

ΑΤΟΜΙΣΤΙΚΗ ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΔΥΝΑΜΙΚΗΣ ΤΗΣ ΔΙΑΧΥΤΙΚΗΣ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑΣ ΜΙΚΡΩΝ ΓΡΑΜΜΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ DNA: ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΚΑΙ ΘΕΩΡΗΤΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ**Τ. Αλεξίου,^{1,2} Ε. Κριτή,¹ Δ. Λούκας,¹ Β. Μαυραντζάς^{1,2,3, *}**¹Τμήμα Χημικών Μηχανικών, Πανεπιστήμιο Πατρών, Ελλάδα²Ινστιτούτο Επιστημών Χημικής Μηχανικής (ΙΕΧΜΗ), Ίδρυμα Τεχνολογίας & Έρευνας (ΙΤΕ)³ Particle Technology Laboratory, Department of Mechanical and Process Engineering, ETH Zürich, Sonneggstrasse 3, Zürich 8092, Switzerland(*vlasias@chemeng.upatras.gr, vlasiosm@mat.ethz.ch)**ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

Αντικείμενο της παρούσας εργασίας είναι η υπολογιστική μελέτη των ιδιοτήτων διαμόρφωσης και μεταφοράς διαλελυμένων γραμμικών μορίων DNA σε αραιά υδατικά διαλύματα. Για το σκοπό αυτό διενεργήθηκαν προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής (Μ.Δ.) ατομιστικής λεπτομέρειας για μικρά μόρια DNA γραμμική αρχιτεκτονικής και ακολουθίας βάσεων που αντιστοιχούν σε πειραματικά μελετημένες δομές, χρησιμοποιώντας μοριακά δυναμικά τελευταίας γενιάς της οικογένειας AMBER, κατάλληλα τροποποιημένων ειδικά για τη διπλή έλικα του DNA, όπως το PARMBC1.^[1] Η σύγκριση των προβλεπόμενων τιμών της κατανομής διέδρων γωνιών κατά μήκος του σκελετού των πολυμερικών αλυσίδων DNA επέδειξε εξαιρετική συμφωνία με πειραματικά διαθέσιμα δεδομένα. Αξιοσημείωτη είναι και η ποιοτική επίδραση της αύξησης του μοριακού μήκους στην εμφάνιση μιας βαθμιαίας μετάβασης από μια διαμόρφωση τύπου άκαμπτης ράβδου σε μια ημι-εύκαμπτη διαμόρφωση αλυσίδας η οποία παρατηρείται πολύ πριν την πειραματικά εικαζόμενη τιμή του μήκους ευκαμψίας (περίπου 50nm, που αντιστοιχεί σε περίπου 150 ζεύγη βάσης). Υπολογίσαμε και θα παρουσιάσουμε τη μεταφορική και περιστροφική συνιστώσα του συντελεστή διάχυσης των γραμμικών μορίων DNA που προσομοιώθηκαν και θα τις συγκρίνουμε ενδελεχώς με αντίστοιχα πειραματικά δεδομένα που έχουν ληφθεί με τη βοήθεια της τεχνικής δυναμικής σκέδασης φωτός, όπως και με τις προβλέψεις θεωρητικών μοντέλων που έχουν αναπτυχθεί και δημοσιευτεί στη σύγχρονη βιβλιογραφία για ραβδοειδή μακρομόρια.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Απαραίτητα σε όλες τις θεμελιώδεις διεργασίες της ζωής, τα βιοπολυμερή DNA απαντώνται σε πληθώρα μοριακών διαμορφώσεων, με πιο χαρακτηριστικό παράδειγμα τις τοπολογικά περιορισμένες κυκλικές διαμορφώσεις που εντοπίζονται συχνά στο κυτταρόπλασμα, φτάνοντας σε μοριακά βάρη της τάξης των χιλιάδων ζευγών βάσης, και επιδεικνύοντας ποικιλία σύνθετων δομών όπως οι τοπολογικοί κόμποι και οι υπερ-ελικώσεις.^[2] Εκτός αυτού, πολύ μικρότερα κυκλικά μόρια DNA, καθώς επίσης και μικρά μόρια DNA γραμμικής αρχιτεκτονικής με μήκος μέχρι το πολύ διακόσια ζεύγη βάσης (200 base pairs), αποκτούν ολοένα και μεγαλύτερο ερευνητικό ενδιαφέρον σε εφαρμογές όπως η στοχευμένη μεταφορά φαρμάκων^[3-4] και η καθιέρωση νέων βιοδεικτών που σχετίζονται με το ελεύθερο, αποκολλημένο από καρκινικούς όγκους DNA (circulating tumour-shed DNA (ctDNA)) το οποίο εισέρχεται στην κυκλοφορία του αίματος.^[5] Η πρόοδος στις τεχνικές μικρο-ρεολογίας και μικρο-ρευστωνικών συσκευών έχει επιτρέψει την πειραματική παρατήρηση της δυναμικής μεμονωμένων μορίων DNA, ιδιαίτερα αυτών που επιδεικνύουν απλή γραμμική αρχιτεκτονική, σ' ένα μεγάλο εύρος μοριακών συγκεντρώσεων, από την περιοχή των αραιών έως και την περιοχή των πυκνών διαλυμάτων όπου κάνουν την εμφάνισή τους τοπολογικά διαπεπλεγμένες διαμορφώσεις.^[6-7]

