

Моделирование расщепления фрагментов ДНК под действием ультразвука высокой интенсивности

Нечипуренко Д.Ю.

Кафедра биофизики, физический факультет
МГУ

Зависимость локальных физико-химических свойств ДНК от нуклеотидной последовательности

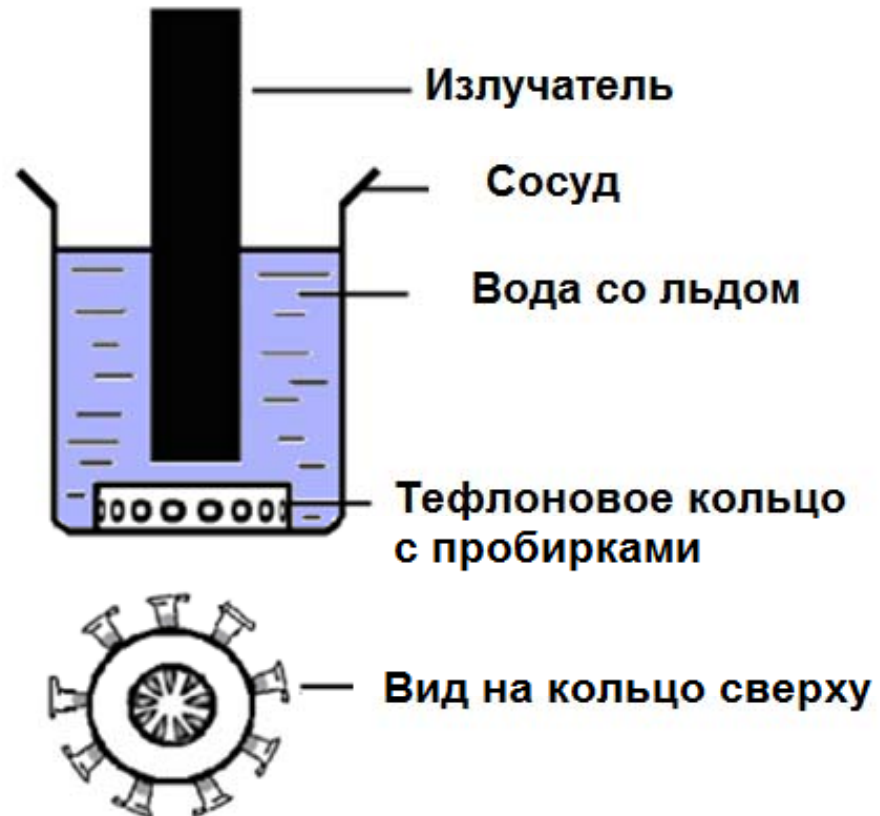
Экспериментальное наблюдение

общепринятая интерпретация

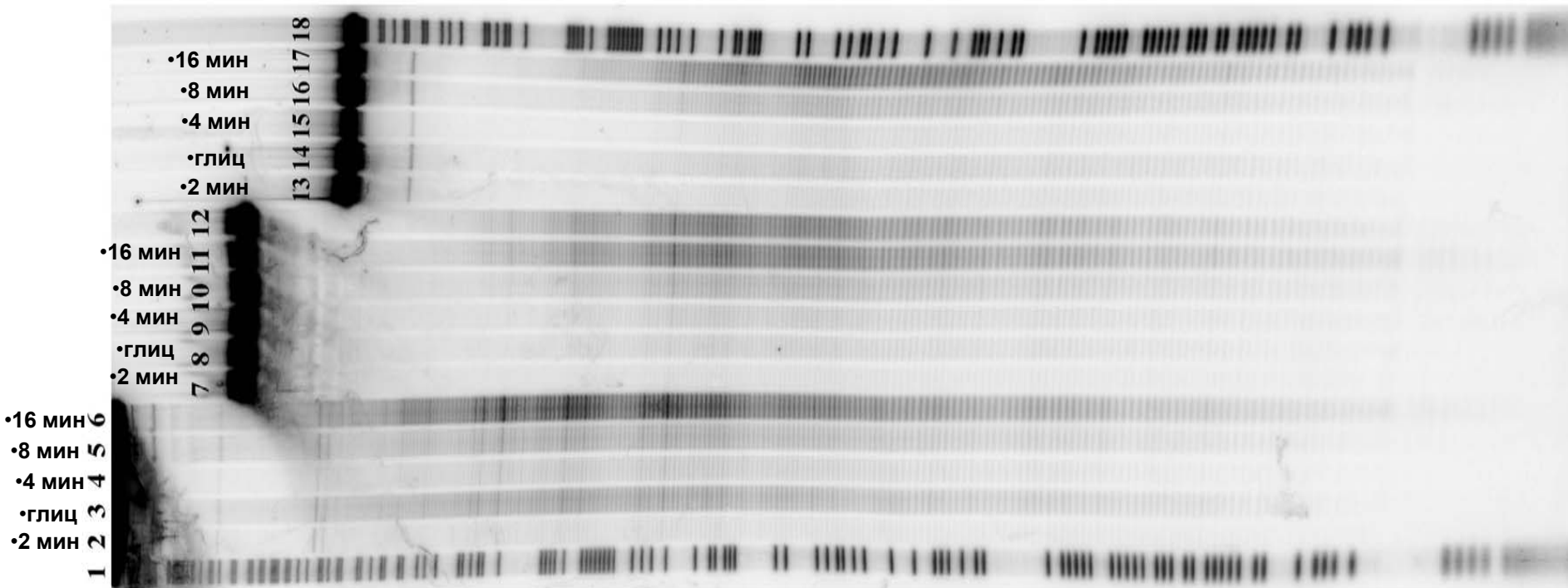
- Избирательность расщепления ДНК ферментом ДНКазой I  Неоднородность локальной гибкости вдоль ДНК
 - Зависимость температуры плавления ДНК от последовательности пар оснований  Зависимость свободной энергии образования дуплекса от последовательности пар оснований
 - Неоднородность расщепления ДНК ОН – радикалами  Изменение ширины узкой бороздки вдоль ДНК
-
- Специфичность расщепления ДНК ультразвуком  ?

