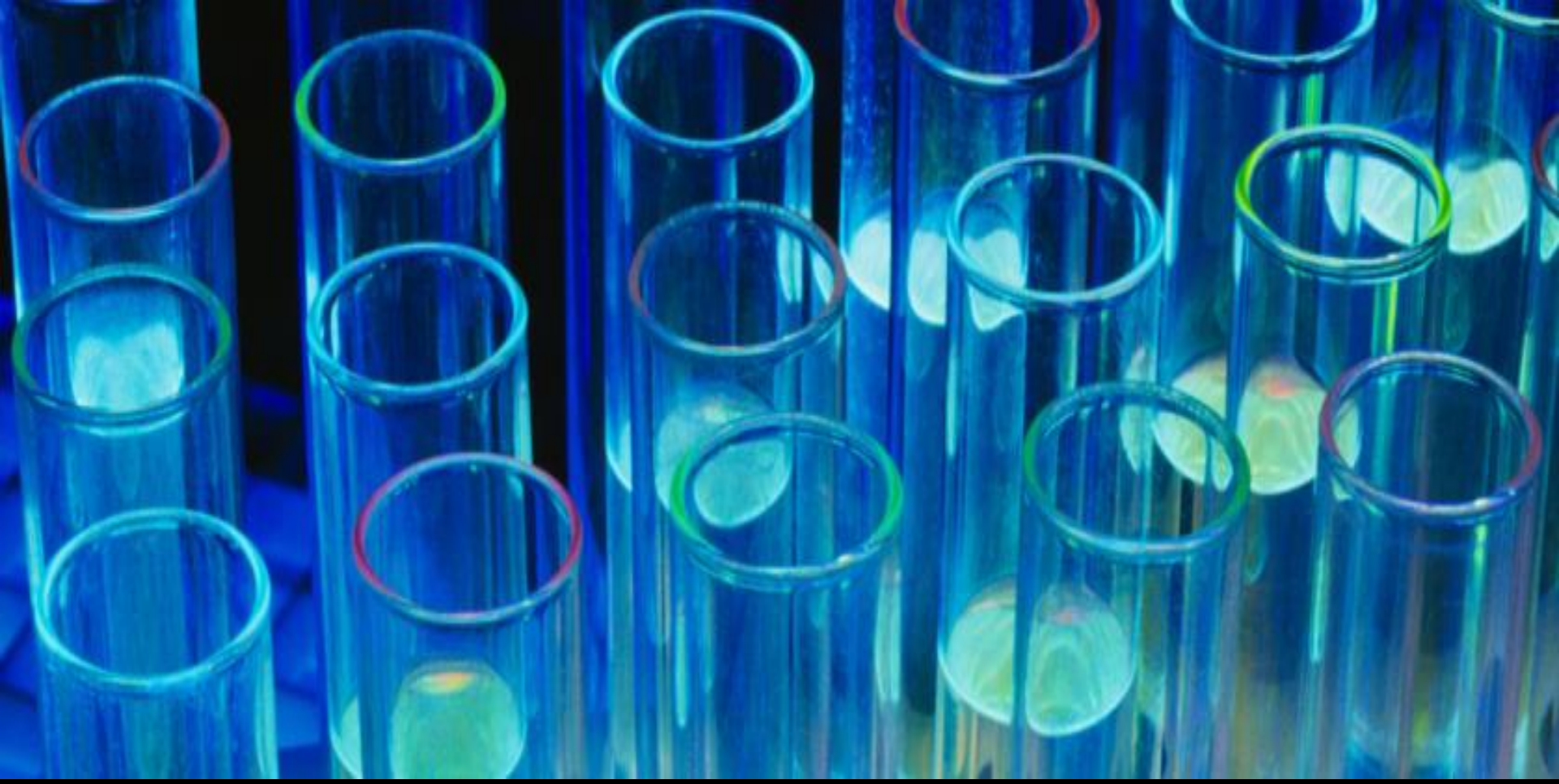
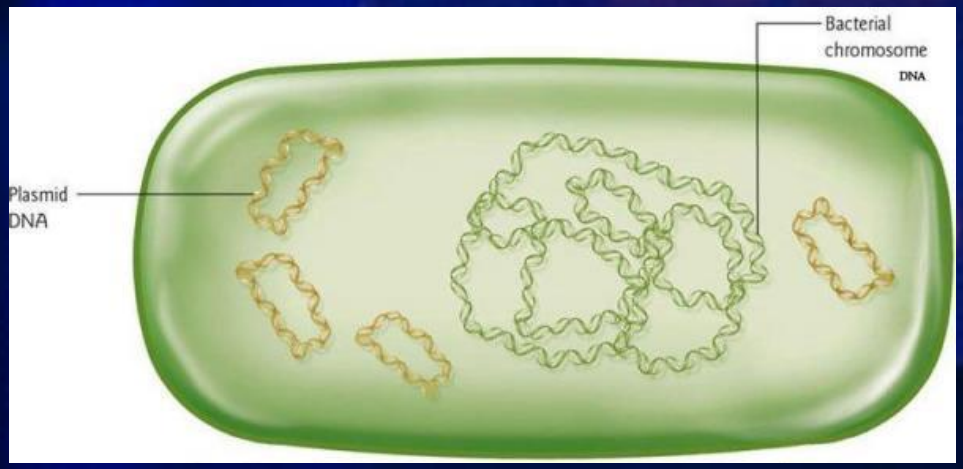


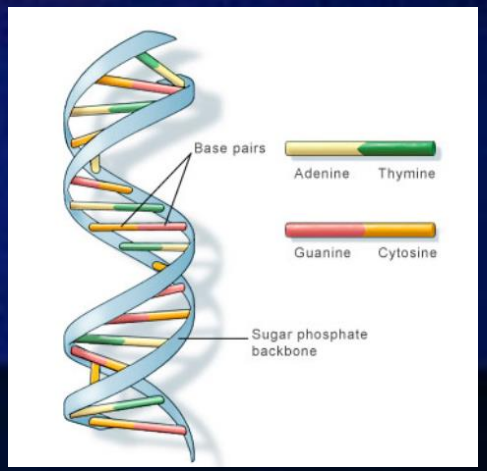
Zastosowanie teorii węzłów do opisu migracji elektroforetycznej DNA