Τα βιοπολυμερή DNA εν διαλύσει επιδεικνύουν ποικιλομορφία σύνθετων χαρακτηριστικών μεταφορικών και περιστροφικών κινήσεων, και διαμορφώσεις με μεταβαλλόμενο βαθμό

ευκαμψίας, που εξαρτώνται ισχυρά από το μοριακό μήκος. Πειραματικές μελέτες της δυναμικής συμπεριφοράς ημι-εύκαμπτων γραμμικών και κυκλικών μορίων DNA πολύ μεγάλου μοριακού μήκους (της τάξης των χιλιάδων ζευγών βάσεων) αποκάλυψαν μια απλή συσχέτιση τύπου εκθετικού νόμου (power law) μεταξύ του μεταφορικού συντελεστή διάχυσης του κέντρου μάζας του μορίου και του μοριακού βάρους.^[6, 8] Παράλληλα, αυξανόμενο ερευνητικό ενδιαφέρον έχει αρχίσει να αποκτά και η μελέτη της δυναμικής συμπεριφοράς πολύ μικρών μορίων DNA με σημαντικά μικρότερο βαθμό ευκαμψίας. Ολιγονουκλεοτίδια με μοριακό μήκος μικρότερο από το μήκος ευκαμψίας εμφανίζουν δυναμική συμπεριφορά που προσομοιάζει αυτής που επιδεικνύουν άκαμπτα κυλινδρικά μόρια. Πειραματικές τεχνικές δυναμικής σκέδασης φωτός έχουν επιτρέψει την εκτίμηση της μεταφορικής και περιστροφικής συνιστώσας του συντελεστή διάχυσης γραμμικών μορίων DNA^[9,10] με μοριακό μήκος μερικών ζευγών βάσεων. Τα εν λόγω συστήματα είναι εξαιρετικά φιλικά για τη μελέτη μέσω ατομιστικών προσομοιώσεων. Οι ατομιστικές προσομοιώσεις ΜΔ επιτρέπουν τη λεπτομερή παρατήρηση της μικροσκοπικής μοριακής διαμόρφωσης με ευκρίνεια τάξης μεγέθους μικρότερη από αυτή που προσφέρουν πειραματικές τεχνικές παρακολούθησης της κίνησης μεμονωμένων μακρομορίων σε πραγματικό χρόνο,^[12] καθώς και τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των μεσοσκοπικά αναδύομενων ιδιοτήτων μεταφοράς (συντελεστές διάχυσης). Με τον τρόπο αυτό παρακάμπτονται εγγενείς πειραματικοί περιορισμοί αναφορικά με τη μελέτη της λεπτομερούς δομής του DNA σε ατομιστικό επίπεδο^[11] οι οποίοι δυσχεραίνουν την αποσαφήνιση των αλληλεπιδράσεων διαλελυμένου μορίου-διαλύτη και τη λεπτομερή μελέτη της επίδρασης της μικροσκοπικής μοριακής διαμόρφωσης στις μακροσκοπικές ιδιότητες μεταφοράς. Επιπρόσθετα, γίνεται εφικτός ο έλεγχος των προβλέψεων μοριακών θεωριών οι οποίες έχουν αναπτυχθεί και δημοσιευτεί στη σύγχρονη βιβλιογραφία για ραβδοειδή μακρομόρια.

