jde o nekanonický motiv tvořený dvěma trojicemi bazí a obklopený na obou stranách krátkými helixy (obr. 19).



Obr. 19. Struktura C-loopu, nekanonického motivu RNA. V mechanickém modelu je každý z helixů obklopujících motiv representován jako tuhé těleso.

Pro popis mechanických vlastností C-loopu, do té doby zcela neznámých, jsme použili model, v němž každý z helixů je nahrazen tuhým tělesem. Konstrukce těchto efektivních tuhých těles je založena na průměrování polohy a orientace bazí v helixu, jak je popsáno výše. Nekanonický motiv mezi oběma

helixy zprostředkuje jejich efektivní interakci, tj. chová se jako pružina. Uvažujeme všech šest stupňů volnosti popisujících relativní posunutí a rotaci jednoho tělesa vzhledem k druhému. Model je opět parametrizován z volných (unrestrained) simulací molekulové dynamiky. Výsledky ukazují, že efektivní tuhost motivu se příliš neliší od tuhosti běžného helixu, přestože vzájemné pootočení helixů (twist) je mnohem větší než u běžné dvoušroubovice. Funkcí tohoto motivu je tedy adjustace vzájemné polohy helixů bez snížení mechanické tuhosti, což lze využít i v návrhu nanostruktur.

6. Závěr

Předložená práce se zaměřuje na studium mechanických vlastností molekulárních systémů, konkrétně nukleových kyselin, výpočetními metodami. Mikroskopická velikost systému umožňuje stanovení těchto vlastností bez nutnosti vnucené deformace, pouhou analýzou tepelně vybuzených strukturních fluktuací. Soubory statistické mechaniky pro tuto analýzu jsou generovány standardními simulacemi molekulové dynamiky v atomovém rozlišení. V práci jsou nejprve zformulovány vhodné mechanické modely a pak na příkladech ukázána jejich aplikace. Studované problémy zahrnují A-trakty DNA a jejich vliv na tvorbu nukleosomů, alosterické jevy v DNA nebo vlastnosti strukturních motivů RNA významné v biologii i v nanotechnologických aplikacích. V budoucnu by se chtěl autor věnovat jednak problémům zahrnutí anharmonických jevů, jednak modelům založeným na spojování prvků jako jsou tyto do větších celků.

Seznam použité literatury

- (1) Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P., *Molecular biology of the cell*. 5th ed.; Garland Science: New York, 2008.
- (2) Saenger, W., *Principles of nucleic acid structure*. Springer-Verlag: New York, 1984.
- (3) Leontis, N. B.; Lescaute, A.; Westhof, E., The building blocks and motifs of RNA architecture. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2006**, *16*, 279-287.
- (4) Douglas, S. M.; Dietz, H.; Liedl, T.; Hogberg, B.; Graf, F.; Shih, W. M., Self-assembly of DNA into nanoscale three-dimensional shapes. *Nature* **2009**, *459*, 414-418.
- (5) Guo, P., The emerging field of RNA nanotechnology. *Nature Nanotech.* **2010**, *5*, 833-842.
- (6) Geary, C.; Rothmund, P. W. K.; Andersen, E. S., A single-stranded architecture for cotranscriptional folding of RNA nanostructures. *Science* **2014**, *345*, 799-804.
- (7) Neidle, S., *Principles of Nucleic Acid Structure*. Elsevier: Amsterdam, 2008.

