

ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΜΙΚΡΩΝ ΚΥΚΛΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ DNA (MINICIRCLES) ΣΕ ΑΡΑΙΑ ΥΔΑΤΙΚΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ: ΛΕΠΤΟΜΕΡΗΣ ΑΤΟΜΙΣΤΙΚΗ ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΔΥΝΑΜΙΚΗΣ

Τ. Αλεξίου^{1,2}, Δ. Τσαλίκης^{1,2}, Π. Αλατάς^{1,2}, Β. Μαυραντζάς^{1,2,3,*}

¹Τμήμα Χημικών Μηχανικών, Πανεπιστήμιο Πατρών, Ελλάδα

²Ινστιτούτο Επιστημών Χημικής Μηχανικής (ΙΕΧΜΗ), Ίδρυμα Τεχνολογίας & Έρευνας (ΙΤΕ)

³Particle Technology Laboratory, Department of Mechanical and Process Engineering, ETH Zürich, Sonneggstrasse 3, Zürich 8092, Switzerland

(*vlasias@chemeng.upatras.gr, vlasiosm@mat.ethz.ch)

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία διεξήχθησαν λεπτομερείς προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής (Μ.Δ.) ατομιστικής λεπτομέρειας αραιών διαλυμάτων μικρών κυκλικών μορίων DNA (τα λεγόμενα minicircles) με τη βοήθεια μοριακών δυναμικών τελευταίας γενιάς της οικογένειας AMBER ειδικά τροποποιημένων για το DNA, όπως το PARMBSC1.^[1] Οι τροχιές Μ.Δ. που ελήφθησαν (από σχετικά μεγάλης διάρκειας προσομοιώσεις) αναλύθηκαν ενδελεχώς για τον υπολογισμό τοπικών ιδιοτήτων διαμόρφωσης όπως και των πιο σημαντικών ιδιοτήτων μεταφοράς (π.χ., συντελεστής διάχυσης). Παρατηρήθηκε πολύ καλή συμφωνία των προβλεπόμενων τιμών της κατανομής των διεδρων γωνιών κατά μήκος του σκελετού των αλυσίδων DNA σε σύγκριση με αντίστοιχα πειραματικά δεδομένα, τεκμηριώνοντας τη μοναδική ικανότητα του νέου δυναμικού PARMBSC1 να περιγράφει σωστά τη διαμόρφωση της διπλής έλικας του DNA. Στην παρούσα εργασία, ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε στον υπολογισμό της μέσης γυροσκοπικής ακτίνας, του συντελεστή διάχυσης του κέντρου μάζας και του ιξώδους μηδενικού ρυθμού διάτμησης των διαλυμάτων, καθώς και της εξάρτησής τους από το μοριακό μήκος, τη μοριακή συγκέντρωση και την ιοντική ισχύ.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το ερευνητικό ενδιαφέρον για τη μελέτη της διαμόρφωσης και των ιδιοτήτων κυκλικών πολυμερών έχει ενταθεί τα τελευταία χρόνια καθώς κυκλικά μακρομόρια ενέχονται σε πληθώρα φυσικών διεργασιών και τεχνολογικών εφαρμογών, όπως για παράδειγμα: η ρεολογία πολυμερών, η επιστήμη υλικών, αλλά και η βιολογία και βιοτεχνολογία, όπου κυκλικά μακρομόρια ποικίλης χημικής σύστασης τόσο βιολογικά (π.χ., πλασμίδια DNA) όσο και συνθετικά (π.χ., πολυαιθυλενοξειδίο) τυγχάνουν ευρείας εφαρμογής. Βιο-πολυμερή όπως το DNA ή τα χρωμοσώματα απαντώνται συχνά σε κυκλική διαμόρφωση (τοπολογικά περιορισμένη) μέσα στο κυτταρόπλασμα, και επιπλέον τυγχάνουν μεγάλης χρήσης σε εφαρμογές ηλεκτροφορητικού διαχωρισμού και ενζυμολογίας, σε τεχνικές δομικής σταθεροποίησης συνθετικά παρασκευαζόμενων πρωτεϊνών, όπως και σε συστήματα στοχευμένης μεταφοράς φαρμακευτικών ουσιών.^[2-4] Θεμελιώδους σημασίας για τις δυναμικές και ρεολογικές ιδιότητες των διαλυμάτων DNA τα οποία ενέχονται στις ανωτέρω φυσικές διεργασίες και τεχνολογικές εφαρμογές είναι ο ρόλος της μοριακής αρχιτεκτονικής.