Облучение водно-солевых растворов ДНК ультразвуком

Частота ультразвука: 22 кГц, интенсивность: 2 Вт/см²

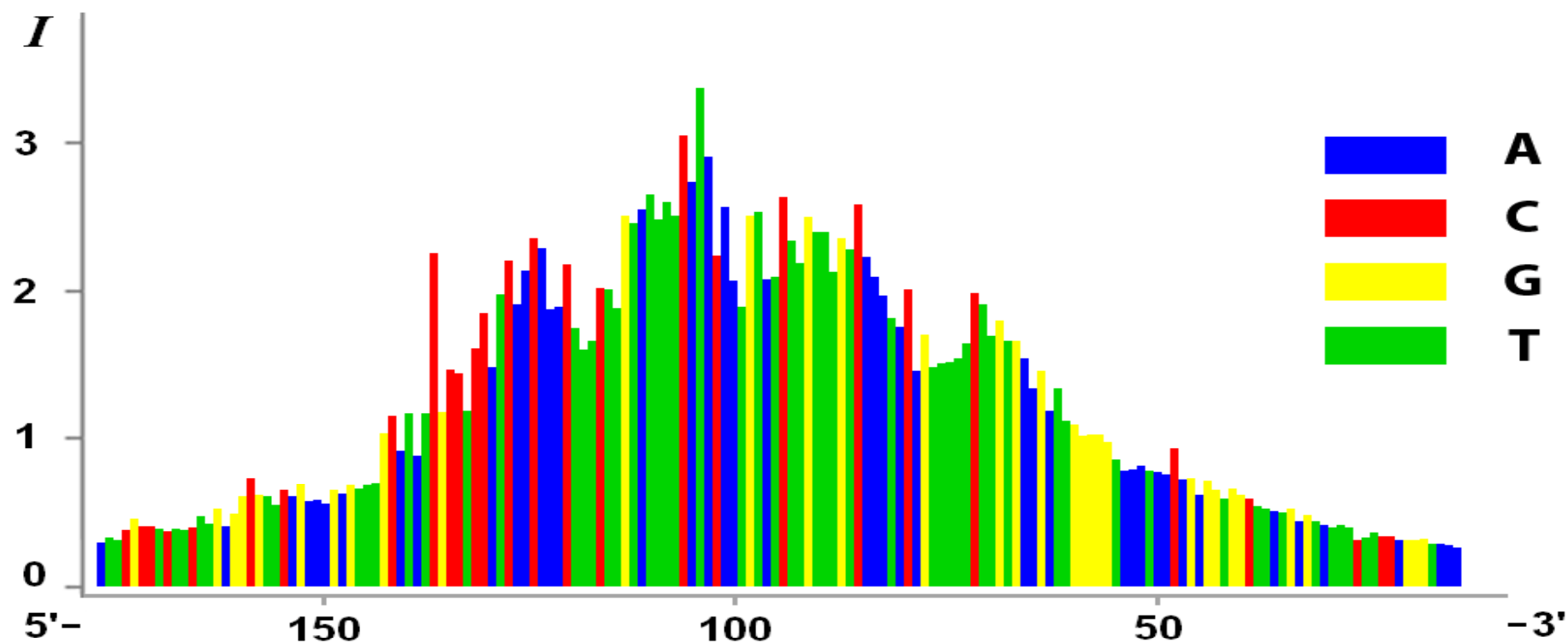


Характерная картина расщепления ДНК ультразвуком

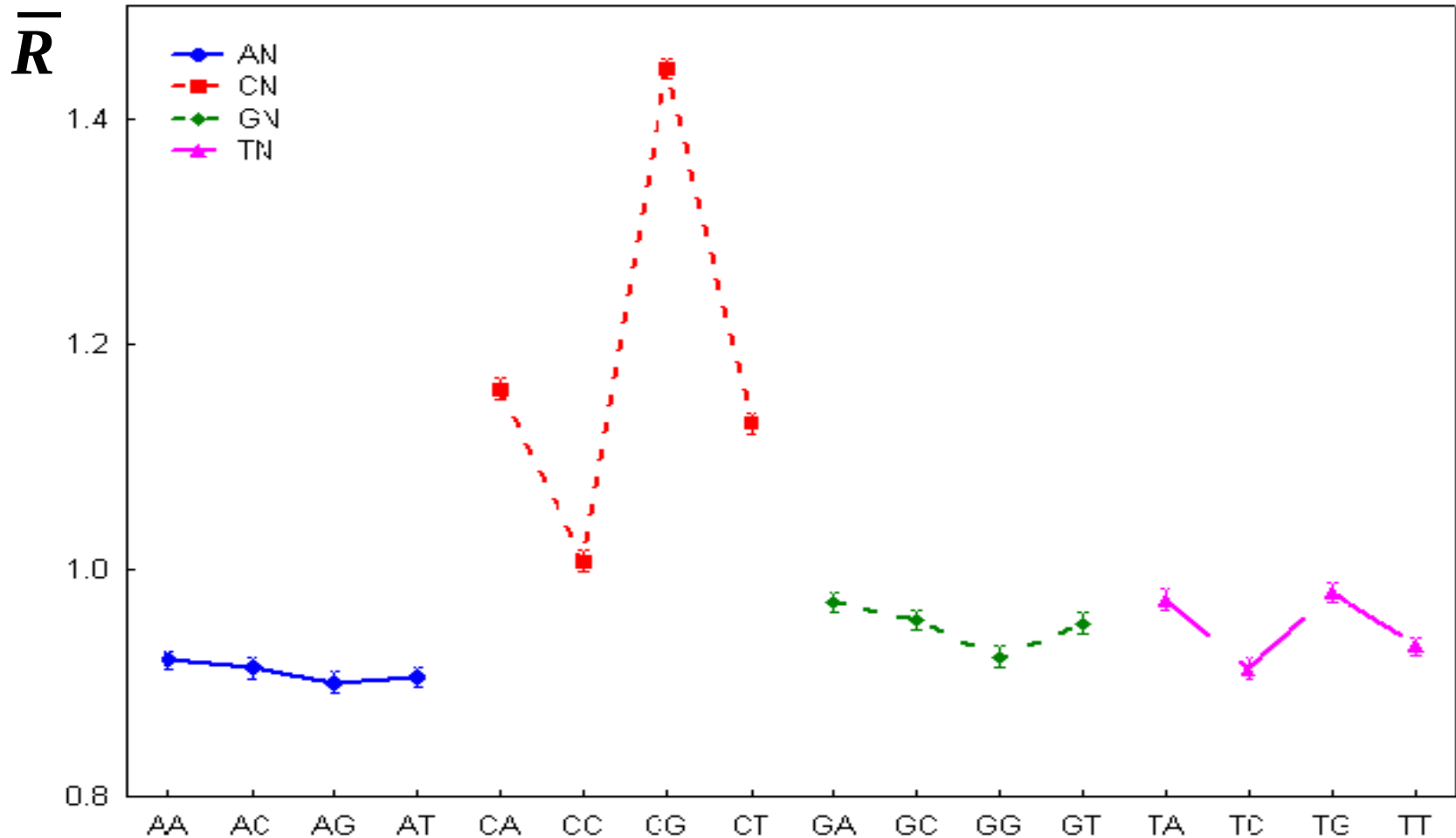


- Использование методики гелевого электрофореза позволило выявить зависимость расщепления фрагментов ДНК от последовательности нуклеотидных пар