Łukasz Janus, 10 B2

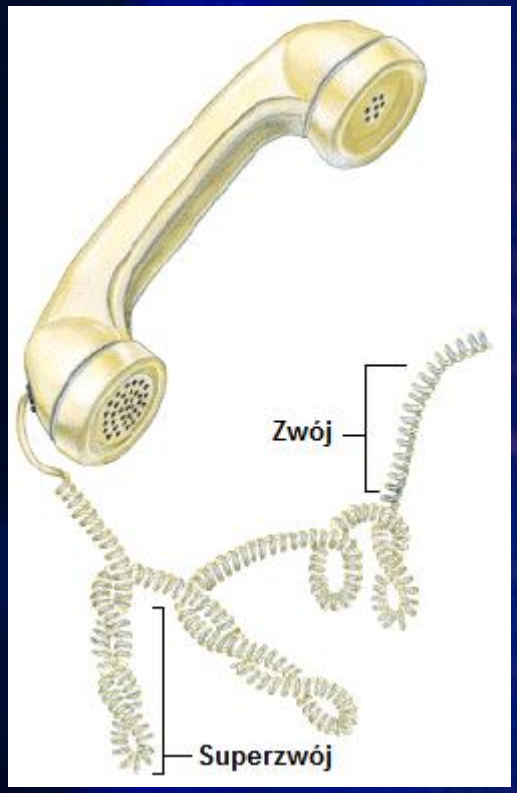
Plazmidy

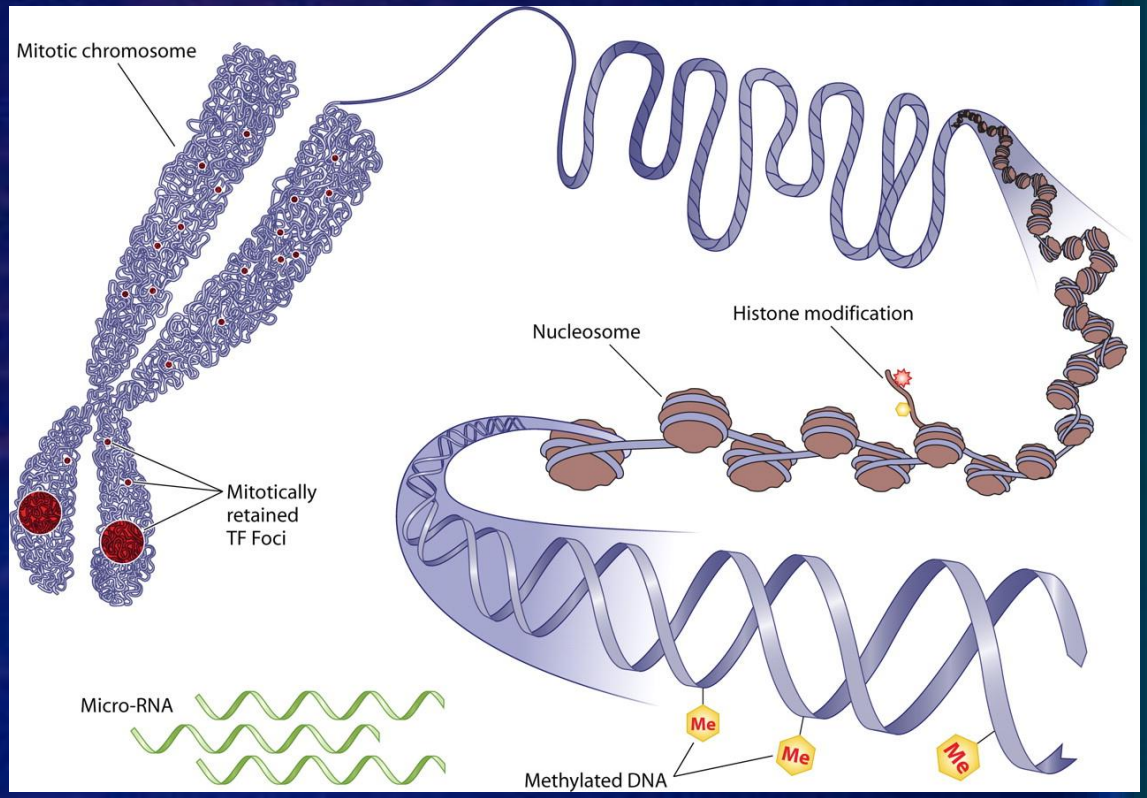
- To cząsteczki DNA – pozachromosomowe
- Zdolne są do samodzielniej replikacji
- Nie niosą genów metabolizmu podstawowego
- Kwas DNA zawiera instrukcje, dzięki którym możliwe jest konstruowanie innych elementów w komórkach, takich jak cząsteczki kwasu RNA czy białka.
- Kwas DNA nie działa sam z siebie i nie działa na inne cząsteczki, ale to enzymy korzystają z zapisanych w nim informacji, czego skutkiem jest replikacja oraz synteza białek



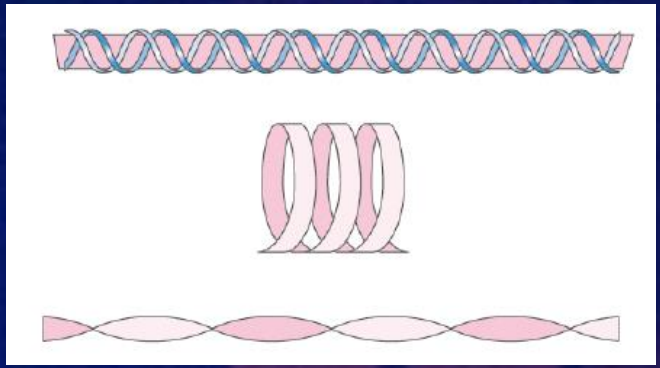


DNA tworzy skomplikowane WĘZŁY !
Posiada wiele stopni upakowania





Węzły w łańcuchu DNA



- Wyobraźmy sobie taśmę z dwoma brzegami, w środku znajduje się oś w przestrzeni. Na taśmie znajduje się łańcuch DNA
- Poprzez skręcenie tasiemki widzimy, że łańcuch DNA również ulega skręceniu tworząc strukturę heliakalną skręconą w jednym kierunku

W biologii:

Liczba spleceń = Liczba skrętów + Liczba zwojów

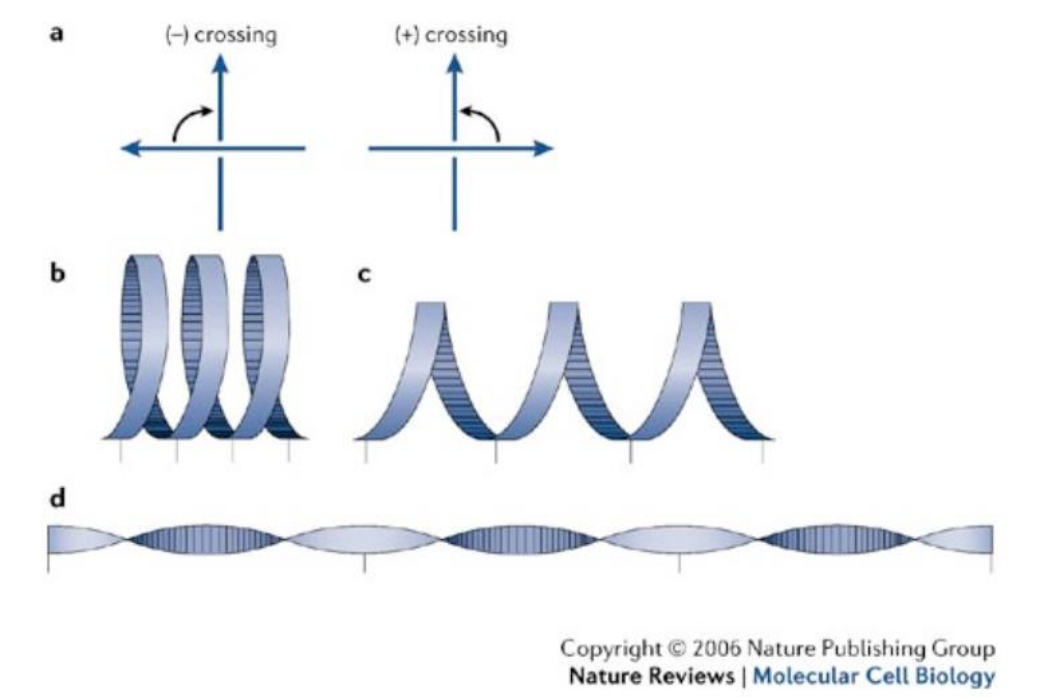
Liczba spleceń jest identycznie obliczana jak w klasycznej teorii węzłów - indeks zaczepienia. Jest to połowa sumy prawych i lewych skrzyżowań.

Liczbę skrętów w biologii liczymy z równania KADROWANIA FERNETA

$$Tw = \frac{1}{2\pi}\int_{\gamma(s)} (T \times N).\dot{N} ds = \frac{1}{2\pi}\int_{\gamma(s)} \tau ds$$

T - styczny wektor jednostkowy do γ (s), N jest pochodną T względem długości łuku γ (s) podzieloną przez jej długość. τ to skręcanie, miara nieplanarności krzywej.

Obliczenia skrętów i zwojów



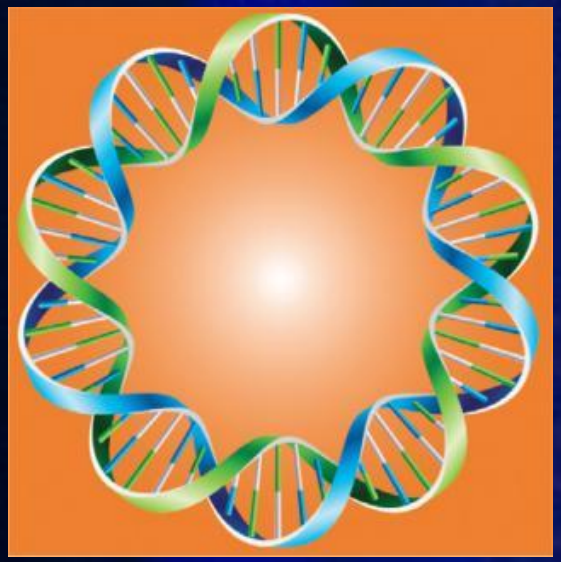
a. Znany nam koncept prawych i lewych skrzyżowań z klasycznej teorii węzłów

b. Struktura wyższego rzędu DNA – rozpatrywana jako zwój. W tym przypadku W = -3, a Tw (skręt) = 0

c. Końce DNA są rozciągane, tak że w tej projekcji nie widzimy zwojów. W maleje, T rośnie