Η πρόοδος στις πειραματικές τεχνικές μικρο-ρεολογίας και μικρο-ρευστονικών συσκευών έχει επιτρέψει την απ' ευθείας μικροσκοπική παρατήρηση της δυναμικής συμπεριφοράς μονήρων μορίων DNA σε πραγματικό χρόνο, για μόρια γραμμικής και κυκλικής αρχιτεκτονικής, τόσο σε συνθήκες αραιής συγκέντρωσης όσο και σε συνθήκες υψηλής συγκέντρωσης, στο όριο εμφάνισης τοπολογικά διαπλεγμένων δομών.^[5-6] Οι πρώτες πειραματικές μελέτες της δυναμικής συμπεριφοράς κυκλικών μορίων DNA αποκάλυψαν μια συσχέτιση τύπου εκθετικού νόμου (power law) μεταξύ του συντελεστή αυτοδιάχυσης του κέντρου μάζας του μορίου και του μοριακού

βάρους,^[7] $D \sim L^{-\nu}$, με εκθέτη $\nu = 0.5$ για θ-διαλύτες και $\nu = 0.588$ για καλούς διαλύτες.^[8] Λόγω του τοπολογικού περιορισμού της συνένωσης των μοριακών αλυσίδων σε μορφολογία κλειστού βρόγχου, όπως και της συνεπαγόμενης πιο συμπαγούς διαμόρφωσης, τα κυκλικά μόρια σε συνθήκες αραιού διαλύματος παρατηρήθηκαν να διαχέονται πιο γρήγορα σε σχέση με τα γραμμικά μόρια αντίστοιχου μοριακού μήκους, με το λόγο των αντιστοιχών συντελεστών διάχυσης να ισούται με 1.32.

Πρόσφατα έχουν αναπτυχθεί προηγμένες πειραματικές τεχνικές παρακολούθησης της συνολικής επιφάνειας διαχεομένων μορίων (cumulative area tracking) και έχουν εφαρμοστεί για τη μέτρηση ρυθμών διάχυσης και χρόνων χαλάρωσης γραμμικών και κυκλικών μορίων DNA τα οποία έχουν σημειωθεί με κατάλληλα φθορίζοντα μόρια. Τεχνικές αυτού του τύπου έχουν εφαρμοστεί από τους Habuchi και συνεργάτες^[9-10] για τη διεξοδική μελέτη των μηχανισμών χαλάρωσης σε διαλύματα διαπλεγμένων μορίων DNA, γραμμικών και κυκλικών, επιβεβαιώνοντας τα ευρήματα προηγούμενων εργασιών αναφορικά με την εξάρτηση του συντελεστή διάχυσης του κέντρου μάζας με το μοριακό μήκος.^[7] Επιπρόσθετα, και αναφορικά με τη μεταφορική κίνηση των μορίων για την περίπτωση πολύ αραιών διαλυμάτων, καθώς και για την περίπτωση διαλυμάτων υψηλής συγκέντρωσης στο όριο της εμφάνισης διαπλοκών και για μεγάλους χρόνους παρατήρησης, παρατηρήθηκε μια δισδιάστατη τυχαία κίνηση ομαλής διάχυσης, και ποιοτική συμφωνία με το θεωρητικό μοντέλο τύπου “πλεγματικών οντοτήτων” (“lattice animal”).^[11]

Συνολικά, οι πειραματικές τεχνικές παρατήρησης μονήρων μορίων DNA έχουν συνεισφέρει σημαντικά στη θεμελιώδη κατανόηση της δυναμικής συμπεριφοράς του DNA σε περιβάλλον διαλύτη. Ωστόσο, και παρά τη σημαντική πρόοδο, εγγενείς πειραματικοί περιορισμοί σε σχέση με τη μελέτη της λεπτομερούς δομής της διπλής έλικας σε ατομιστικό επίπεδο^[10] δυσχεραίνουν την αποσαφήνιση των αλληλεπιδράσεων διαλελυμένου μορίου-διαλύτη και τη λεπτομερή μελέτη της επίδρασης της μικροσκοπικής μοριακής διαμόρφωσης στις μακροσκοπικές ιδιότητες μεταφοράς. Οι ατομιστικές προσομοιώσεις παρέχουν μια ελκυστική εναλλακτική οδό για τη λεπτομερή μελέτη των εν λόγω συστημάτων σε ατομιστικό επίπεδο.

Στόχος της παρούσας εργασίας είναι η διερεύνηση των μοριακών προσομοιώσεων ως εργαλείο για την κατανόηση των δομικών και δυναμικών ιδιοτήτων διαλελυμένων κυκλικών μορίων DNA, καθώς και για τη διερεύνηση της επίδρασης παραμέτρων όπως η μοριακή συγκέντρωση και το μοριακό μήκος (αριθμός ζευγών βάσεων) σε αυτές τις ιδιότητες.