Профиль ультразвукового расщепления

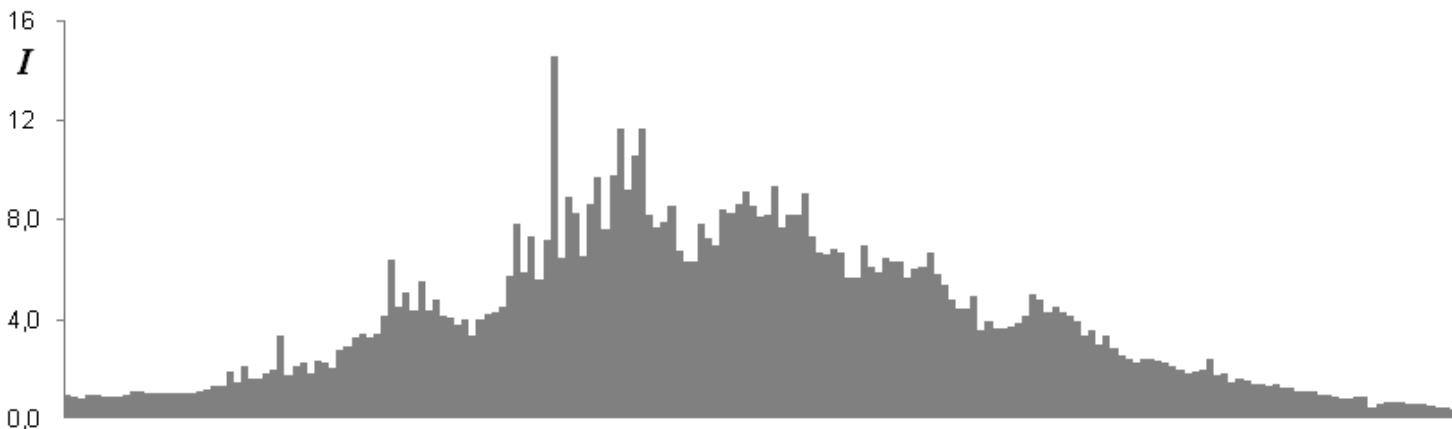


Относительные частоты расщепления 16 динуклеотидов

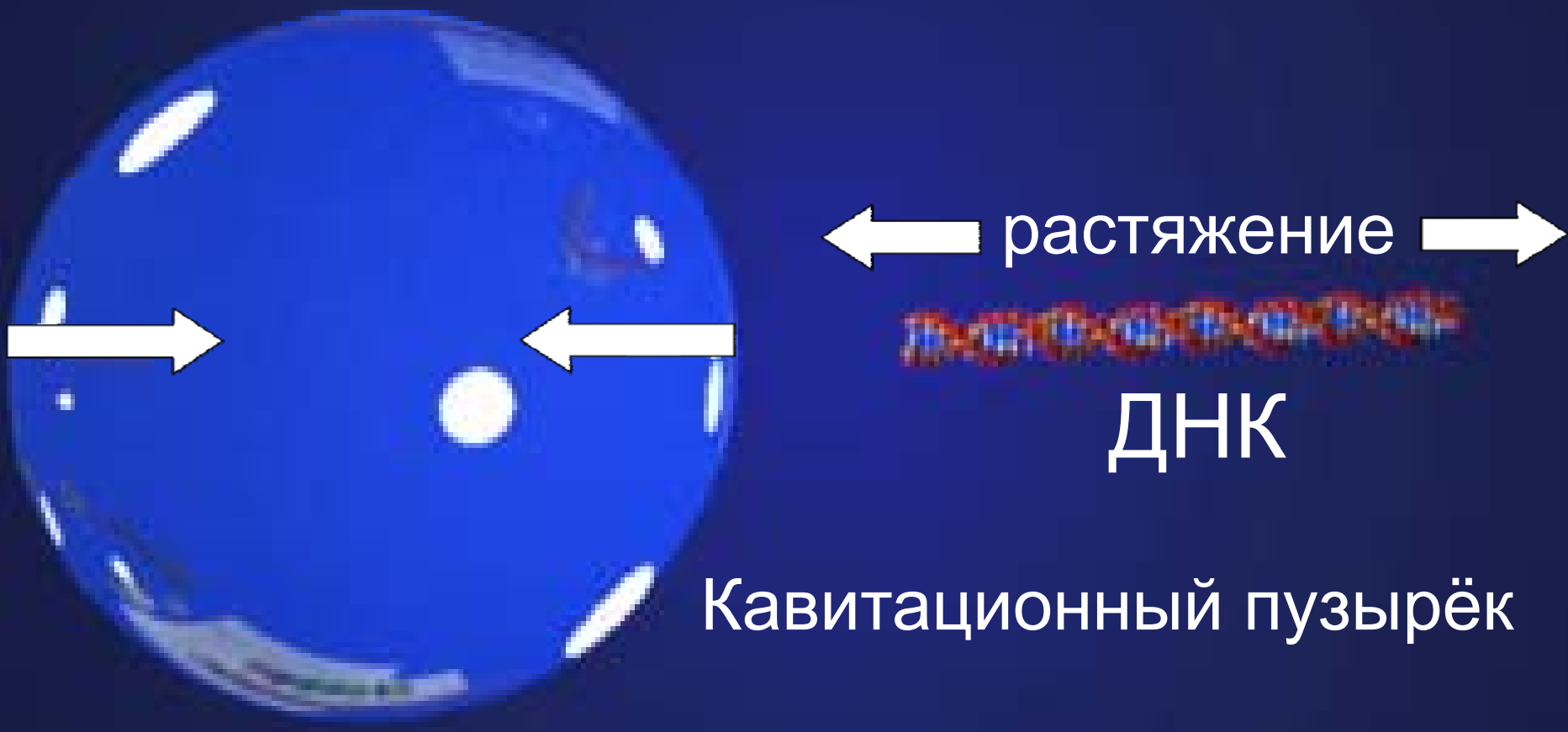


Характерные особенности расщепления ДНК ультразвуком

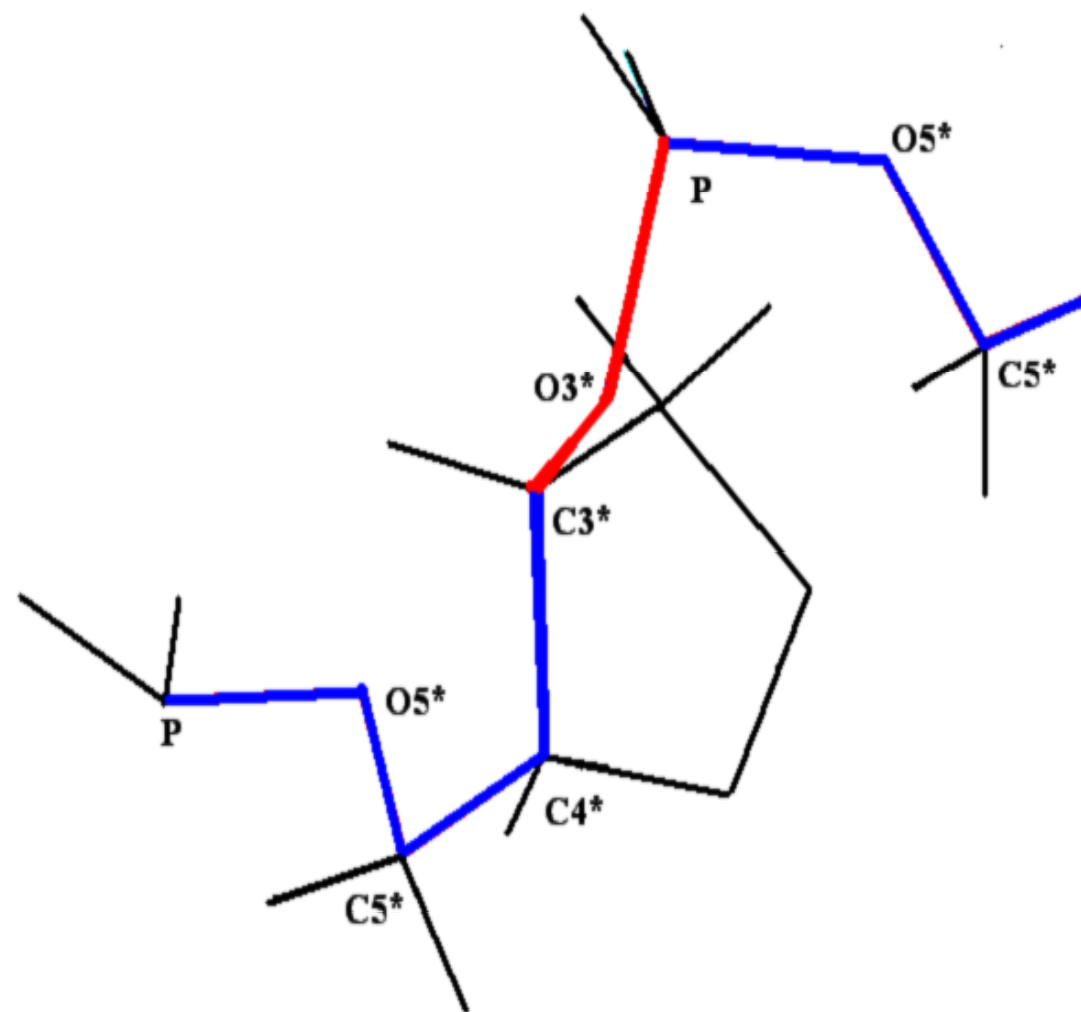
- Уменьшение степени расщепления на концах фрагмента.
- Увеличение общего уровня расщепления при увеличении длины облучаемых фрагментов
- Увеличение общего уровня расщепления при увеличении вязкости раствора.
- Уменьшение общего уровня расщепления при увеличении температуры.
- Добавление скевенджеров свободных радикалов не оказывает влияния на наблюдаемые картины расщепления ДНК.



Модель расщепления ДНК под действием акустической кавитации



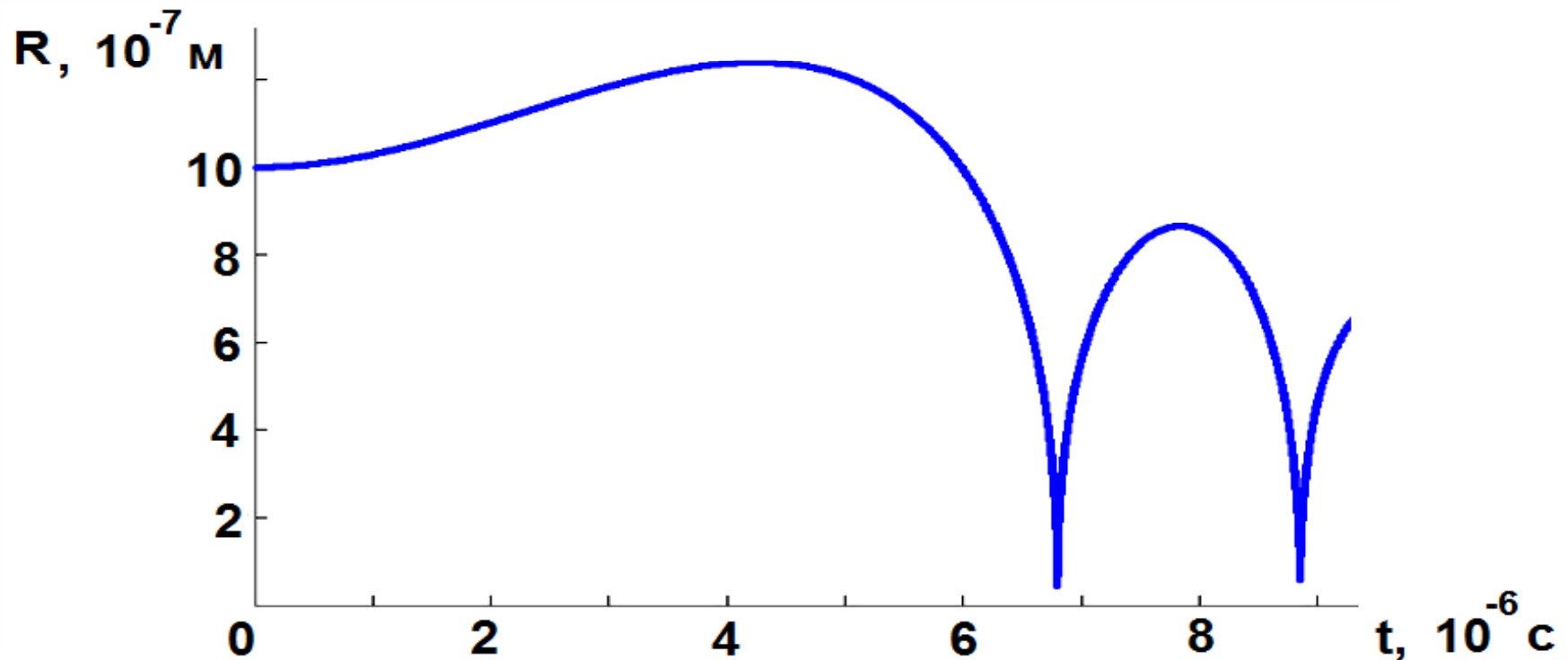
Разрыв фосфодиэфирной связи как механохимическая реакция