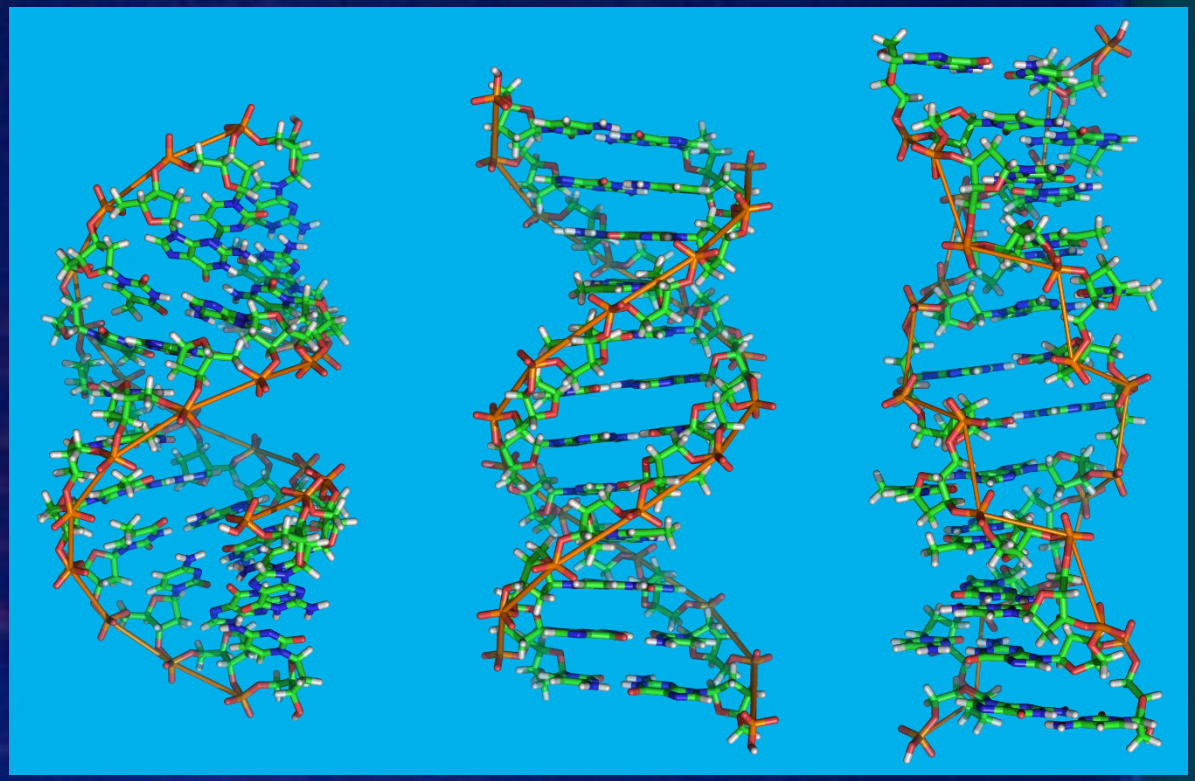
d. Łańcuch DNA został całkowicie rozciągnięty. Ale jest skręcony. Superzwój został całkowicie przetransformowany do skręcenia. Helisa DNA nie jest już trójwymiarowa. T (skręcenie) = -3 zwoje W = 0

Nici DNA są otwartymi węzłami, zamknięte nici tworzą plazmidy.



Zamknięta struktura plazmidu. Struktury takie również mogą występować jak sploty wielu węzłów.

Plazmidy również mogą występować jako węzły nietrywialne.

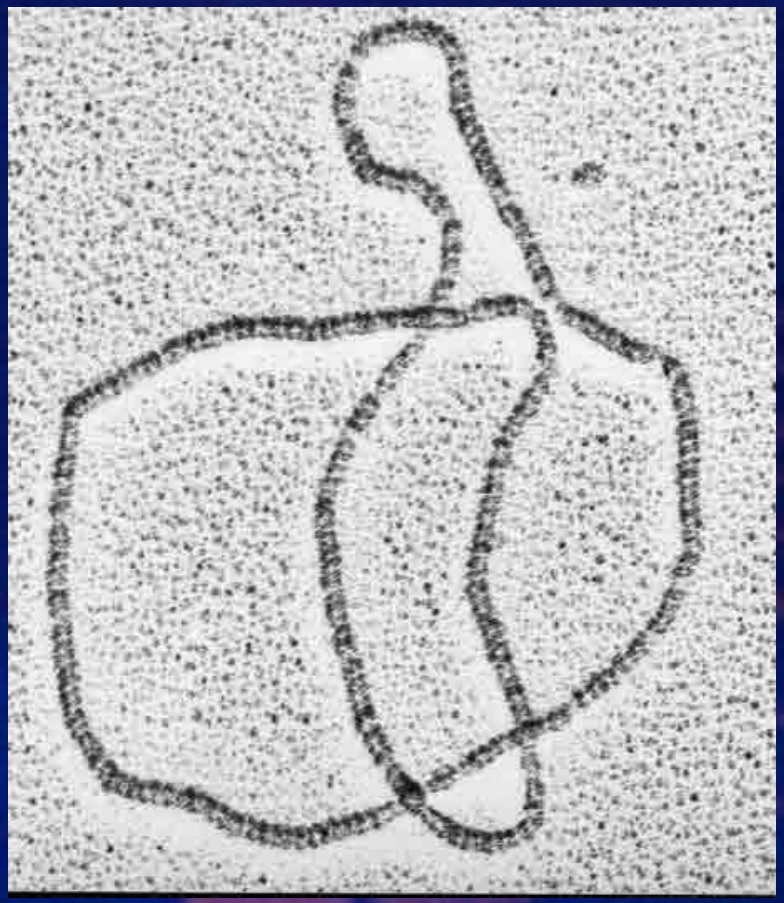


Helisa DNA, b, a, z. W tym przypadku, gry końce nie są połączone struktura topologiczna rozpatrywana jest lokalnie.

np.: Analiza topologiczna miejsca replikacji genów z nici łańcucha DNA, uwzgledniająca działanie enzymów powodujących lokalną zmianę lokalnego charakteru nici węzła DNA.

B: prawoskrętna, fi 2 nm, odległość pomiędzy 0,34 nm, skok helisy 10 zasad – 3,4 nm
A: prawoskrętna, fi 2,6 nm, odległość pomiędzy 0,26 nm, skok helisy 11 zasad – 2,8 nm
Z: lewoskrętna, fi 1,8 nm, odległość pomiędzy 0,37 nm, skok helisy 12 zasad – 4,5 nm

Zdjęcie mikroskopowe węzła DNA



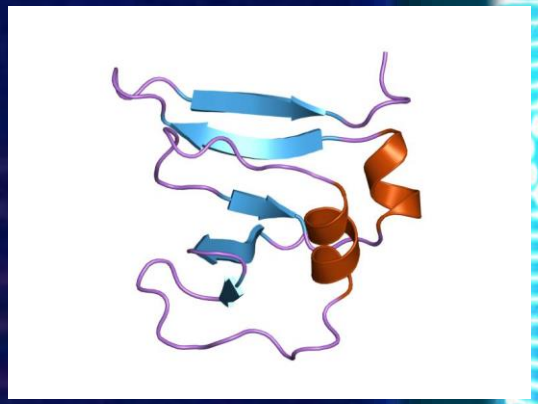
Węzeł DNA – trójlistnik – bakteria E. coli

Topoizomerazy i rekombinazy

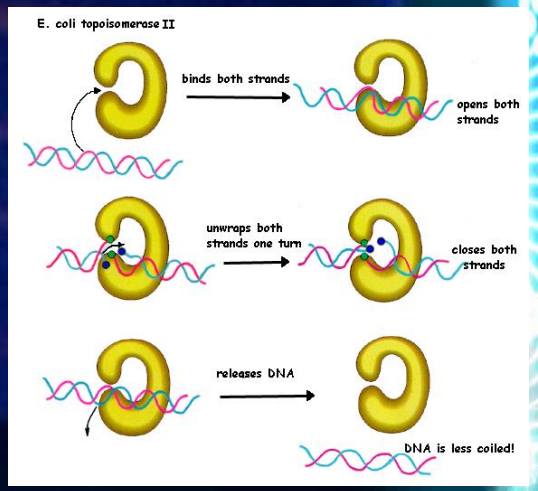
- Wszelkiego rodzaju zmiany DNA dokonywane poprzez enzymy mają charakter topologiczny.