ΜΟΡΙΑΚΟ ΜΟΝΤΕΛΟ ΚΑΙ ΥΠΟ ΜΕΛΕΤΗ ΜΟΡΙΑΚΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ

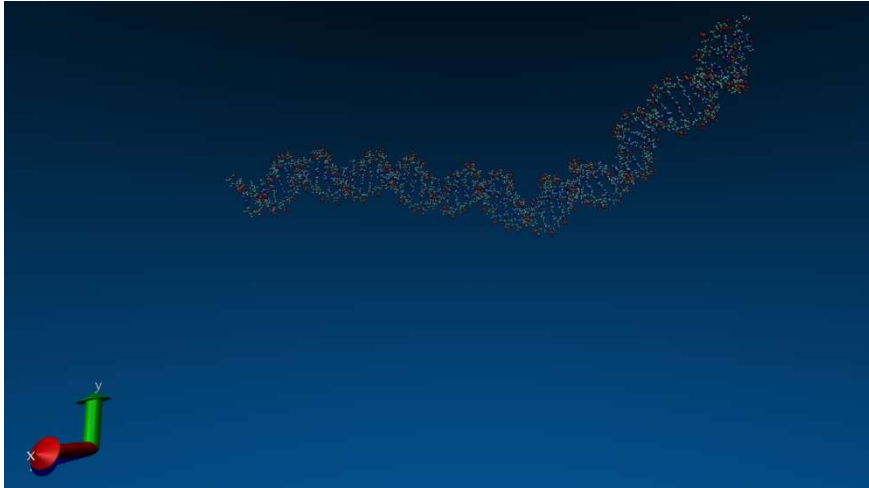
Γραμμικές διαμορφώσεις μορίων DNA διπλής έλικας κατασκευάστηκαν μέσω του λογισμικού AmberTools18^[12], κατ' αναλογία με πειραματικά προσδιορισμένες δομές DNA διπλής έλικας Β-τύπου.^[13] Μελετήθηκαν ακολουθίες ζευγών βάσεων οι οποίες είναι σε πλήρη αντιστοιχία με πειραματικά μελετημένες δομές,^[10, 13] και το μοριακό μήκος των κατασκευασμένων δομών μεταβλήθηκε σε εύρος από 8 ζεύγη βάσεων (8bp) έως και 60 ζεύγη βάσεων (60bp).

Οι προσομοιώσεις Μ.Δ. διεξήχθησαν χρησιμοποιώντας την πιο πρόσφατα τροποποιημένη έκδοση PARAMBSC1^[1] της οικογένειας δυναμικών AMBER99, μέσω του ανοικτού λογισμικού GROMACS,^[14] στο ισόθερμο-ισοβαρές στατιστικό σύνολο (NPT), κάνοντας χρήση του θερμοστάτη Nosé-Hoover^[15-16] και του βαροστάτη Parrinello-Rahman^[17] για συνθήκες θερμοκρασίας και πίεσης $T = 300 \text{ K}$ και $P = 1 \text{ atm}$. Για τον υπολογισμό των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος particle mesh Ewald.^[18]