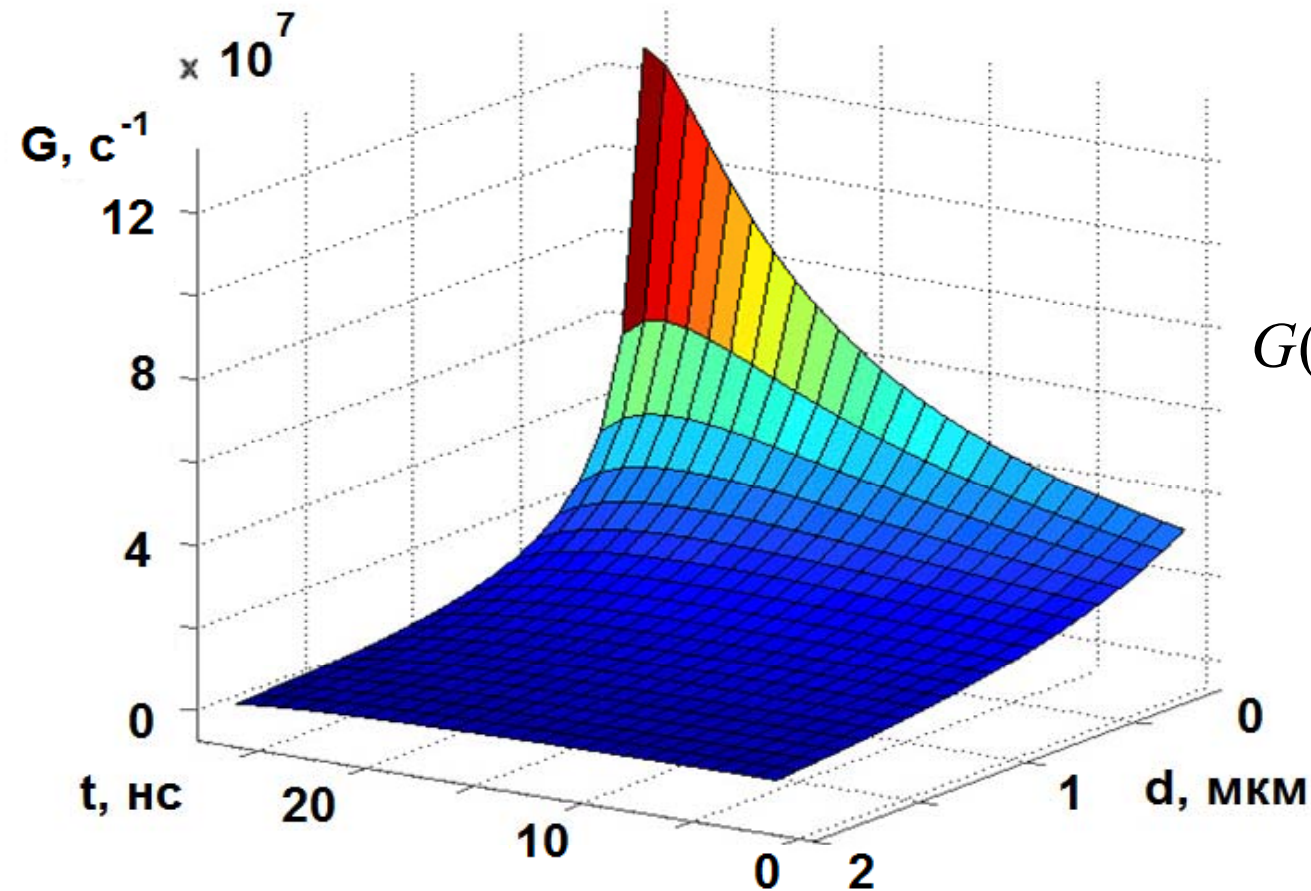
$$k_d = k_0 \cdot e^{-\frac{E^* - E(F)}{kT}}$$

Моделирование динамики кавитационного пузырька

$$R \frac{d^2 R}{dt^2} + \frac{3}{2} \left(\frac{dR}{dt} \right)^2 = \frac{1}{\rho} \left[P_i - P_\infty - \frac{2\sigma}{R} - \frac{4\mu}{R} \left(\frac{dR}{dt} \right) \right]$$

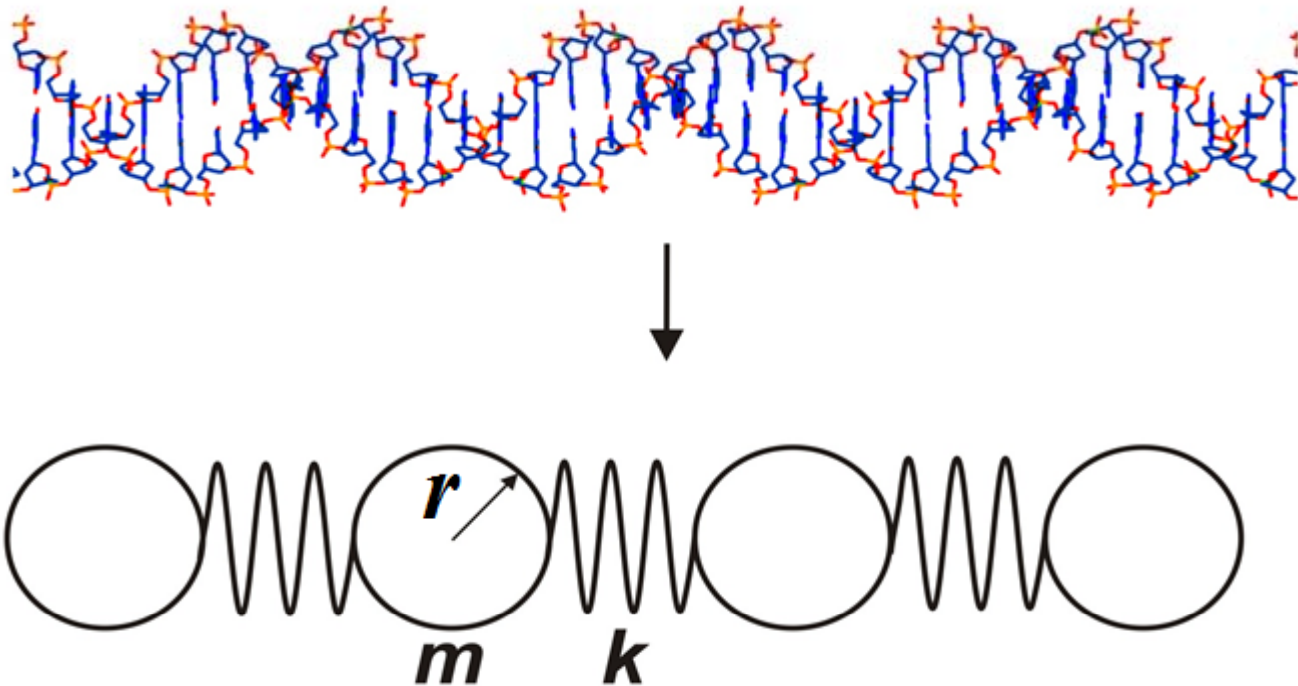


Пространственно-временная зависимость градиента скорости течения жидкости вблизи кавитационного пузырька



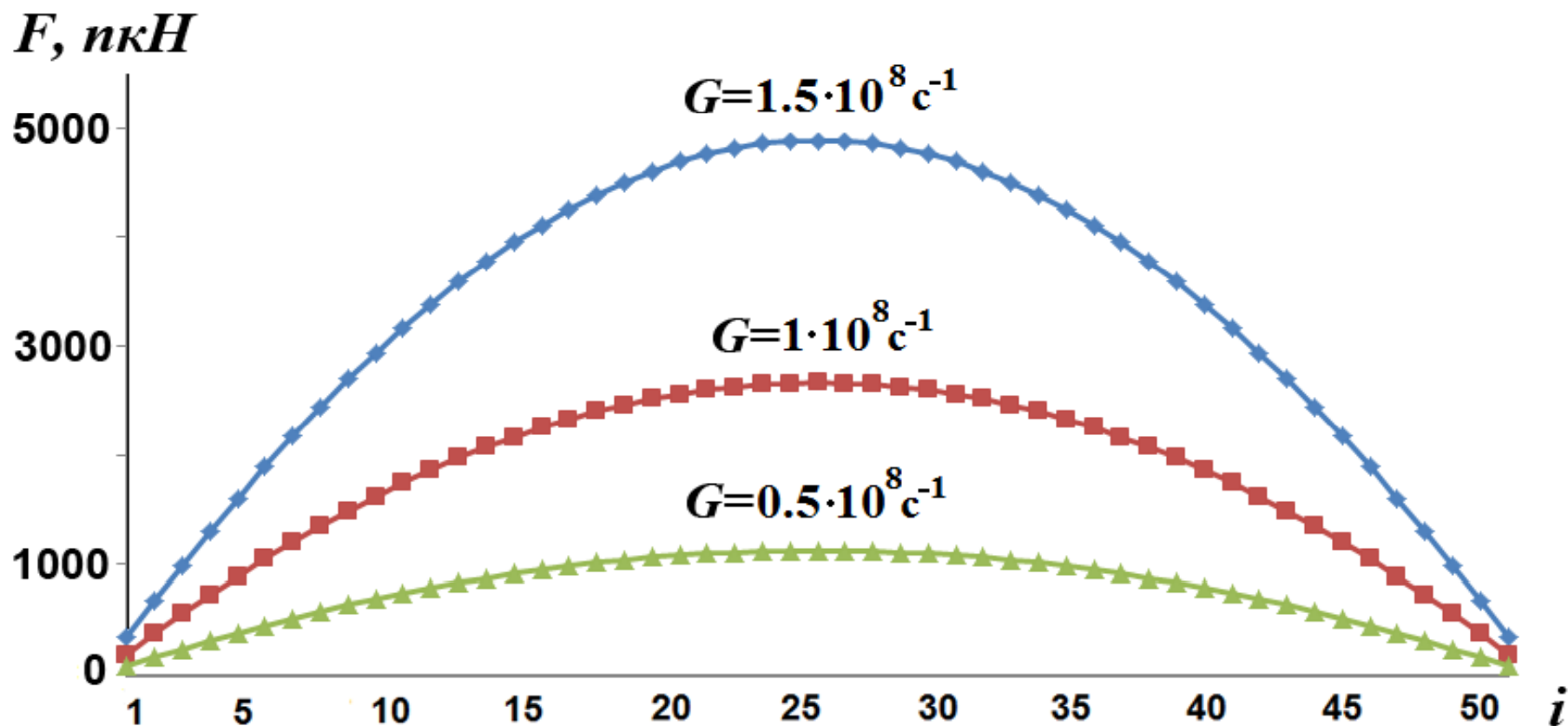
$$G(r, t) \equiv \left| \frac{\partial V}{\partial r} \right| = 2 \frac{R^2}{r^3} \left| \frac{dR}{dt} \right|$$