- Topoizomerazy to izomerazy, mają zdolność zmiany topologii węzła DNA

- Topoizomerazy umożliwiają dzięki modyfikacjom nici DNA zachodzenie transkrypcji, rekombinacji i replikacji

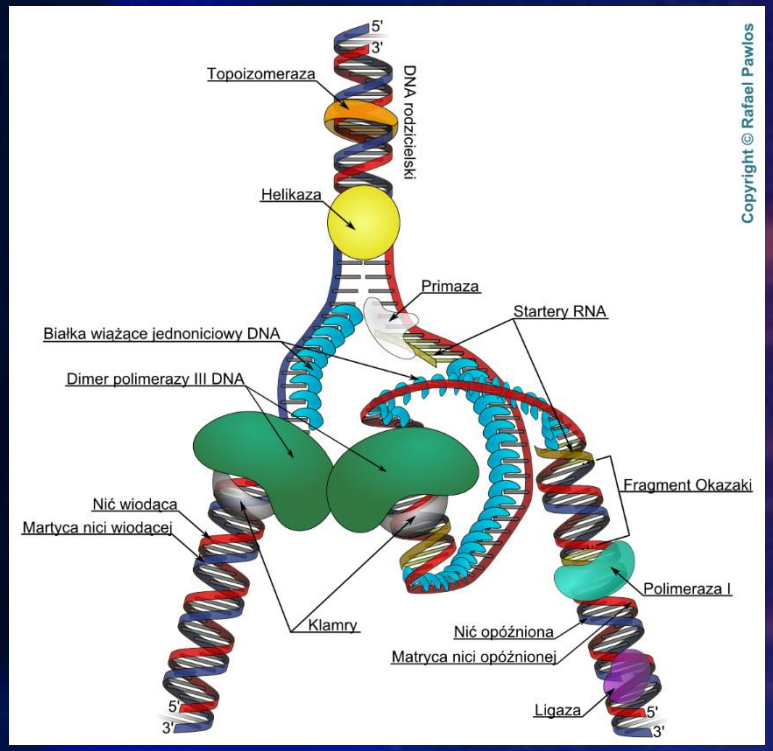


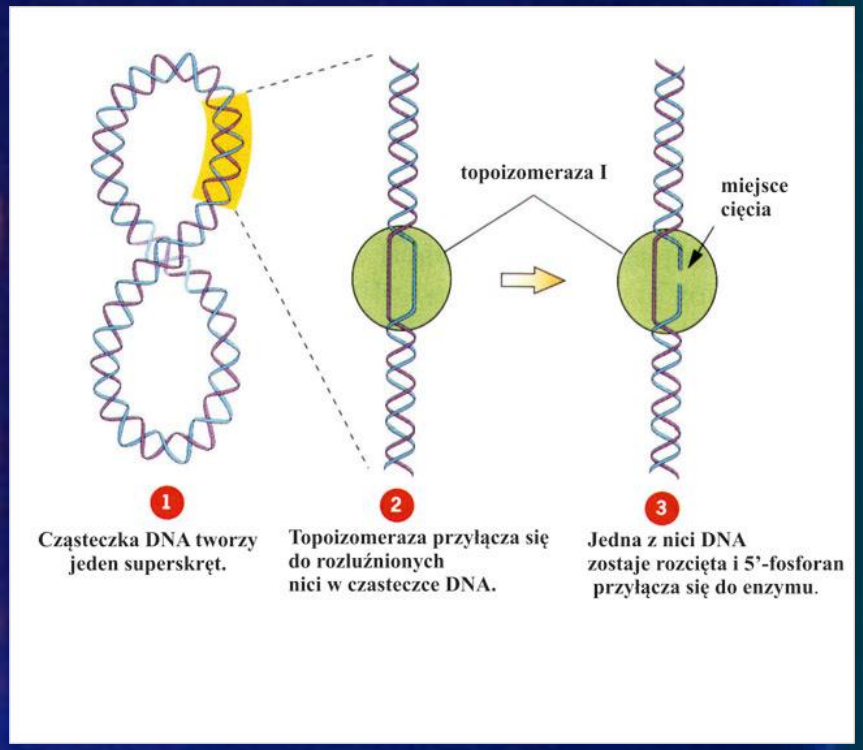
- Topoizomeraza I – zmienia liczbę spleceń DNA z krokiem co 1
  - Działają tylko na pojedynczej nici DNA
  - Ich zadaniem jest modyfikacja superzwojowej struktury DNA
  - Są konieczne do replikacji, podczas replikacji helisa jest
  - rozluźniana i rozplątywana
  - Jeżeli zwoje są zbyt ciasne cząsteczka DNA może się złamać
  - Brak topoizomerazy I powoduje śmierć komórek



- Topoizomeraza II – zmienia liczbę spleceń DNA z krokiem co 2

Aby możliwa była replikacja DNA, należy miejscowo rozplatać nadstrukturalną postać łańcucha DNA

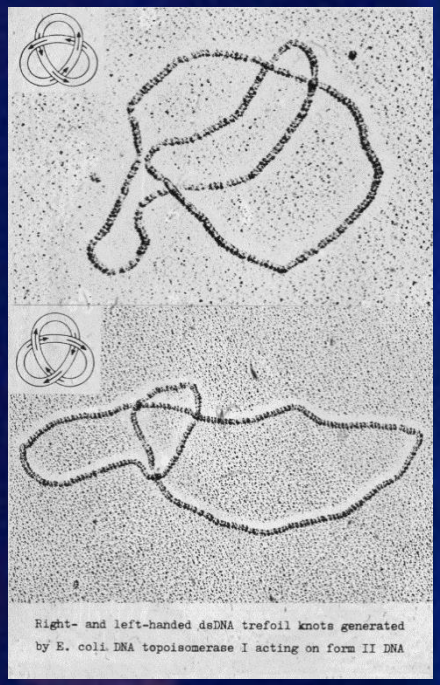




- Topoizomeraza II – zmienia liczbę spleceń DNA z krokiem co 2
  - Działają na dwie nici DNA
  - Nici są cięte, następuje przemieszczenie przestrzenne nici
  - Zachodzi lokalna zmiana topologii miejsca cięcia
  - Przecięte nici są łączone
  - Topoizomerazy DNA II – zmieniają TYP WĘZŁĄ
  - Dokonują UPROSZCZENIA TOPOLOGICZNEGO

Dlaczego teoria węzłów potrzebna jest w biologii ?

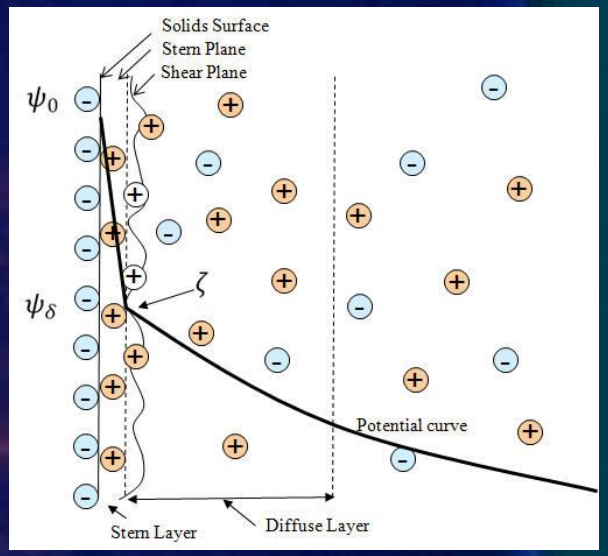
- Niemożliwe jest obserwowanie bezpośrednie działania topoizomeraz
- Znamy tylko stan początkowy i końcowy układu DNA
- Badając liczbę węzłów w cząsteczce DNA możliwe jest badanie mechanizmu działania topoizomeraz i zmian strukturalnych cząsteczek DNA
- Niemożliwe jest obecnie obserwowanie działania topoizomeraz, ale możliwe jest ocenianie aktywności topoizomeraz poprzez badanie produktów reakcji do których się przyczyniają
- Badanie tych produktów prowadzone jest elektroforetycznie
- Węzły o tej samej masie molowej mogą tworzyć topologicznie inne cząsteczki. Posiadają inną liczbę skrzyżowań itd.
- Elektroforeza potrafi odróżnić cząsteczki DNA o różnym stopniu zawęźlenia, o różnej liczbie skrzyżowań



Right- and left-handed dsDNA trefoil knots generated by E. coli DNA topoisomerase I acting on form II DNA

Elektroforeza żelowa

- Plazmid – to dwuniciowa nić DNA naładowana ujemnie, występująca u bakterii
- Tworzy cząsteczki koloidalne, do opisu zachowania się plazmidów stosujemy klasyczną teorie elektroforetyczną
- Na granicy faz DNA / roztwór występuje skokowa zmiana potencjału – potencjał elektrokinetyczny. Stała (co do znaku) polaryzacja umożliwia jednokierunkowy ruch węzłów DNA do anody.
- Plazmidy tworzą koloidy liofilowe, otoczone otoczką hydratacyjną występują oddziaływania dipol – dipol, dipol - jon
- Elektroforeza – to ruch cząstek fazy rozproszonej (węzeł DNA) w polu elektrycznym, względem nieruchomego ośrodka (żel agarozowy)



Elektroforeza żelowa

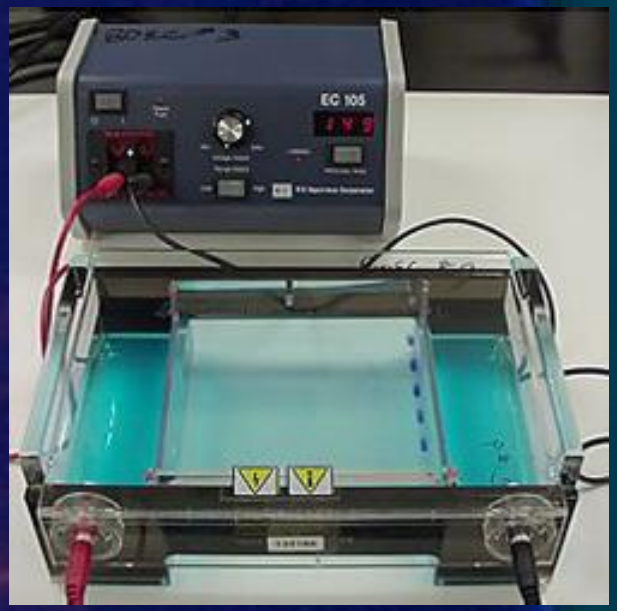
- Pomiędzy płaskimi elektrodami wytwarza się jednorodne pole elektryczne dane wzorem:

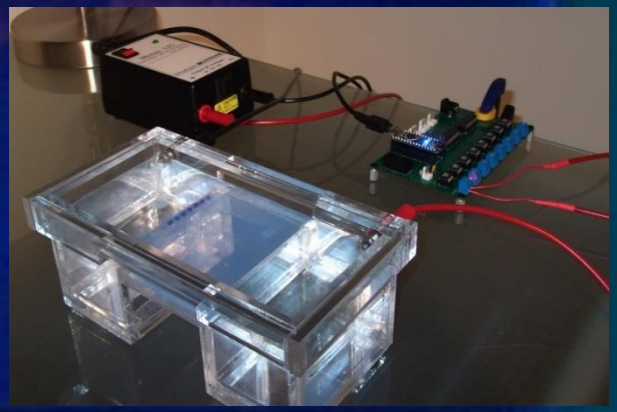
$$E = \frac{U}{l}$$

- Naładowane elektrycznie węzły DNA poruszają się w polu elektrycznym o natężeniu E ruchem jednostajnym ze stałą równowagową prędkością v.

- Ruchliwość elektroforetyczna to :

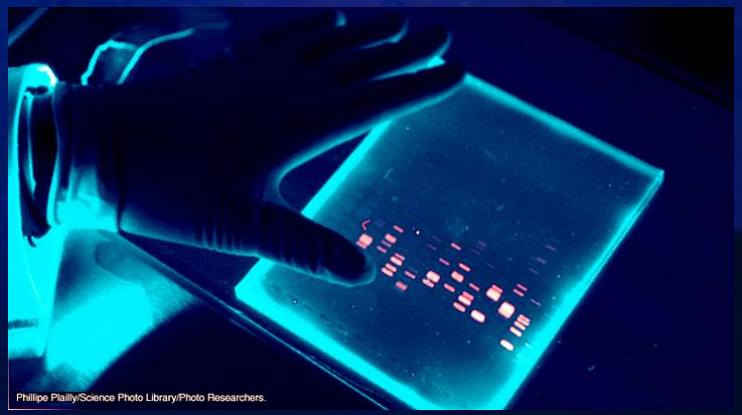
$$u = \frac{v}{E} = \frac{v\,l}{U}$$





Teoria węzłów w opisie wędrówki fragmentów DNA w żelu elektroforetycznym.

- Wędrówka fragmentów DNA w żelu zależy od właściwości żelu elektroforetycznego - wielkości porów i zwisających końców
- Oddziaływania topologiczne pomiędzy cząstkami żelu a DNA mogą być opisane poprzez liczbę splątania. Oddziaływania pętli węzłów z żelem (zaczepianie fragmentów pętli DNA o zwisające fragmenty żelu) powodują brak zależności liniowej pomiędzy liczbą splątania a ruchliwością elektroforetyczną w średnich polach elektrycznych
- W elektroforezie 2D prążki na żelu charakteryzują się kształtem łukowym. Gdy gęstość końców zwisających zanika prążki się prostują
- Kształt łuków można przewidywać korzystając z zależności masy cząsteczkowej od złożonych właściwości topologicznych



Topologia a elektroforeza

- Podczas transkrypcji następuje lokalna zmiana skręcenia nici DNA
- Topoizomerazy usuwają węzły oraz katenany
- Stan topologiczny cząsteczki DNA ustala się metodą elektroforetyczną.
- Ustalono eksperymentalnie, że:

Ruchliwość naładowanej cząsteczki DNA w polu elektrycznym zależy od jej kształtu i topologii

- Dzięki elektroforezie żelowej (dokładana metoda analityczna) możliwe jest rozróżnianie węzłów. Możliwe jest rozróżnianie plazmidów z różną ilością superskrętów.
- Metoda 2D – polega na przykładaniu pola elektrycznego do żelu w kierunku y, a następnie w kierunku x. Dzięki temu zwiększa się rozdzielczość oraz czułość metody.

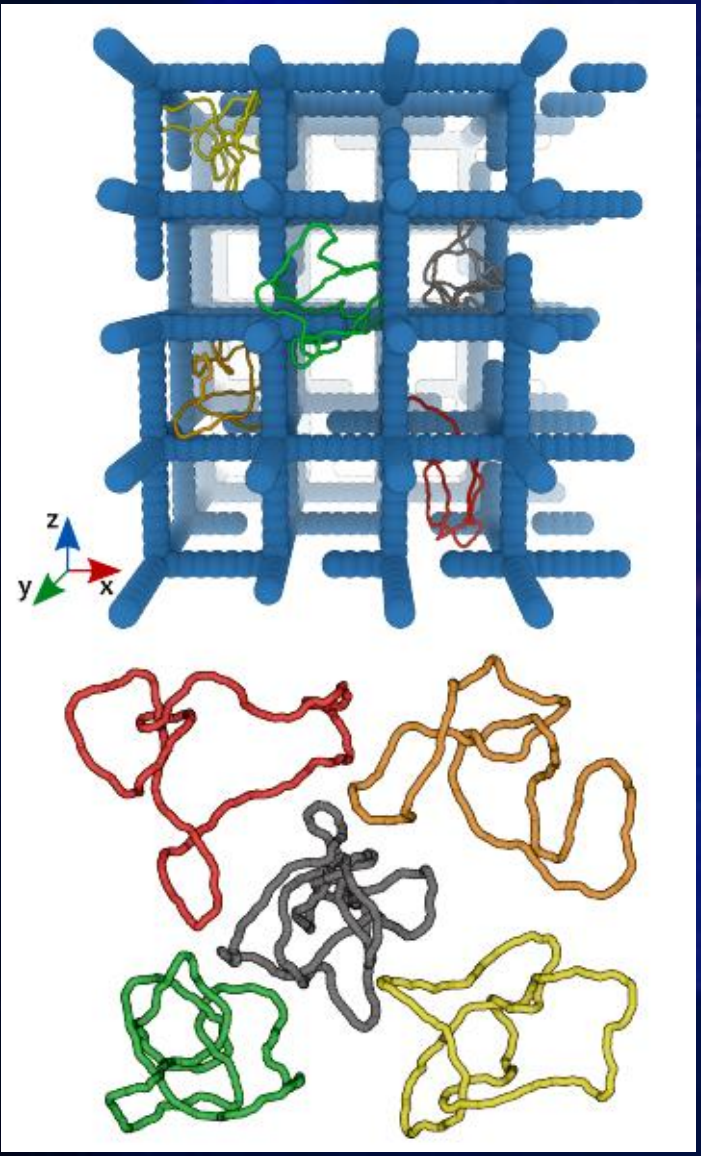
Ruch zrelaksowanych cząsteczek DNA w rzadkim żelu i słabym polu

- Zjawisko elektroforezy w pełni opisuje chemia fizyczna. W praktyce jednak węzły nie dają przewidywalnych wyników. Znamy tylko zależności empiryczne ruchliwość – topologia DNA.
- Wiadomo, że ponacinane zrelaksowane DNA, z usuniętymi naprężeniami torsyjnymi w rzadkim żelu zachowują się jak cząsteczki sedymentujące w polu grawitacyjnym
- Prędkość ruchu oblicza się porównując natężenie pola elektrycznego i siłę tarcia proporcjonalna do rozmiaru cząsteczki.
- Bardziej złożone węzły DNA są mniejsze !
- Bardziej złożone węzły DNA poruszają się w żelu szybciej, ze względu na mniejszą zawadę przestrzenną i mniejsze siły tarcia.