ΜΟΡΙΑΚΟ ΜΟΝΤΕΛΟ ΚΑΙ ΥΠΟ ΜΕΛΕΤΗ ΜΟΡΙΑΚΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ

Στην παρούσα ενότητα παρουσιάζονται λεπτομέρειες για τα συστήματα που προσομοιώθηκαν και το μοριακό μοντέλο που εφαρμόστηκε για την περιγραφή των μοριακών αλληλεπιδράσεων. Αρχικές μοριακές διαμορφώσεις κατασκευάστηκαν μέσω του λογισμικού AmberTools18.^[12]

Κυκλικές διαμορφώσεις μορίων DNA διπλής έλικας κατασκευάστηκαν ως επίπεδοι κύκλοι υπό τη θεώρηση σταθερής σχετικής απόστασης μεταξύ διαδοχικών ζευγών βάσεων, ίση με 3.38 Å, κατ’ αναλογία με πειραματικά προσδιορισμένες δομές DNA διπλής έλικας,^[13] και μοριακό μήκος μεταξύ από 30 ζευγών βάσης (30 base pairs) και 110 ζευγών βάσης (110 base pairs). Οι ακολουθίες ζευγών βάσεων των δομών που προσομοιώθηκαν περιέχουν ποσοστό ζευγών ΑΤ κοντά στο 50%. Περισσότερες λεπτομέρειες για τα συστήματα που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία παρατίθενται στον Πίνακα 1. Σε όλα μας τα υπολογιστικά πειράματα χρησιμοποιήθηκαν αρχικές διαμορφώσεις που αντιστοιχούν στις λεγόμενες κανονικές δομές DNA Β-τύπου κατά Arnott.^[14] Τα υδατικά διαλύματα που μελετήθηκαν αντιστοιχούν στην περιοχή αραιής συγκέντρωσης, με συγκέντρωση DNA μικρότερη από το όριο της συγκέντρωσης αλληλοεπικάλυψης (“overlap concentration”) για δύσκαμπτα μόρια.^[15]

Διεξήχθησαν λεπτομερείς προσομοιώσεις Μ.Δ. χρησιμοποιώντας την πιο πρόσφατα τροποποιημένη έκδοση PARAMBSC1^[1] της οικογένειας των δυναμικών AMBER99, ειδικά παραμετροποιημένη για μόρια DNA διπλής έλικας. Όλες οι προσομοιώσεις διεξήχθησαν με τη

βοήθεια του ανοικτού λογισμικού GROMACS,^[16] στο ισόθερμο-ισοβαρές στατιστικό σύνολο (NPT) κάνοντας χρήση του θερμοστάτη Nosé-Hoover^[17-18] και του βαροστάτη Parrinello-Rahman^[19] έτσι ώστε οι συνθήκες θερμοκρασίας και πίεσης να διατηρούνται σταθερές στις τιμές $T = 300$ K και $P = 1$ atm. Σε όλες τις περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκαν επαρκώς μεγάλα κυβικά κελιά προσομοίωσης υπό περιοδικές συνθήκες προκειμένου να εξασφαλισθεί ότι τα αποτελέσματα είναι ελεύθερα από φαιόμενα που σχετίζονται με τυχόν μικρό μέγεθος συστήματος. Οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις υπολογίστηκαν μέσω της μεθόδου particle mesh Ewald.^[20]

Πίνακας 1. Τεχνικά χαρακτηριστικά των υπό μελέτη μοριακών συστημάτων.