Моделирование растяжения фрагмента ДНК в высокоградиентном течении



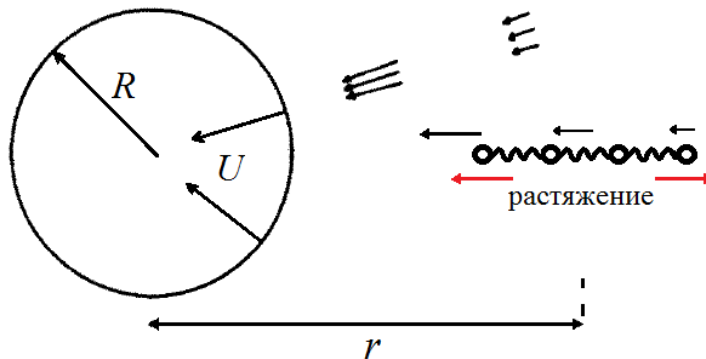
$$F_c = 6 \cdot \pi \cdot \mu \cdot r \cdot V_o$$

Изменение силы растяжения вдоль фрагмента ДНК

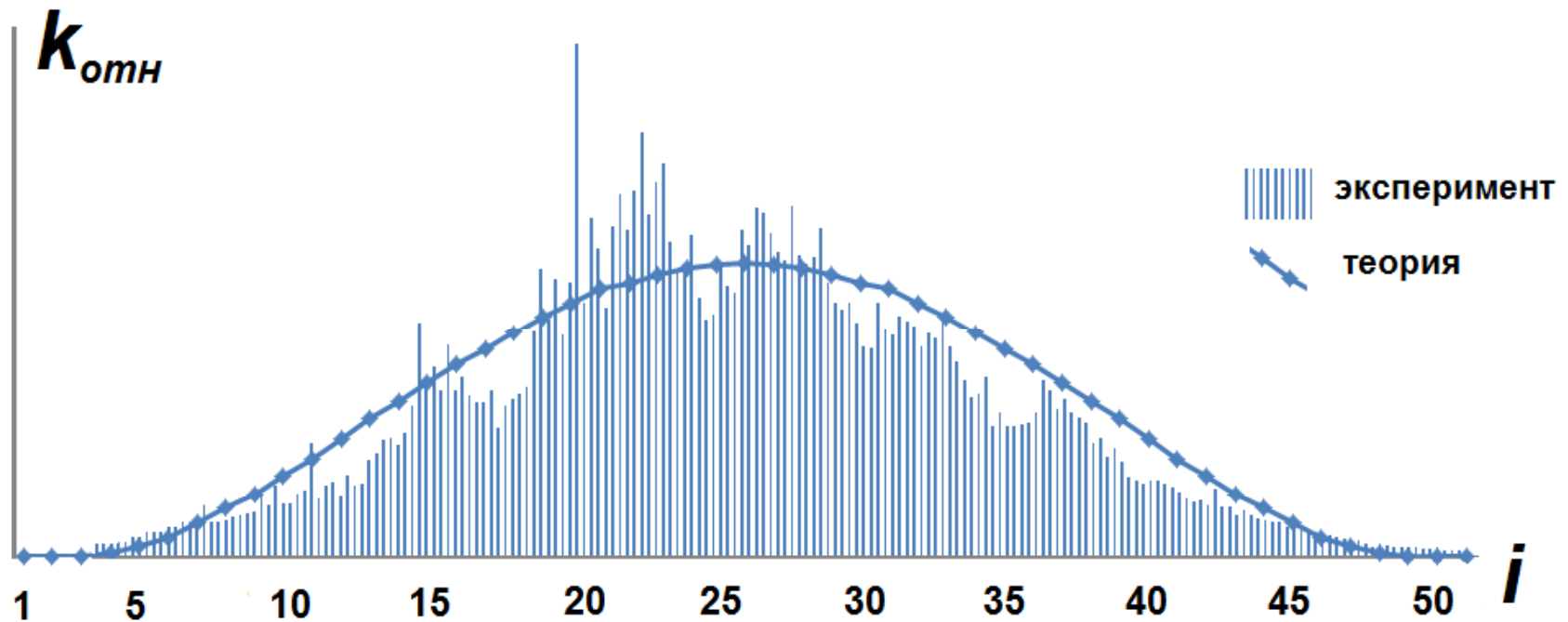


Доля расщепленных фрагментов

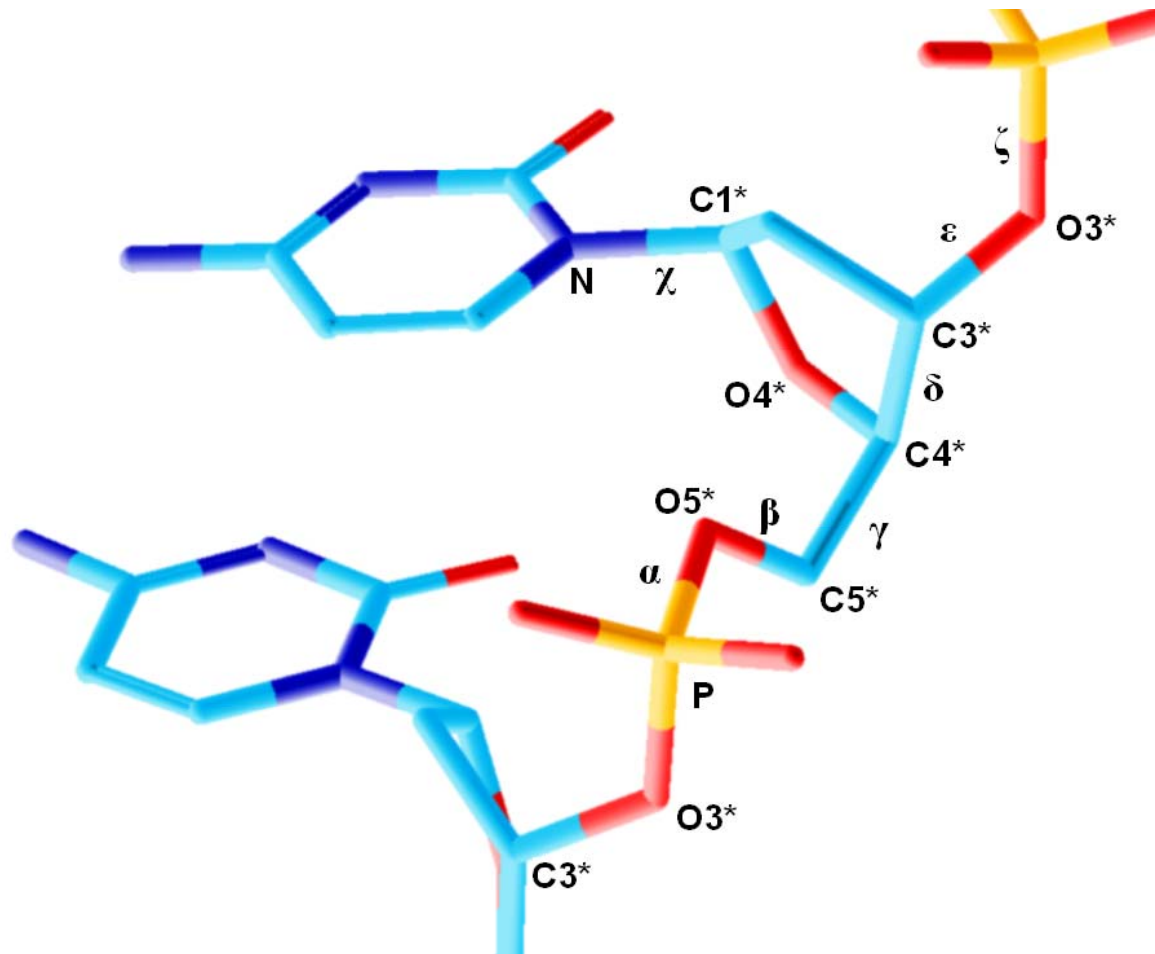
$$k_{отн}^i = \frac{\int\limits_{t,r} 4\pi r^2 n_0 \beta k_0 e^{\frac{\gamma F_i(G(r,t))}{kT}} dt dr}{\int\limits_r 4\pi r^2 n_0 dr}$$