- (8) Fu, J.; Munro, J. B.; Blanchard, S. C.; Frank, J., Cryoelectron microscopy structures of the ribosome complex in intermediate states during tRNA translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 4817-4821.
- (9) Koo, H.-S.; Drak, J.; Rice, J. A.; Crothers, D. M., Determination of the extent of DNA bending by an adenine-thymine tract. *Biochemistry* **1990**, *29*, 4227-4234.
- (10) Geggier, S.; Vologodskii, A., Sequence dependence of DNA bending rigidity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 15421-15426.
- (11) Lipfert, J.; Skinner, G. M.; Keegstra, J. M.; Hensgens, T.; Jager, T.; Dulin, D.; Korber, M.; Yu, Z.; Donkers, S. P.; Chou, F. C.; Das, R.; Dekker, N. H., Double-stranded RNA under force and torque: Similarities to and striking differences from double-stranded DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 15408-15413.
- (12) Perez, A.; Luque, F. J.; Orozco, M., Frontiers in molecular dynamics simulations of DNA. *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 196-205.
- (13) Sponer, J.; Banas, P.; Jurecka, P.; Zgarbova, M.; Kuhrova, P.; Havrila, M.; Krepl, M.; Stadlbauer, P.; Otyepka, M., Molecular dynamics simulations of nucleic acids. From tetranucleotides to the ribosome. *J. Phys. Chem. Lett.* **2014**, *5*, 1771-1782.
- (14) Olson, W. K.; Bansal, M.; Burley, S. K.; Dickerson, R. E.; Gerstein, M.; Harvey, S. C.; Heinemann, U.; Lu, X.-J.; Neidle, S.; Shakked, Z.; Sklenar, H.; Suzuki, M.; Tung, C.-S.; Westhof, E.; Wolberger, C.; Berman, H. M., A standard reference frame for the description of nucleic acid base-pair geometry. *J. Mol. Biol.* **2001**, *313*, 229-237.
- (15) Dickerson, R. E.; Bansal, M.; Calladine, C. R.; Diekmann, S.; Hunter, W. N.; Kennard, O.; Lavery, R.; Nelson, H. C. M.; Olson, W. K.; Saenger, W.; Shakked, Z.; Sklenar, H.; Soumpasis, D. M.; Tung, C.-S.; von Kitzing, E.; Wang, A. H.-J.; Zhurkin, V. B., Definitions and nomenclature of nucleic acid structure parameters. *J. Mol. Biol.* **1989**, *205*, 787-791.
- (16) Lankas, F.; Spackova, N.; Moakher, M.; Enkhbayar, P.; Sponer, J., A measure of bending in nucleic acids structures applied to A-tract DNA. *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 3414-3422.
- (17) Drsata, T.; Reblova, K.; Besseova, I.; Sponer, J.; Lankas, F., rRNA C-loops: Mechanical properties of a recurrent structural motif. *J. Chem. Theory Comput.* **2017**, *13*, 3359-3371.
- (18) Svozil, D.; Kalina, J.; Omelka, M.; Schneider, B., DNA conformations and their sequence preferences. *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, 3690-3706.
- (19) Lu, X.-J.; Olson, W. K., 3DNA: a software package for the analysis, rebuilding and visualization of three-dimensional nucleic acid structures. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 5108-5121.
- (20) Lavery, R.; Moakher, M.; Maddocks, J. H.; Petkeviciute, D.; Zakrzewska, K., Conformational analysis of nucleic acids revisited: Curves+. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 5917-5929.
- (21) Moakher, M., Means and averaging in the group of rotations. *SIAM J. Matrix Anal. Appl.* **2002**, *24*, 1-16.