Ruch węzłów DNA w gęstym żelu i silnym polu elektrycznym

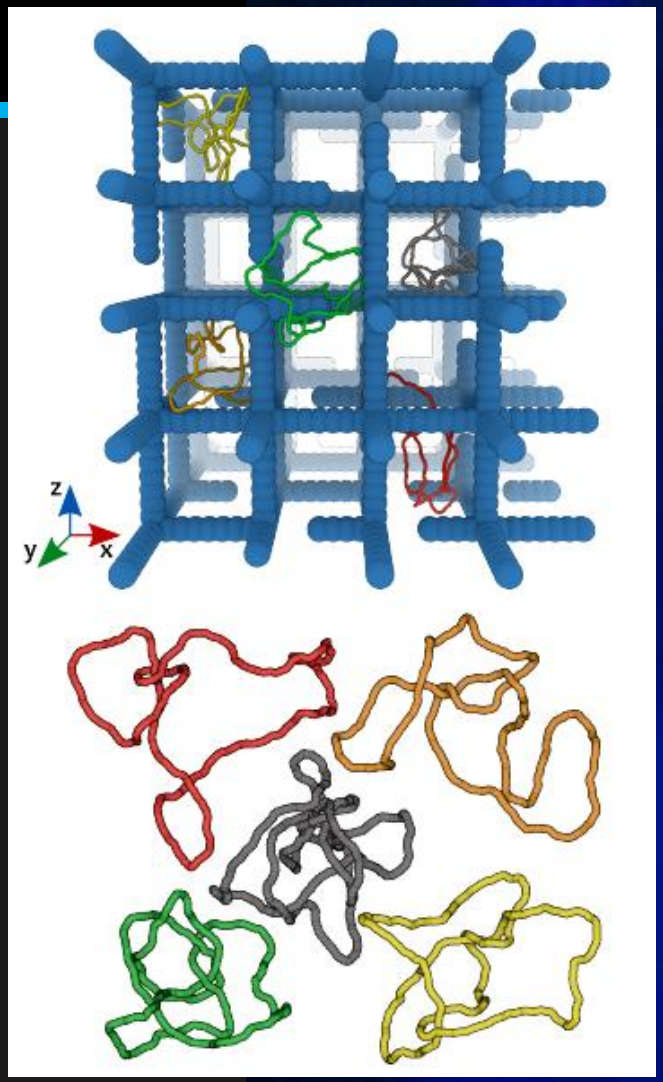
- Ruchliwość węzłów w polu elektrycznym opisana jest niemiotoniczną funkcją złożoności węzła – średniej ilości skrzyżowań
- Węzły poruszają się wolniej im ich średnia ilość skrzyżowań rośnie w silnym polu
- W słabym polu i niskim stężeniu żelu odwrotnie !
- Wyżej wymienione efekty powodują nieliniową zależność między szybkością migracji a złożonością węzła
- W konsekwencji nie uzyskujemy „uśmiechające się” linie prążków elektroforetycznych

Węzły DNA tworzą łuk elektroforetyczny tylko w nieregularnych żelach

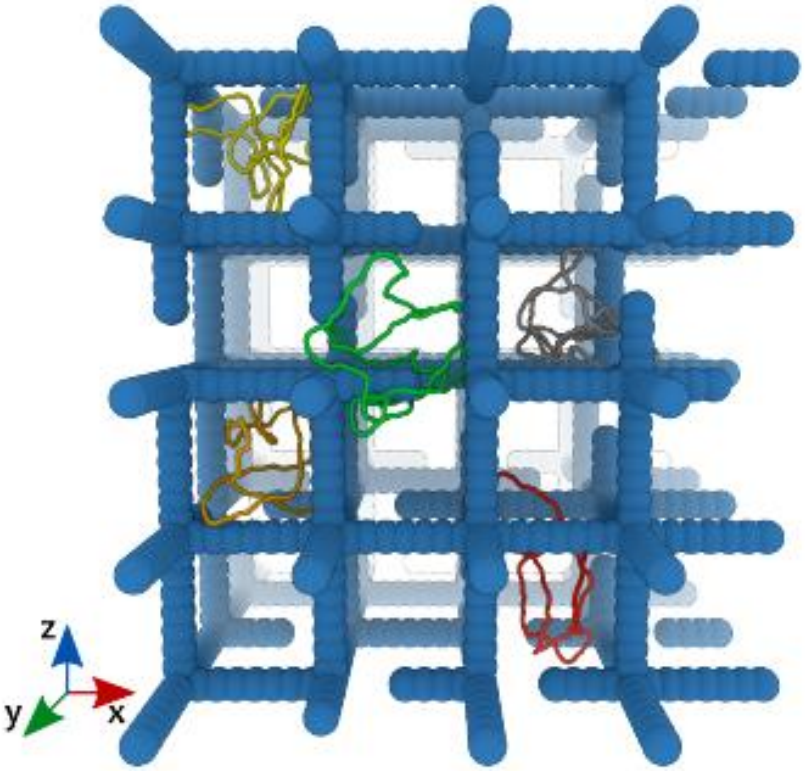


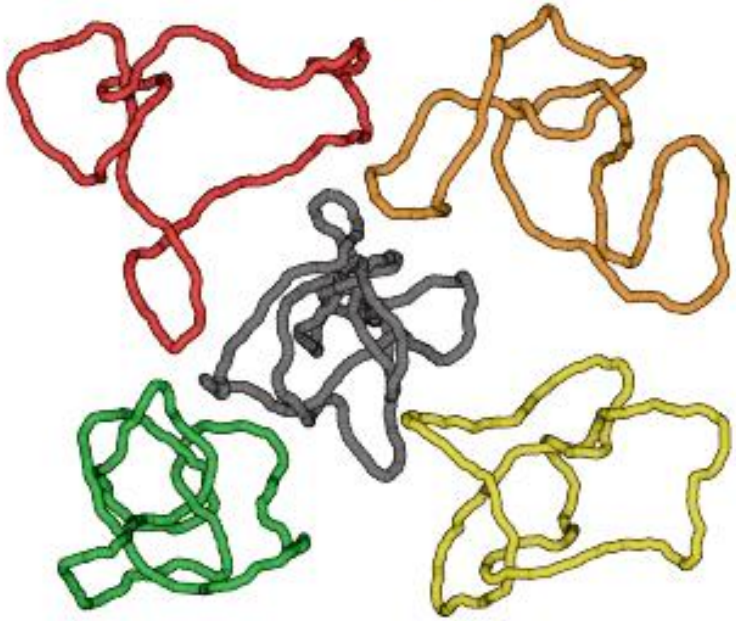
MODEL:

- 10 różnych zrelaksowanych torsyjnie ponacinanych cząsteczek DNA 3,7 kpz w żelu agarozowym ze zwisającymi końcami
- Pętle niesplecione, lub tworzące maksymalnie 9 skrzyżowań (projekcja minimalna)
- Węzły poruszały się w kierunku z przy słabym polu 50 V/cm a następnie w kierunku y w silnym polu 150 V/cm
- Wprowadzona liczba splątania zwiększa się ze wzrostem średniej liczby skrzyżowań



- W modelu przyjęto kubiczną postać żelu posiadającego zwisające końce
- Po obliczeniach okazało się, że model spełnia założenia dla słabego pola (liniowa zależność miedzy ruchliwością a ilością skrzyżowań)
- Czas potrzebny na oddzielenie się DNA od żelu zależy od jego średniej liczby splątania i złożoności węzła. Ruch wywołany natężeniem pola elektrycznego konkuruje z tarciem Stokowskim zwiększającym ruchliwość wraz ze wzrostem średniej ilości skrzyżowań.
- Zjawiska te powodują niemonotoniczne zachowanie ruchliwości elektroforetycznej w odniesieniu do średniej liczby skrzyżowań powodując „uśmiechanie się” prążków elektroforetycznych.