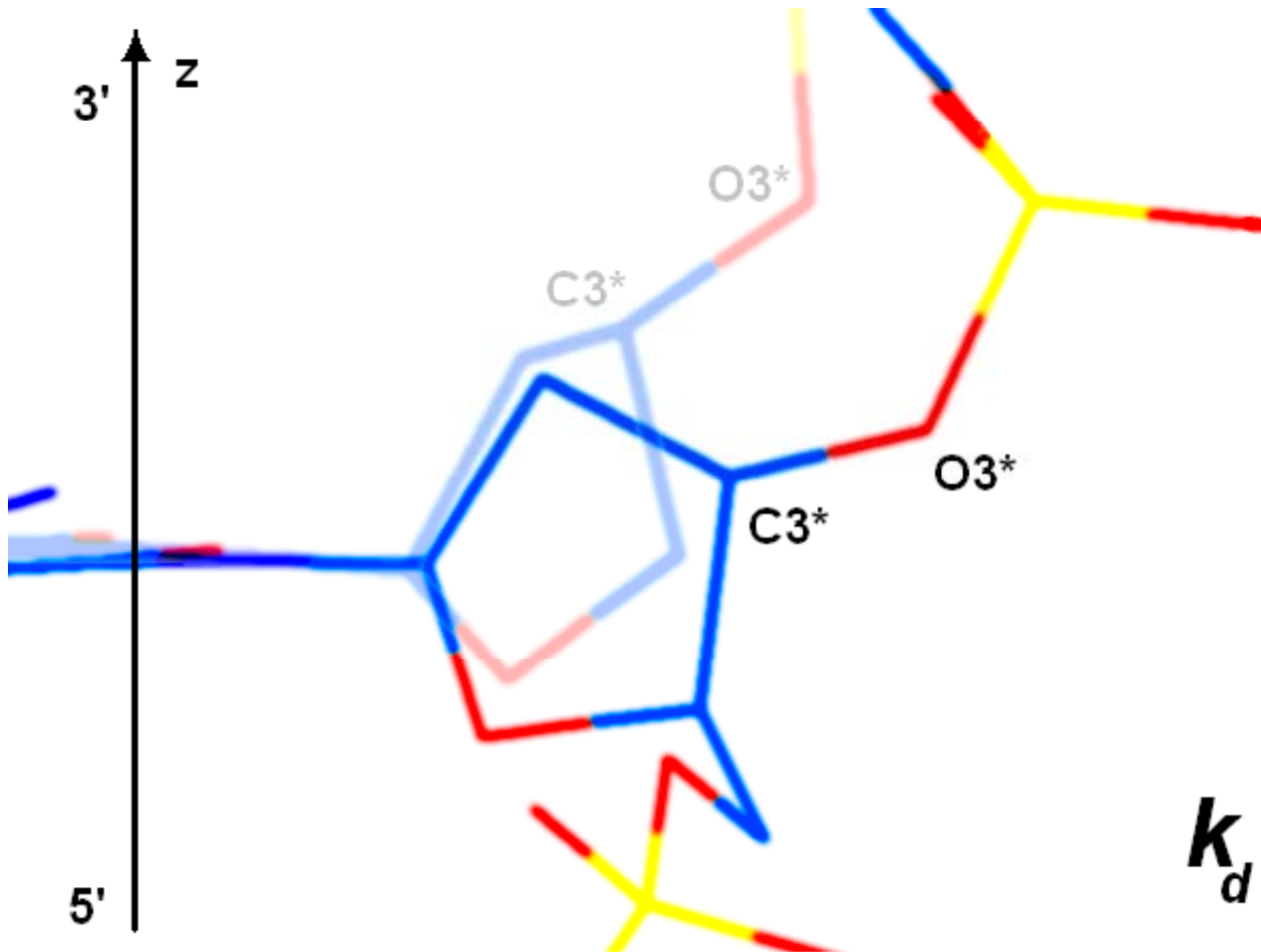
Сравнение результатов моделирования с экспериментальными профилями расщепления ДНК



Интерпретация специфичности расщепления ДНК ультразвуком



Особенность дезоксирибозы цитозина: конформационные переходы типа C2* эндо <---> C3* эндо



$$k_d = k_0 \cdot e^{-\frac{E^* - E(F)}{kT}}$$

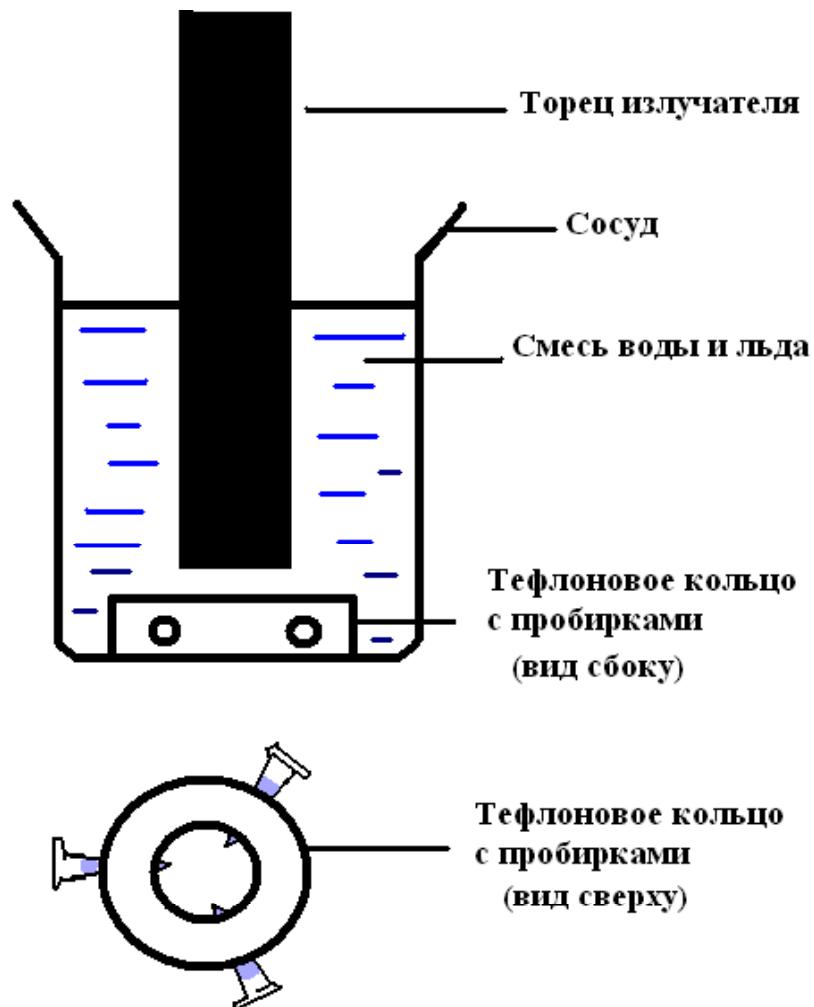
Основные результаты работы

1. Особенности расщепления ДНК под действием ультразвука свидетельствуют о механохимической природе наблюдаемых разрывов.
2. Показано, что возникающие вблизи кавитационных пузырьков высокие градиенты скорости течения жидкости (порядка 10^8 с^{-1}) способны приводить к разрыву фрагментов ДНК длиной в несколько сотен нуклеотидных пар.
3. Увеличение степени расщепления фосфодиэфирной связи, примыкающей к дезоксицитидину, может быть связано с особенностью конформационной динамики дезоксирибозы этого нуклеотида.