- (22) Heddi, B.; Foloppe, N.; Bouchemal, N.; Hantz, E.; Hartmann, B., Quantification of DNA BI/BII backbone states in solution. Implications for DNA overall structure and recognition. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 9170-9177.
- (23) El Hassan, M. A.; Calladine, C. R., Two distinct modes of protein-induced bending in DNA. *J. Mol. Biol.* **1998**, *282*, 331-343.
- (24) Olson, W. K.; Gorin, A. A.; Lu, X.-J.; Hock, L. M.; Zhurkin, V. B., DNA sequence-dependent deformability deduced from protein-DNA crystal complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 11163-11168.
- (25) Lankas, F.; Sponer, J.; Langowski, J.; Cheatham III, T. E., DNA basepair step deformability inferred from molecular dynamics simulations. *Biophys. J.* **2003**, *85*, 2872-2883.
- (26) Lankas, F.; Gonzalez, O.; Heffler, L. M.; Stoll, G.; Moakher, M.; Maddocks, J. H., On the parameterization of rigid base and basepair models of DNA from molecular dynamics simulations. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11*, 10565-10588.
- (27) Harpole, K. W.; Sharp, K. A., Calculation of configurational entropy with a Boltzmann-quasiharmonic model: The origin of high-affinity protein-ligand binding. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 9461-9472.
- (28) Drsata, T.; Lankas, F., Theoretical models of DNA flexibility. *WIREs Comput. Mol. Sci.* **2013**, *3*, 355-363.
- (29) Drsata, T.; Zgarbova, M.; Spackova, N.; Jurecka, P.; Sponer, J.; Lankas, F., Mechanical model of DNA allostery. *J. Phys. Chem. Lett.* **2014**, *5*, 3831-3835.
- (30) Allen, M. P.; Tildesley, D. J., *Computer simulation of liquids*. Clarendon Press: Oxford, 1987.
- (31) Pasi, M.; Maddocks, J. H.; Beveridge, D. L.; Bishop, T. C.; Case, D. A.; Cheatham III, T. E.; Dans, P. D.; Jayaram, B.; Lankas, F.; Laughton, C. A.; Mitchell, J.; Osman, R.; Orozco, M.; Perez, A.; Petkeviciute, D.; Spackova, N.; Sponer, J.; Zakrzewska, K.; Lavery, R., μ ABC: a systematic microsecond molecular dynamics study of tetranucleotide sequence effects in B-DNA. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, 12272-12283.
- (32) Zgarbova, M.; Sponer, J.; Otyepka, M.; Cheatham III, T. E.; Galindo-Murillo, R.; Jurecka, P., Refinement of the sugar-phosphate backbone torsion beta for Amber force fields improves the description of Z- and B-DNA. *J. Chem. Theory Comput.* **2015**, *11*, 5723-5736.
- (33) Ivani, I.; Dans, P. D.; Noy, A.; Perez, A.; Faustino, I.; Hospital, A.; Walther, J.; Andrio, P.; Goni, R.; Balaceanu, A.; Portella, G.; Battistini, F.; Gelpi, J. L.; Gonzalez, C.; Vendruscolo, M.; Laughton, C. A.; Harris, S. A.; Case, D. A.; Orozco, M., Parmbsc1: a refined force field for DNA simulations. *Nat. Methods* **2016**, *13*, 55-58.
- (34) Haran, T. E.; Mohanty, U., The unique structure of A-tracts and intrinsic DNA bending. *Q. Rev. Biophys.* **2009**, *42*, 41-81.
- (35) Kim, S.; Brostromer, E.; Xing, D.; Jin, J.; Chong, S.; Ge, H.; Wang, S.; Gu, C.; Yang, L.; Gao, Y. Q.; Su, X.; Sun, Y.; Xie, X. S., Probing allostery through DNA. *Science* **2013**, *339*, 816-819.