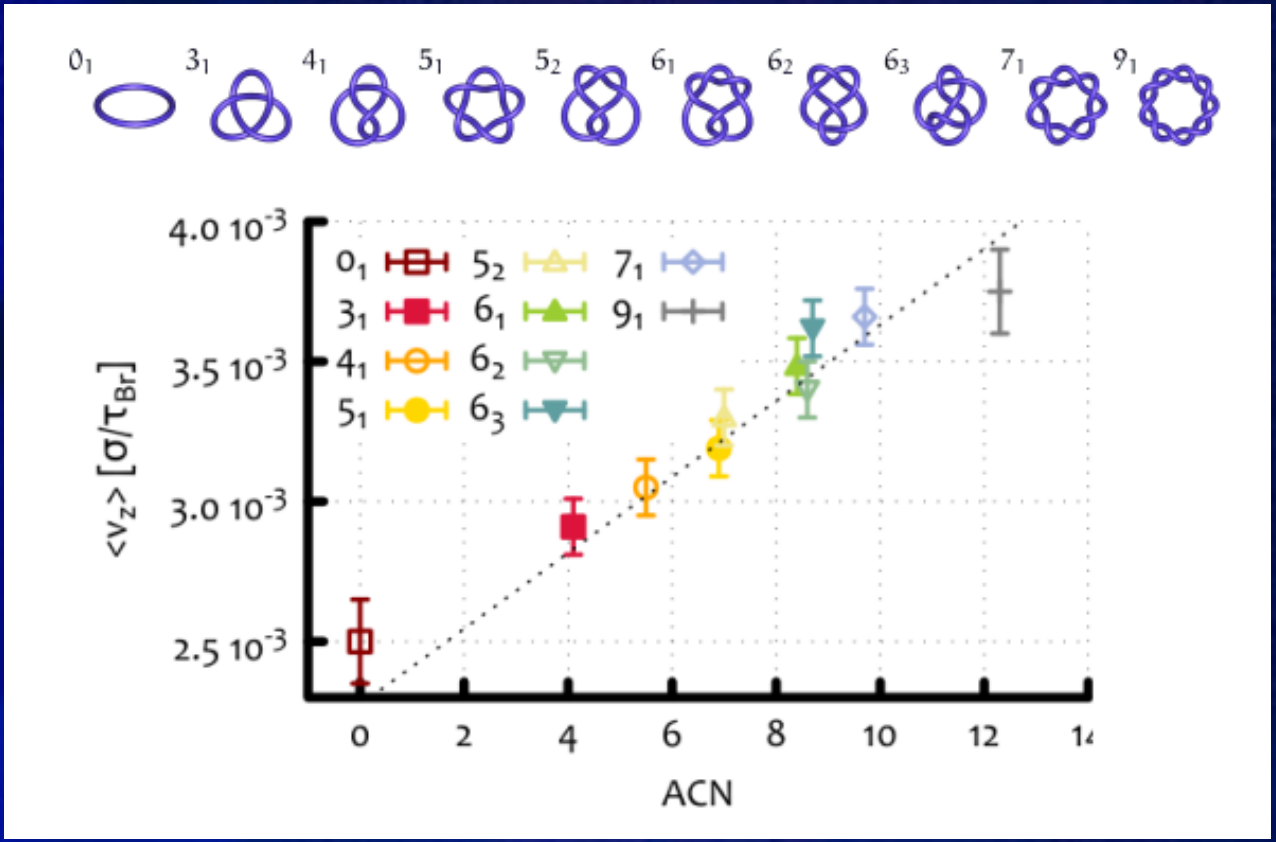




- Na rysunku widoczny model żelu agarozowego
- Przedstawione węzły DNA, to konfiguracje równowagowe
- Widzimy, że im bardziej złożony węzeł tym jego rozmiar jest mniejszy

- Czerwony – trójlistnik
- Pomarańczowy 4_1
- Żółty 5_1
- Zielony 6_1
- Szary 9_1

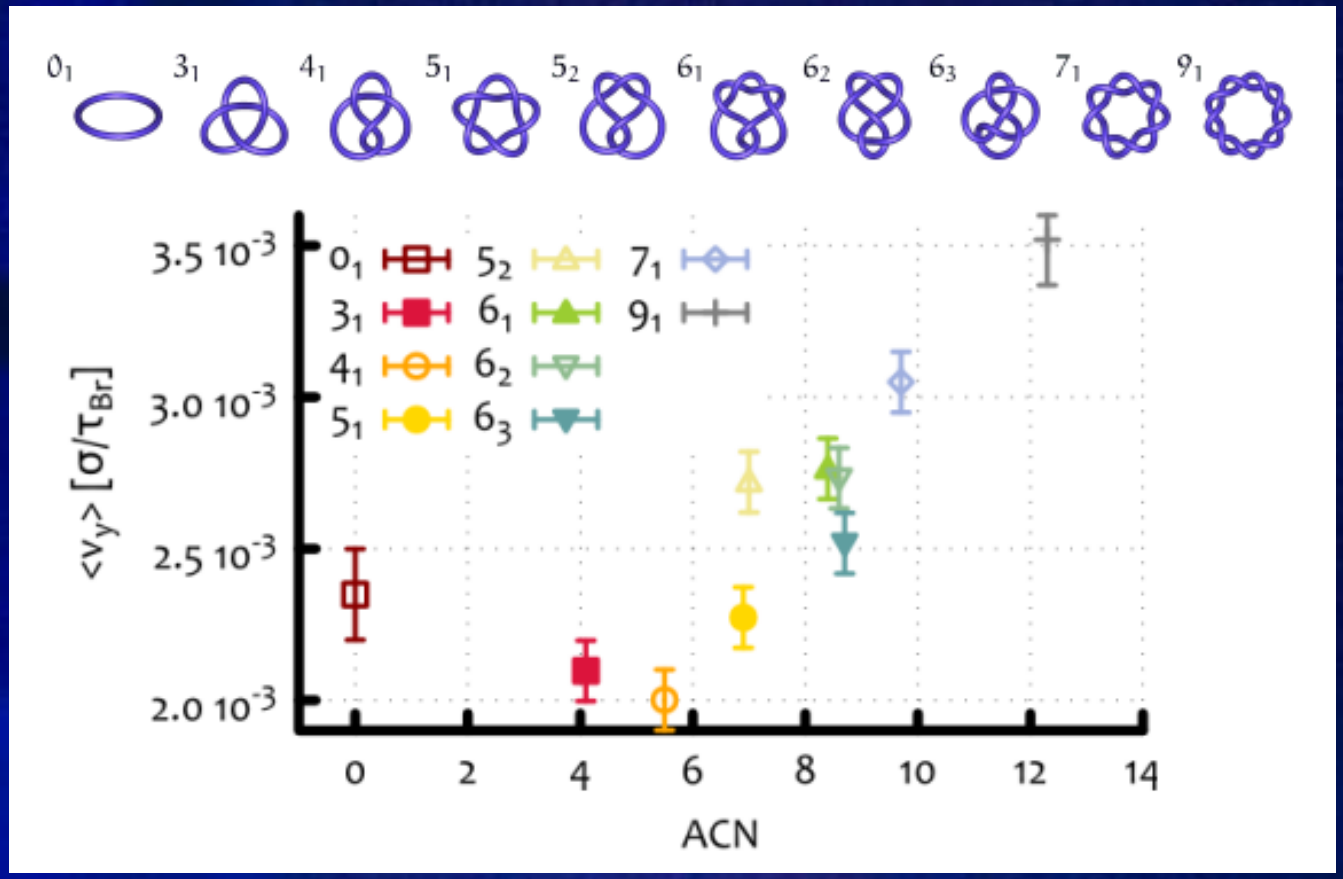
Monitoring trajektorii węzłów w nieregularnym żelu
Słabe Pole



Porównano szybkość poruszania się środków mas węzłów w zależności od natężenia pola - SŁABE POLE

Ruchliwość elektroforetyczna węzłów DNA zwiększa się wraz z złożonością topologiczną konfiguracji łańcuchów.

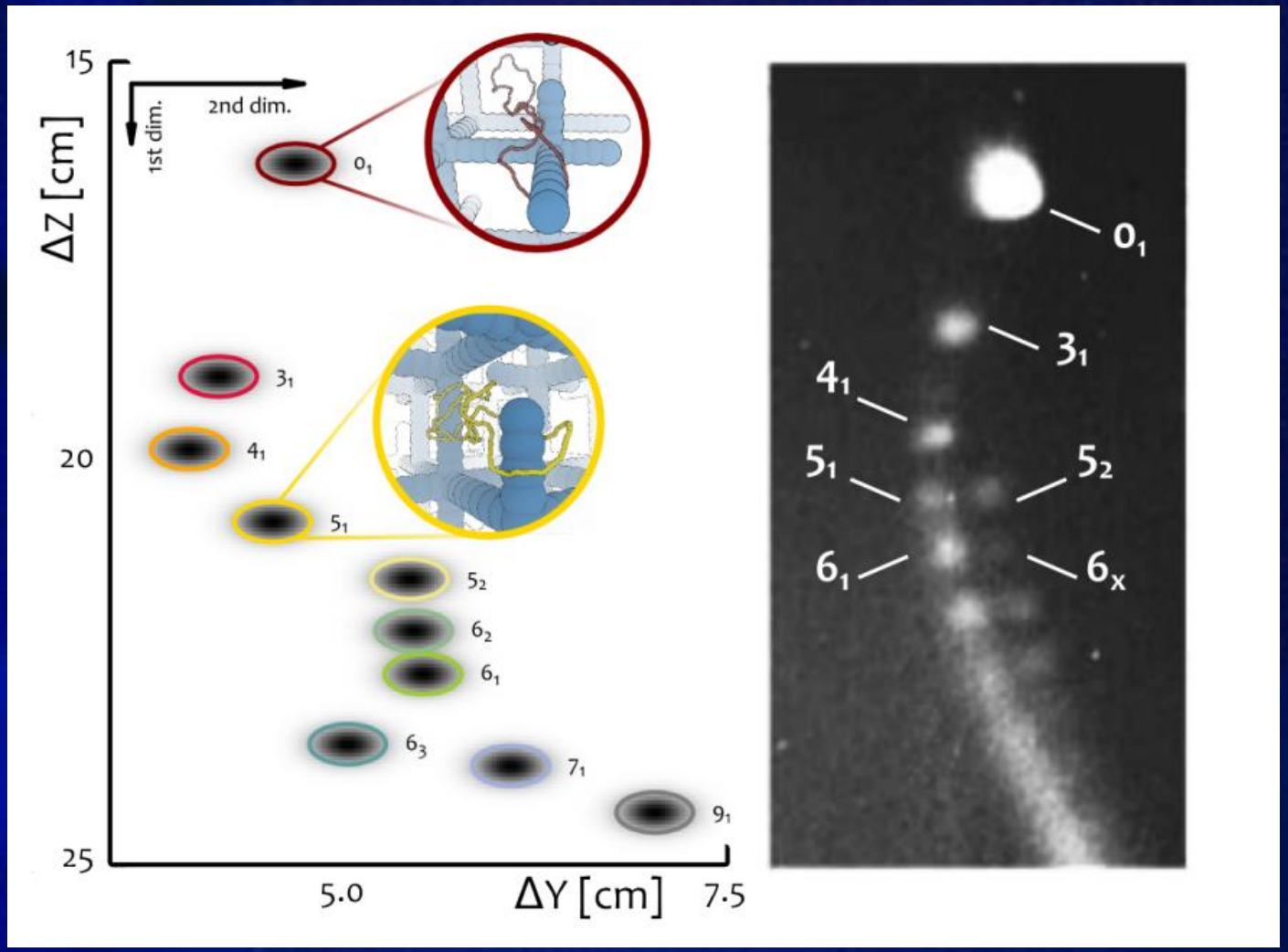
Monitoring trajektorii węzłów w nieregularnym żelu
Silne pole