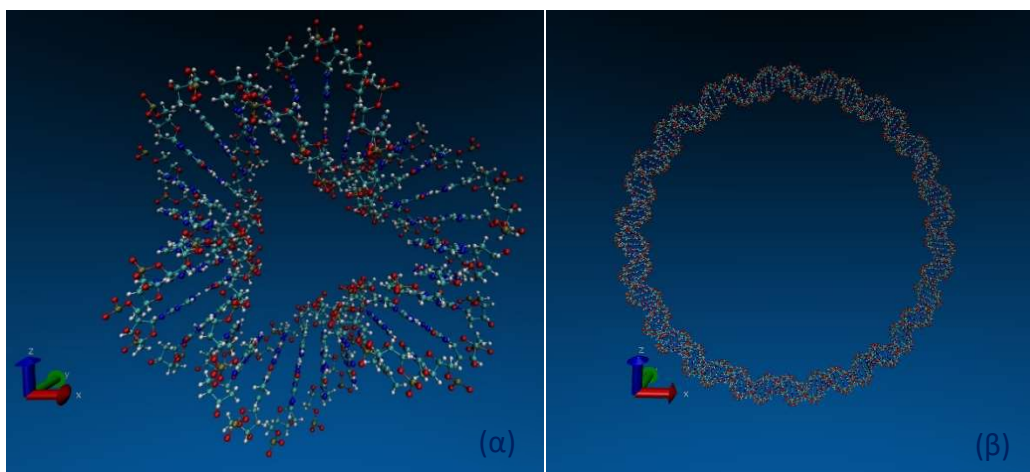
Αριθμός ζευγών βάσεων	Μοριακό βάρος (g/mol)	Συγκέντρωση DNA (mg/ml)	Συνολικός αριθμός ατόμων συστήματος
30	~ 20.000	5,0	~ 600.000
65	~ 43.000	10,0	~ 1.300.000
110	~ 66.000	16,0	~ 500.000
180	~ 119.000	5,0	~ 1.800.000

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ανά τακτά χρονικά διαστήματα (π.χ., ανά 20 ps) καταγράφονταν στιγμιότυπα της διαμόρφωσης του συστήματος. Οι τροχιές Μ.Δ. που ελήφθησαν αναλύθηκαν ενδελεχώς για τον υπολογισμό τοπικών ιδιοτήτων διαμόρφωσης όπως και των πιο σημαντικών ιδιοτήτων μεταφοράς (π.χ., του συντελεστή αυτοδιάχυσης των μορίων). Ενδεικτικά στιγμιότυπα της διαμόρφωσης των μοριακών συστημάτων της παρούσας εργασίας απεικονίζονται στο Σχήμα 1.

Οι μοριακές τροχιές που ελήφθησαν με χρήση του νέου μοριακού δυναμικού PARMBSC1^[1] χαρακτηρίζονται από εξαιρετικά σταθερές ελικοειδείς δομές DNA Β-τύπου οι οποίες διατηρούν τους δεσμούς υδρογόνου. Η κατανομή των διέδρων γωνιών κατά μήκος του σκελετού των αλυσίδων DNA προσδιορίστηκε και συγκρίθηκε σε σχέση με αντίστοιχα πειραματικά δεδομένα.^[21] Το εύρος των στιγμιαίων τιμών των αντίστοιχων γωνιών οι οποίες προσδιορίστηκαν από την επεξεργασία των μοριακών τροχιών των προσομοιώσεων βρίσκεται σε εξαιρετική συμφωνία με αντίστοιχα πειραματικά αποτελέσματα τα οποία ελήφθησαν με χρήση τεχνικών XRAY και NMR και περιλαμβάνονται στη βάση δεδομένων δομών DNA,^[22] τεκμηριώνοντας με αυτόν τον τρόπο την μοναδική ικανότητα του νέου δυναμικού PARMBSC1 να περιγράφει σωστά τη διαμόρφωση της διπλής έλικας του DNA.

Στην παρούσα εργασία, ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε στον υπολογισμό ιδιοτήτων διαμόρφωσης όπως η μέση τετραγωνική γυροσκοπική ακτίνα, $\langle \mathbf{R}_g^2 \rangle$, και το μέσο τετραγωνικό διάνυσμα διαμέτρου, $\langle \mathbf{R}_d^2 \rangle$, των μικρο-κυκλικών δομών DNA οι οποίες μελετήθηκαν, καθώς και του συντελεστή διάχυσης του κέντρου μάζας, συναρτήσεως του μοριακού μήκους και της μοριακής συγκέντρωσης.



Σχήμα 1. Ενδεικτικά στιγμιότυπα της διαμόρφωσης μικρο-κυκλικών δομών DNA διπλής έλικας με αριθμό ζευγών βάσεων 30 (α) και 180 (β). Στην γραφική αναπαράσταση των μορίων, μεμονωμένα άτομα απεικονίζονται με διαφορετικά χρώματα ως ακολούθως: C (ανοιχτό μπλε), O (κόκκινο), P (ανοιχτό πράσινο), H (λευκό), N (βαθύ μπλε).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα υπολογιστικά αποτελέσματα που παρουσιάζονται στην παρούσα εργασία αποτελούν ένα σημαντικό πρώτο βήμα προς την εξαγωγή αξιόπιστων νόμων κλιμάκωσης για την περιγραφή των δυναμικών και ρεολογικών ιδιοτήτων κυκλικών μορίων μεγαλύτερου μήκους. Επίσης, είναι εξαιρετικά χρήσιμα για την παραμετροποίηση αδροποιημένων μεθοδολογιών προσομοίωσης οι οποίες βασίζονται σε μεθόδους δυναμικής κατά Brown που στοχεύουν σε διαλύματα μορίων DNA πολύ μεγαλύτερου μήκους τόσο σε κατάσταση ισορροπίας όσο και υπό ροή (διατμηματική ή επίπεδη εκτατική).