- (36) Stefl, R.; Wu, H.; Ravindranathan, S.; Sklenar, V.; Feigon, J., DNA A-tract bending in three dimensions: Solving the dA₄T₄ vs. dT₄A₄ conundrum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 1177-1182.
- (37) Kaplan, N.; Moore, I. K.; Fondufe-Mittendorf, Y.; Gossett, A. J.; Tillo, D.; Field, Y.; LeProust, E. M.; Hughes, T. R.; Lieb, J. D.; Widom, J.; Segal, E., The DNA-encoded nucleosome organization of a eukaryotic genome. *Nature* **2009**, *458*, 352-366.
- (38) Raveh-Sadka, T.; Levo, M.; Shabi, U.; Shany, B.; Keren, L.; Lotan-Pompan, M.; Zeevi, D.; Sharon, D.; Weinberger, A.; Segal, E., Manipulating nucleosome disfavoring sequences allows fine-tune regulation of gene expression in yeast. *Nature Gen.* **2012**, *44*, 743-750.
- (39) Tevis, D. S.; Kumar, A.; Stephens, C. E.; Boykin, D. W.; Wilson, W. D., Large, sequence-dependent effects on DNA conformation by minor groove binding compounds. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 5550-5558.
- (40) Chenoweth, D. M.; Dervan, P. B., Allosteric modulation of DNA by small molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 13175-13179.
- (41) Moretti, R.; Donato, L. J.; Brezinski, M. L.; Stafford, R. L.; Hoff, H.; Thorson, J. S.; Dervan, P. B.; Ansari, A. Z., Targeted chemical wedges reveal the role of allosteric DNA modulation in protein-DNA assembly. *ACS Chem. Biol.* **2008**, *3*, 220-229.
- (42) Price, N. E.; Catalano, M. J.; Liu, S.; Wang, Y.; Gates, K. S., Interstrand DNA-DNA cross-link formation between adenine residues and abasic sites in duplex DNA. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 3483-3490.
- (43) Agirrezabala, X.; Lei, J. L.; Brunelle, J. L.; Ortiz-Meoz, R. F.; Green, R.; Frank, J., Visualization of the Hybrid State of tRNA Binding Promoted by Spontaneous Ratcheting of the Ribosome. *Mol. Cell* **2008**, *32*, 190-197.
- (44) Lescoute, A.; Leontis, N. B.; Massire, C.; Westhof, E., Recurrent structural RNA motifs, isostericity matrices and sequence alignments. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 2395-2409.

Seznam příložených publikací

1. Lankaš, F., Šponer, J., Langowski, J. and Cheatham III, T.E. (2003) DNA basepair step deformability inferred from molecular dynamics simulations. *Biophys. J.*, **85**, 2872-2883.
2. Lankaš, F., Šponer, J., Langowski, J. and Cheatham III, T.E. (2004) DNA deformability at the base pair level. *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 4124-4125.
3. Lankaš, F., Gonzalez, O., Heffler, L.M., Stoll, G., Moakher, M. and Maddocks, J.H. (2009) On the parameterization of rigid base and basepair models of DNA from molecular dynamics simulations. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **11**, 10565-10588.
4. Lankaš, F., Špačková, N., Moakher, M., Enkhbayar, P. and Šponer, J. (2010) A measure of bending in nucleic acids structures applied to A-tract DNA. *Nucleic Acids Res.*, **38**, 3414-3422.
5. Dršata, T., Špačková, N., Jurečka, P., Zgarbová, M., Šponer, J. and Lankaš, F. (2014) Mechanical properties of symmetric and asymmetric DNA A-tracts: Implications for looping and nucleosome positioning. *Nucleic Acids Res.*, **42**, 7383-7394.
6. Dršata, T., Zgarbová, M., Špačková, N., Jurečka, P., Šponer, J. and Lankaš, F. (2014) Mechanical model of DNA allostery. *J. Phys. Chem. Lett.*, **5**, 3831-3835.
7. Dršata, T., Zgarbová, M., Jurečka, P., Šponer, J. and Lankaš, F. (2016) On the use of molecular dynamics simulations for probing allostery through DNA. *Biophys. J.*, **110**, 874-876.
8. Bignon, E., Dršata, T., Morell, C., Lankaš, F. and Dumont, E. (2017) Interstrand cross-linking implies contrasting structural consequences for DNA: insights from molecular dynamics. *Nucleic Acids Res.*, **45**, 2188-2195.
9. Réblová, K., Šponer, J. and Lankaš, F. (2012) Structure and mechanical properties of the ribosomal L1 stalk three-way junction. *Nucleic Acids Res.*, **40**, 6290-6303.
10. Dršata, T., Réblová, K., Beššeová, I., Šponer, J. and Lankaš, F. (2017) rRNA C-loops: Mechanical properties of a recurrent structural motif. *J. Chem. Theory Comput.*, **13**, 3359-3371.