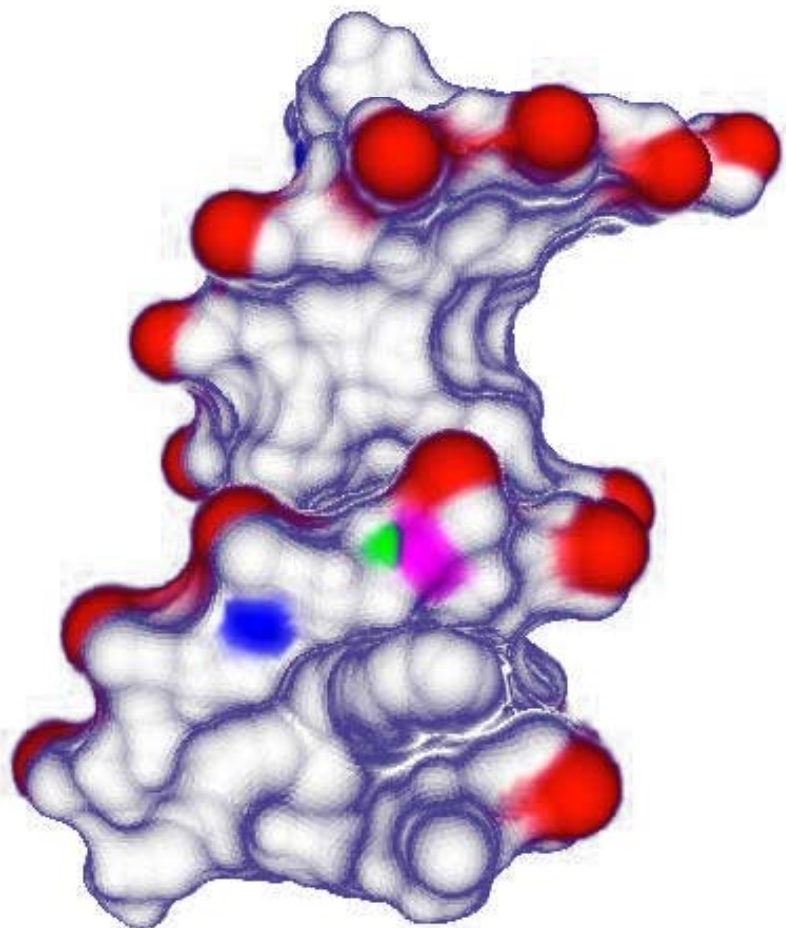
Благодарности

С.Л. Гроховскому,
И.А. Ильичевой,
Р.В. Полозову,
Ю.Д. Нечипуренко,
Н.Г. Есиповой

Схема экспериментальной установки



Анализ доступности для растворителя различных конформаций дезоксирибозы

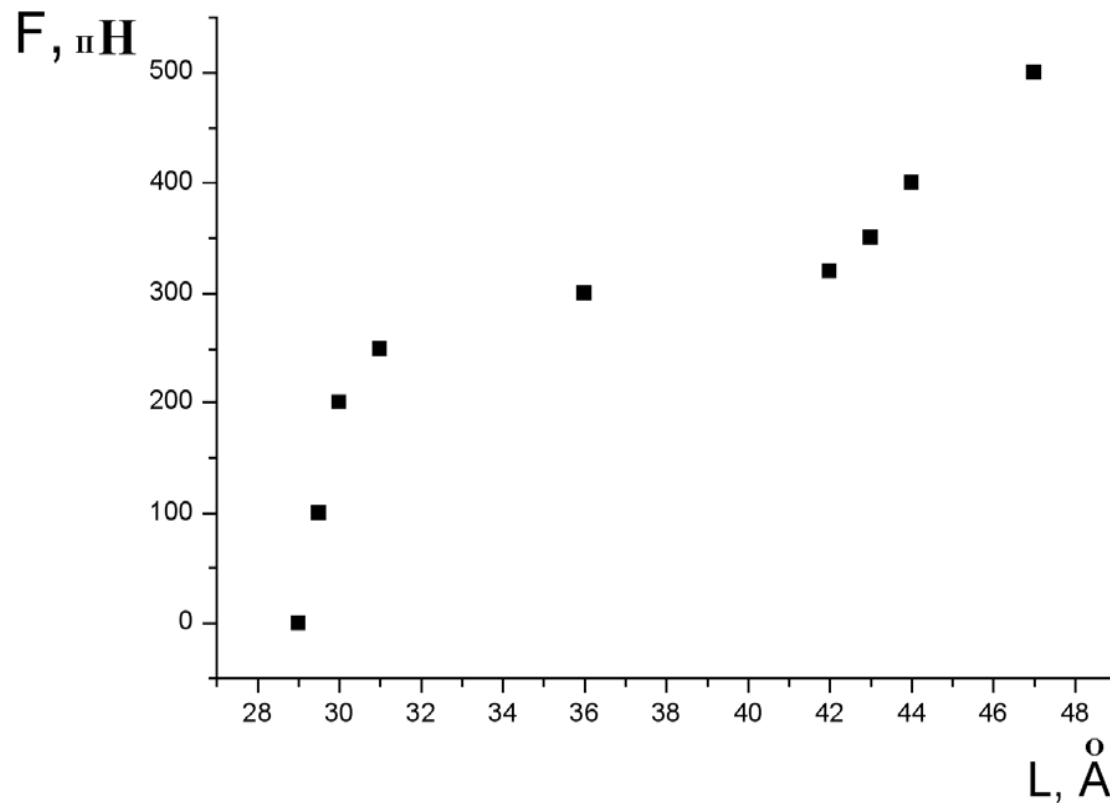


Red	Na
Blue	O3* (C3' эндо)
Green	C3* (C2' эндо)
Magenta	O3* (C2' эндо)

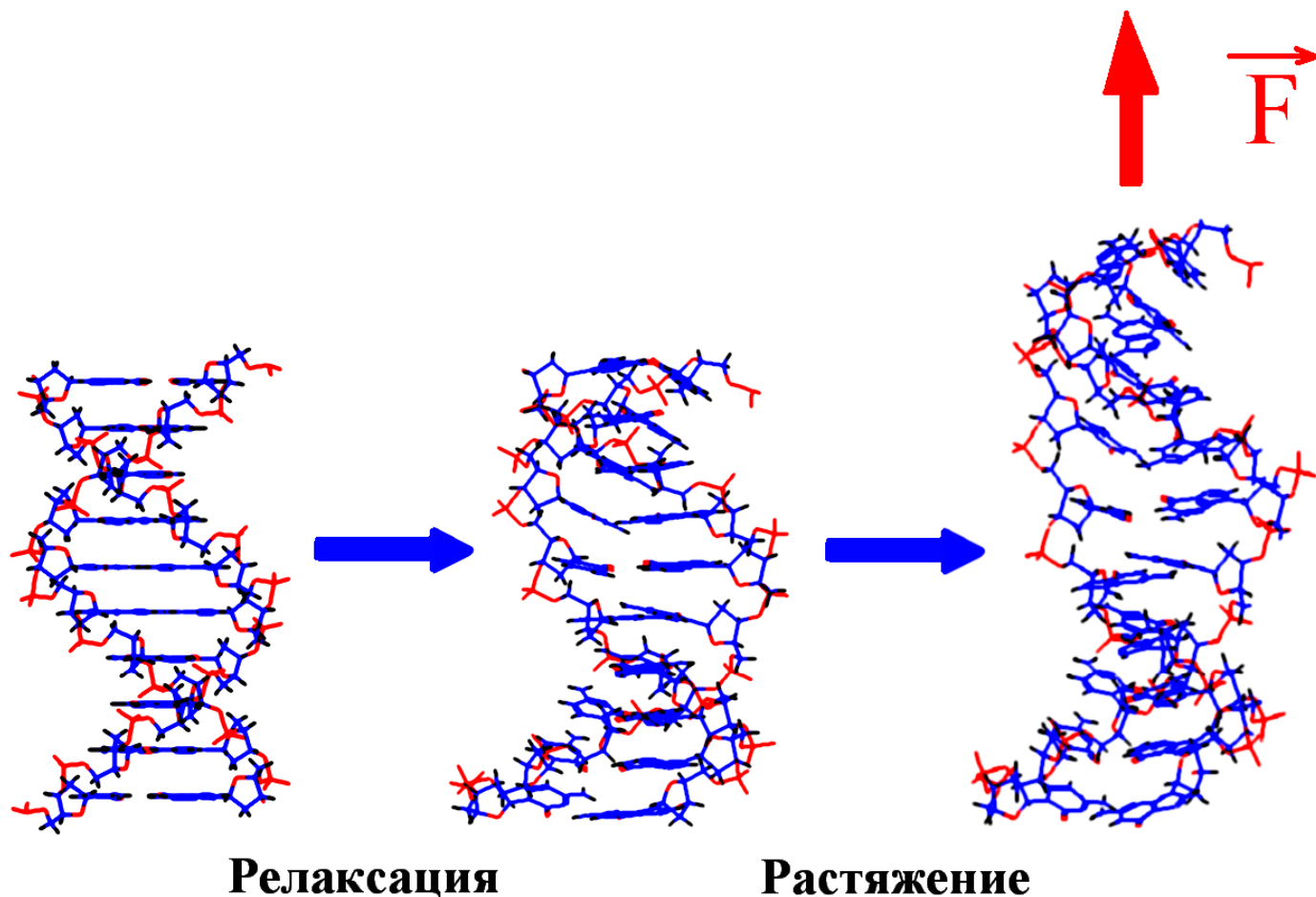
Доля расщепленных фрагментов

$$k_{отн}^i = \frac{\int\limits_{t,r} 4\pi r^2 n_0 \beta k_0 e^{\frac{\gamma F_i(G(r,t))}{kT}} dt dr}{\int\limits_r 4\pi r^2 n_0 dr}$$

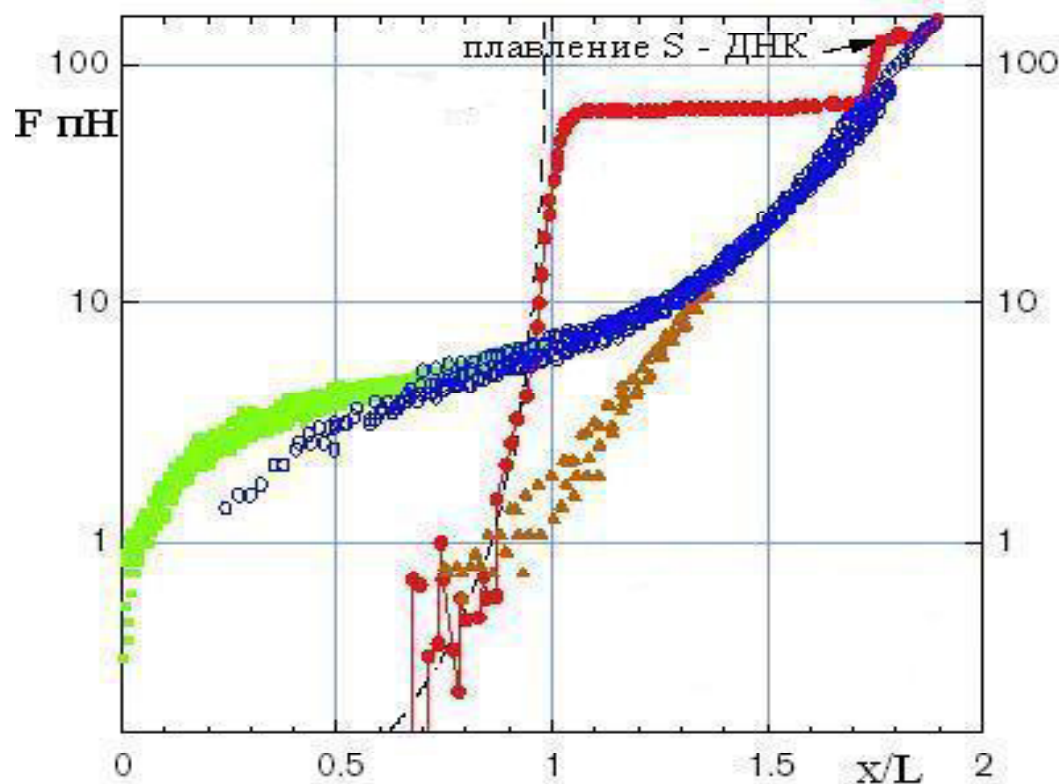
Полученная зависимость растяжения ДНК от приложенной внешней силы