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Πραγματοποιήθηκε παραμετρική μελέτη για τη διερεύνηση της επίδρασης του μοριακού μήκους και της μοριακής συγκέντρωσης στις δομικές και δυναμικές ιδιότητες των υπό μελέτη συστημάτων. Διεξήχθησαν σχετικά μεγάλης διάρκειας προσομοιώσεις ΜΔ (της τάξεως εκατοντάδων ns), για υδατικά διαλύματα που αντιστοιχούν στην περιοχή αραιής συγκέντρωσης, με συγκέντρωση DNA μικρότερη από το όριο της συγκέντρωσης αλληλοεπικάλυψης ("overlap concentration") για δύσκαμπτα μόρια.^[19] Οι μοριακές τροχιές που ελήφθησαν με χρήση του νέου μοριακού δυναμικού PARAMBSC1^[1] χαρακτηρίζονται από εξαιρετικά σταθερές ελικοειδείς δομές DNA Β-τύπου οι οποίες διατηρούν τους δεσμούς υδρογόνου, ιδιαίτερα δε στα ελεύθερα άκρα των γραμμικών αλυσίδων. Η κατανομή των διέδρων γωνιών κατά μήκος του σκελετού των αλυσίδων DNA προσδιορίστηκε και επέδειξε εξαιρετική συμφωνία σε σχέση με αντίστοιχα πειραματικά δεδομένα.^[19, 20] Με αύξηση του μοριακού μήκους παρατηρήθηκε η εμφάνιση μιας βαθμιαίας

μετάβασης από μια διαμόρφωση τύπου άκαμπτης ράβδου σε μια ημι-εύκαμπτη διαμόρφωση αλυσίδας η οποία παρατηρείται πριν την πειραματικά εικαζόμενη τιμή του μήκους ευκαμψίας (περίπου 50nm, που αντιστοιχεί σε περίπου 150 ζεύγη βάσης), όπως φαίνεται από τα ενδεικτικά στιγμιότυπα της μοριακής διαμόρφωσης συστημάτων που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία στο Σχήμα 1.



Σχήμα 1. Ενδεικτικό στιγμιότυπο μιας ημι-εύκαμπτης διαμόρφωσης γραμμικής δομής DNA διπλής έλικας με αριθμό ζευγών βάσεων 60. 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).

Από την ανάλυση των τροχιών ΜΔ οι οποίες ελήφθησαν, υπολογίστηκαν ιδιότητες διαμόρφωσης όπως η μέση τετραγωνική γυροσκοπική ακτίνα, $\langle \mathbf{R}_g^2 \rangle$, και το μέσο τετραγωνικό από άκρο εις άκρο διάνυσμα, $\langle \mathbf{R}_{ee}^2 \rangle$, καθώς και η μεταφορική και περιστροφική συνιστώσα του συντελεστή διάχυσης του κέντρου μάζας. Η μεταφορική συνιστώσα του συντελεστή διάχυσης προσδιορίστηκε από τη μέση τετραγωνική μετατόπιση του κέντρου μάζας των αλυσίδων DNA μέσω της σχέσης κατά Einstein ως ακολούθως:

$$D_t = \lim_{t \rightarrow \infty} \frac{1}{6t} \langle (\mathbf{r}_{cm}(t) - \mathbf{r}_{cm}(0))^2 \rangle \quad (1)$$

Για τον προσδιορισμό της περιστροφικής συνιστώσας του συντελεστή διάχυσης των μορίων DNA υπολογίστηκε η συνάρτηση αυτοσυσχέτισης του από άκρο εις άκρο διανύσματος των αλυσίδων, και εν συνεχεία έγινε ανάλυση παλινδρόμησης για την προσαρμογή των υπολογιστικών δεδομένων στις αντίστοιχες προβλέψεις μοριακής θεωρίας.^[8]

Οι τιμές που εξήχθησαν για τη μεταφορική και περιστροφική συνιστώσα του συντελεστή διάχυσης συγκρίθηκαν με τις αντίστοιχες εκτιμήσεις θεωρητικών μοντέλων οι οποίες έχουν εξαχθεί για συστήματα αραιών διαλυμάτων άκαμπτων ραβδοειδών μορίων μικρού μήκους, μέσω της θεώρησης απλοποιημένων γεωμετρικών μοντέλων για τη διαμόρφωση του διαλελυμένου μορίου και την αλληλεπίδρασή του με το διαλύτη.^[21-23] Υπό την θεώρηση του διαλελυμένου μορίου ως κυλίνδρου ομοιόμορφης διατομής ο οποίος βρίσκεται εμβαπτισμένος σ' ένα υδροδυναμικό συνεχές μέσο, οι συνιστώσες του συντελεστή διάχυσης υπολογίζονται ως συναρτήσεις του μήκους L , του λόγου μήκους προς εγκάρσια διαμέτρου L/d , και του ιξώδους του περιβάλλοντος διαλύτη n_s ως:

$$D_r = 3k_B T \frac{\ln(L/d) - 0.662 + \frac{0.917}{L/d} - \frac{0.050}{(L/d)^2}}{\pi \eta_s L^3} \quad (2)$$

$$D_t = k_B T \frac{\ln(L/d) + 0.312 + \frac{0.565}{L/d} + \frac{0.100}{(L/d)^2}}{3\pi \eta_s L} \quad (3)$$

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Διεξήχθησαν λεπτομερείς προσομοιώσεις Μ.Δ. ατομιστικής λεπτομέρειας για αραιά διαλύματα μικρών μορίων DNA γραμμική αρχιτεκτονικής και ακολουθίας βάσεων που αντιστοιχούν σε πειραματικά μελετημένες δομές. Η σύγκριση των προβλεπόμενων τιμών της κατανομής διέδρων γωνιών κατά μήκος του σκελετού των πολυμερικών αλυσίδων DNA επέδειξε πολύ καλή συμφωνία με πειραματικά διαθέσιμα δεδομένα.

Υπολογίστηκαν η μεταφορική και περιστροφική συνιστώσα του συντελεστή διάχυσης των γραμμικών μορίων DNA που προσομοιώθηκαν, και συγκρίθηκαν ενδελεχώς με αντίστοιχα πειραματικά δεδομένα που έχουν ληφθεί στη βιβλιογραφία με τη βοήθεια της τεχνικής δυναμικής σκέδασης φωτός,^[9-10] όπως και με τις προβλέψεις θεωρητικών μοντέλων που έχουν αναπτυχθεί και δημοσιευτεί στη σύγχρονη βιβλιογραφία για ραβδοειδή μόρια.^[21-23]

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] H. R. Underhill, J. O. Kitzman, S. Hellwig, N.C. Welker, R. Daza et al.. *PLOS Genetics* 12 (2016), e1006162.
- [6] R. M. Robertson, S. Laib, D. E. Smith. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103 (2006), 7310–7314.
- [7] D. E. Smith, T. T. Perkins, S. Chu. *Macromolecules* 29 (1996), 1372–1373.
- [8] M. Doi, S.F. Edwards, *The Theory of Polymer Dynamics* (Oxford University Press, Oxford, 1986).
- [9] M. A. Tracy, R. Pecora. *Annual Review of Physical Chemistry* 43 (1992), 525-557.
- [10] W. Eimer, R. Pecora, *J Chem Phys.* 94 (1991), 2324-2329.
- [11] M. Abadi, M. F. Serag , S. Habuchi. *Macromolecules* 48 (2015), 6263-6371.
- [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] M. J. Abraham, T. Murtola, R. Schulz, S. Páll, J. C. Smith, B. Hess, E. Lindahl. *SoftwareX* 1-2 (2015), 19-25.
- [15] S. A. Nosé. *Mol. Phys.* 52 (1984), 255-268.
- [16] W.G. Hoover. *Phys. Rev. A.* 31 (1985), 1695.
- [17] M. Parrinello, A. Rahman. *J. Appl. Phys.* 52 (1981), 7182-7190.
- [18] T. Darden, D. York, L. Pedersen. *P. J. Chem. Phys.* 98 (1993) 10089-10092.
- [19] Y. Qicong, B. Chu. *Macromolecules* 20 (2) (1987) 362-366
- [20] B. Schneider, S. Neidle, H.M. Berman. *Biopolymers*, 42 (1997) 113-124.
- [21] S. Broersma, *J. Chem. Phys.* 32 (1960) 1632-1636.

[22] M. M. Tirado, J. Garcia de la Tore. J. Chem. Phys. 71 (1979) 2581-.2588.

[23] M. M. Tirado, J. Garcia de la Tore. J. Chem. Phys. 73 (1980) 1986-