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία υλοποιήθηκε στα πλαίσια του ερευνητικού έργου «Ιδιότητες διαμόρφωσης και μεταφοράς διαλυμάτων κυκλικών βιολογικών και συνθετικών πολυμερών: Θεωρία και ατομιστική προσομοίωση», και συγχρηματοδοτήθηκε από την Ευρωπαϊκή Ένωση και εθνικούς πόρους μέσω του Ε.Π. Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση (ΕΣΠΑ 2014-2020), (κωδικός έργου: mis 5004866).



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] I. Ivani, P.D. Dans, A. Noy et al.. Nature Methods, 13 (2016), 55 -58.
- [2] T. Cremer, M. Cremer, S. Dietzel, S Muller, I. Solovei, S. Fakan. Curr. Opin. Cell Biol. 18 (2006), 307-316.
- [3] M. H. Chisholm, J. C. Gallucci, H. Yin. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103 (2006), 15315-15320.
- [4] K.J. Meaburn, T. Mistelli. Nature 445 (2007), 379-781.
- [5] R. M. Robertson, D. E. Smith. Macromolecules 40 (2007), 3373-3377.
- [6] R. M. Robertson, D. E. Smith. Proc. Natl. Acad. Sci. 104 (2007), 4824-4827.
- [7] R. M. Robertson, S. Laib, D. E. Smith. Proc. Natl. Acad. Sci. (US) 103 (2006), 7310-7314.
- [8] M. Doi, S.F. Edwards, The Theory of Polymer Dynamics (Oxford University Press, Oxford, 1986).
- [9] M. F. Serag, M. Abadi, S. Habuchi. Nat. Commun. 5 (2014), 5123.
- [10] M. Abadi, M. F. Serag, S. Habuchi. Macromolecules 48 (2015), 6263-6371.

- [11] S. P. Obukhov, M. Rubinstein, T. Duke. *Phys. Rev. Lett.* 73 (1994), 1263-1266.
- [12] D.A. Case, I.Y. Ben-Shalom, S.R. Brozell, D.S. Cerutti, T.E. Cheatham, III, V.W.D. Cruzeiro, T.A. Darden, R.E. Duke, D. Ghoreishi, M.K. Gilson, H. Gohlke, A.W. Goetz, D. Greene, R Harris, N. Homeyer, S. Izadi, A. Kovalenko, T. Kurtzman, T.S. Lee, S. LeGrand, P. Li, C. Lin, J. Liu, T. Luchko, R. Luo, D.J. Mermelstein, K.M. Merz, Y. Miao, G. Monard, C. Nguyen, H. Nguyen, I. Omelyan, A. Onufriev, F. Pan, R. Qi, D.R. Roe, A. Roitberg, C. Sagui, S. Schott-Verdugo, J. Shen, C.L. Simmerling, J. Smith, R. Salomon-Ferrer, J. Swails, R.C. Walker, J. Wang, H. Wei, R.M. Wolf, X. Wu, L. Xiao, D.M. York and P.A. Kollman (2018), AMBER 2018, University of California, San Francisco.
- [13] R. Lavery, M. Moakher, J. H. Maddocks, D. Petkeviciute, K. Zakrzewska. *Nucleic Acids Research* 37 (2009), 5917–5929.
- [14] S. Arnott, S. D. W. Hukins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 47 (1972) 1504–1509.
- [15] Y. Qicong, B. Chu. *Macromolecules* 20 (1987), 362-366.
- [16] M. J. Abraham, T. Murtola, R. Schulz, S. Páll, J. C. Smith, B. Hess, E. Lindahl. *SoftwareX* 1-2 (2015), 19-25.
- [17] S. A. Nosé. *Mol. Phys.* 52 (1984), 255-268.
- [18] W.G. Hoover. *Phys. Rev. A.* 31 (1985), 1695.
- [19] M. Parrinello, A. Rahman. *J. Appl. Phys.* 52 (1981), 7182-7190.
- [20] T. Darden, D. York, L. Pedersen. *J. Chem. Phys.* 98 (1993), 10089-10092.
- [21] B. Schneider, S. Neidle, H.M. Berman. *Biopolymers* 42 (1997), 113-124.
- [22] <http://ndbserver.rutgers.edu/>