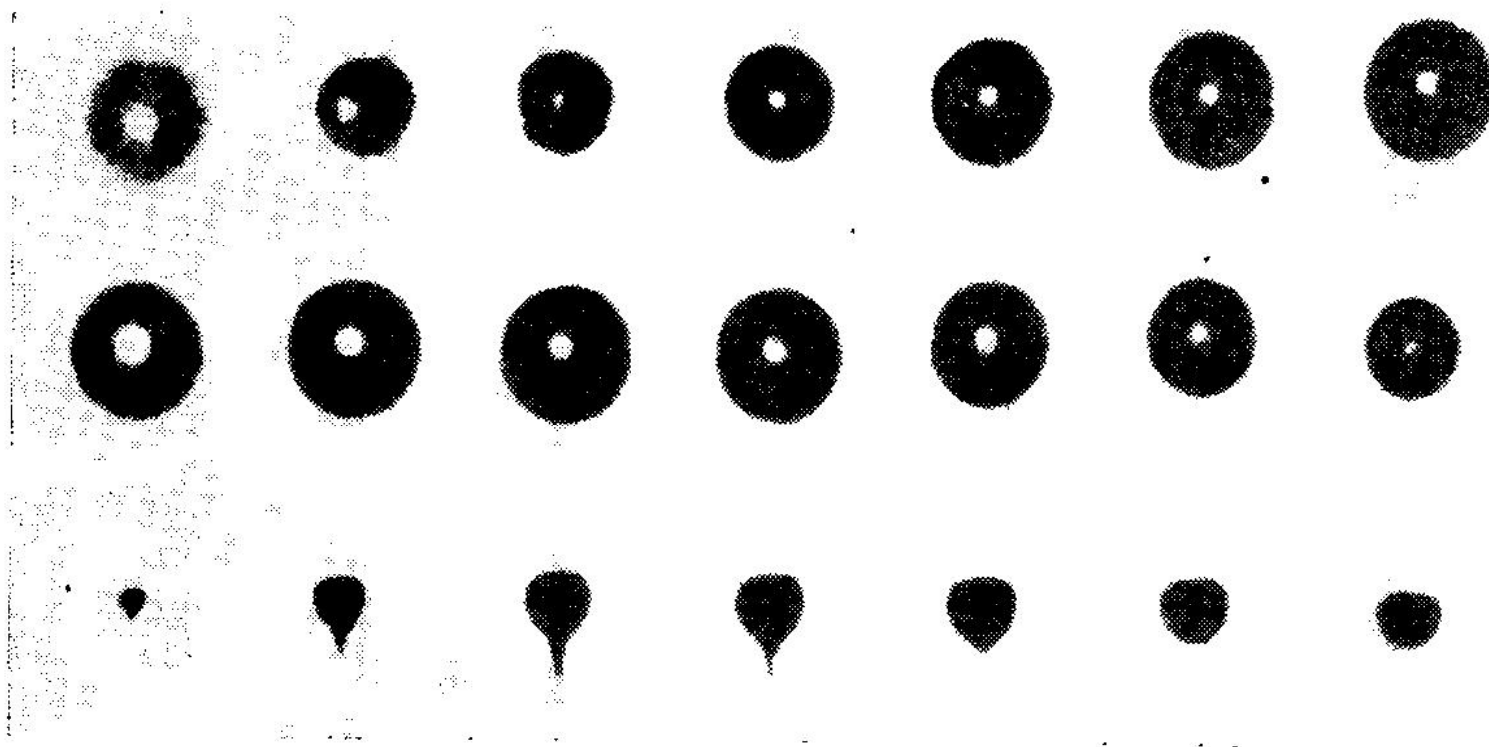
Моделирование растяжения фрагмента ДНК



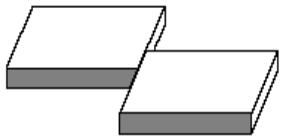
Экспериментальные данные по растяжению единичных молекул ДНК



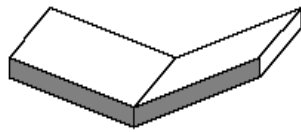
Образование микроструи



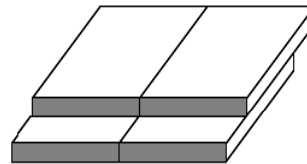
Корреляция взаимодействий с конформациями пар оснований



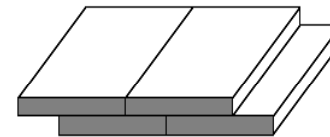
Shear (S_x) : ΔF_x



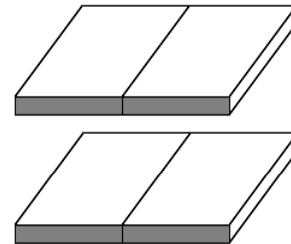
Buckle (κ) : ΔM_x



Shift (D_x) : ΔF_x



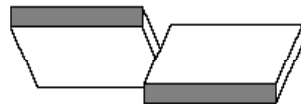
Slide (D_y) : ΔF_y



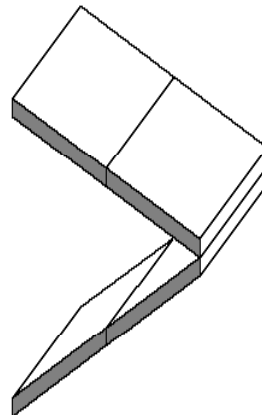
Rise (D_z) : ΔF_z



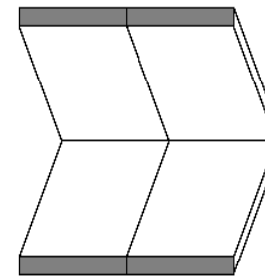
Stretch (S_y) : ΔF_y



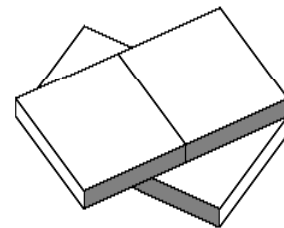
Propeller twist (ω) :
 ΔM_y



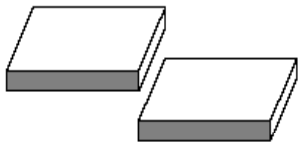
Tilt (τ) : ΔM_x



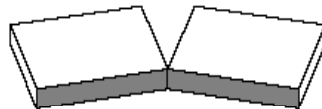
Roll (ρ) : ΔM_y



Twist (Ω) : ΔM_z

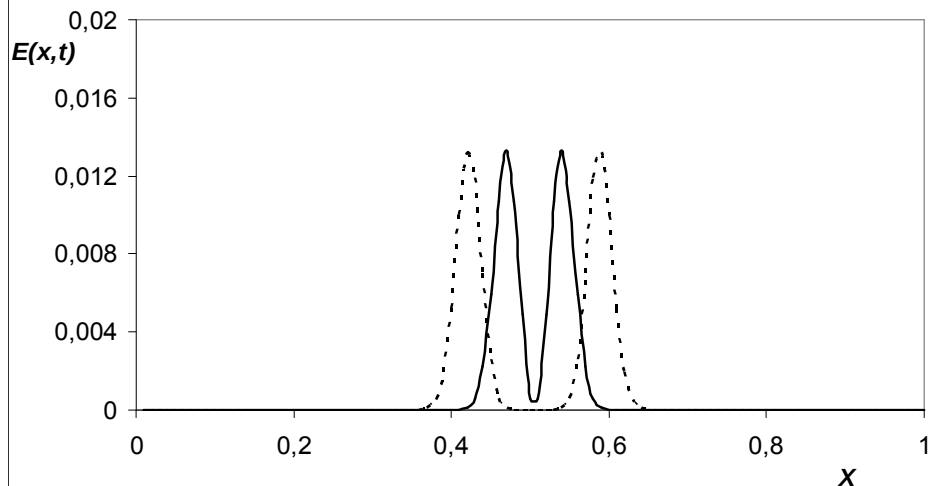


Stagger (S_z) : ΔF_z

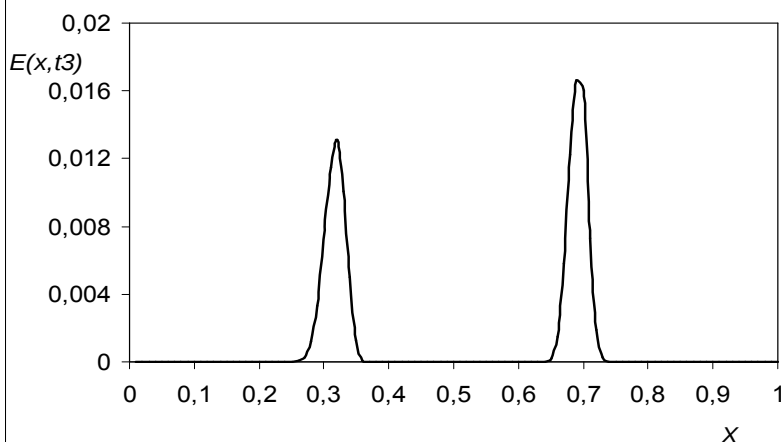


Opening (σ) : ΔM_z

Распространение энергии деформации вдоль струны



Начальный этап
распространения
энергии
деформации



Энергетический
профиль в
момент
достижения
неоднородности