W silnym polu ruchliwość ma charakter niemonotoniczny.

Węzeł trywialny porusza się szybciej niż trójlistnik ! I inne.

Położenie prążków na żelu



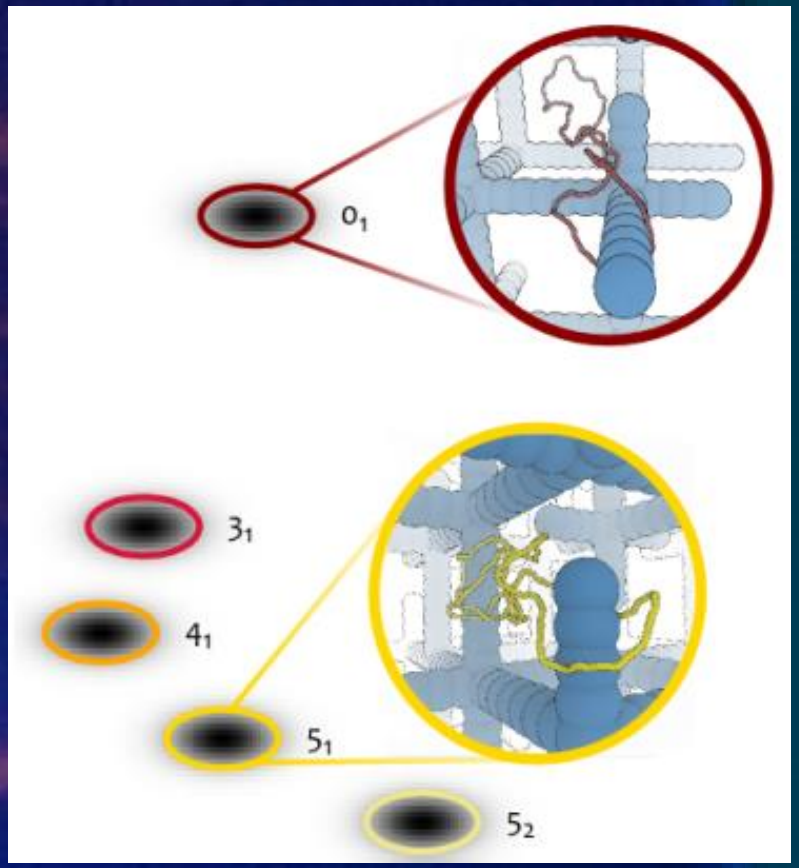
Model matematyczny oraz elektroferegram superskręconych plazmidów

z widocznym łukiem

Bardziej złożone węzły mają mniejszy rozmiar, ale większa liczbę splątania

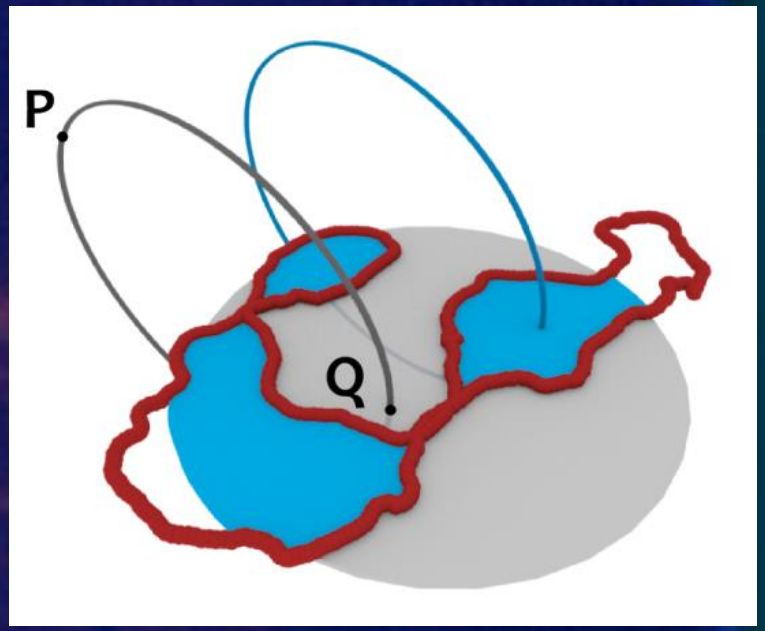
- Węzły DNA mogą być hamowane podczas wędrówki elektroforetycznej na skutek zaczepiania się na wystających łańcuchach żelu agarozowego

- Żel hamuje wędrówkę węzłów na zasadzie fizycznego zaczepiania się pętli na wystających łańcuchach żelu

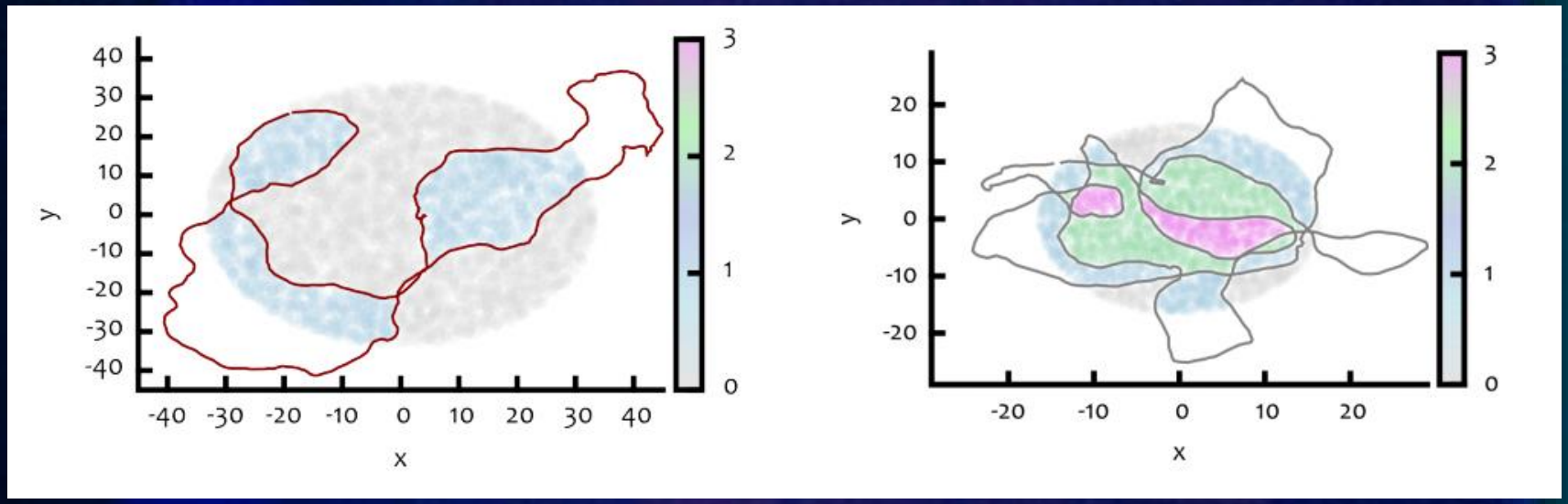


Opis ilościowy stopnia splatania węzeł - żel

- Uwzględniamy równowagową konformację węzła w żelu
- Konfigurację przedstawiamy na płaszczyźnie prostopadłej do kierunku pola elektrycznego
- Wybieramy punkt bazy P oddalony znacznie od płaszczyzny projekcyjnej
- Zaczynając od punktu P rysujemy łuk, który przebija tylko raz płaszczyznę w punkcie Q będącą środkiem masy wybranej konfiguracji
- Łuk i przestrzeń definiują semiprzestrzeń, łuk zamykamy aby utworzyć okrąg

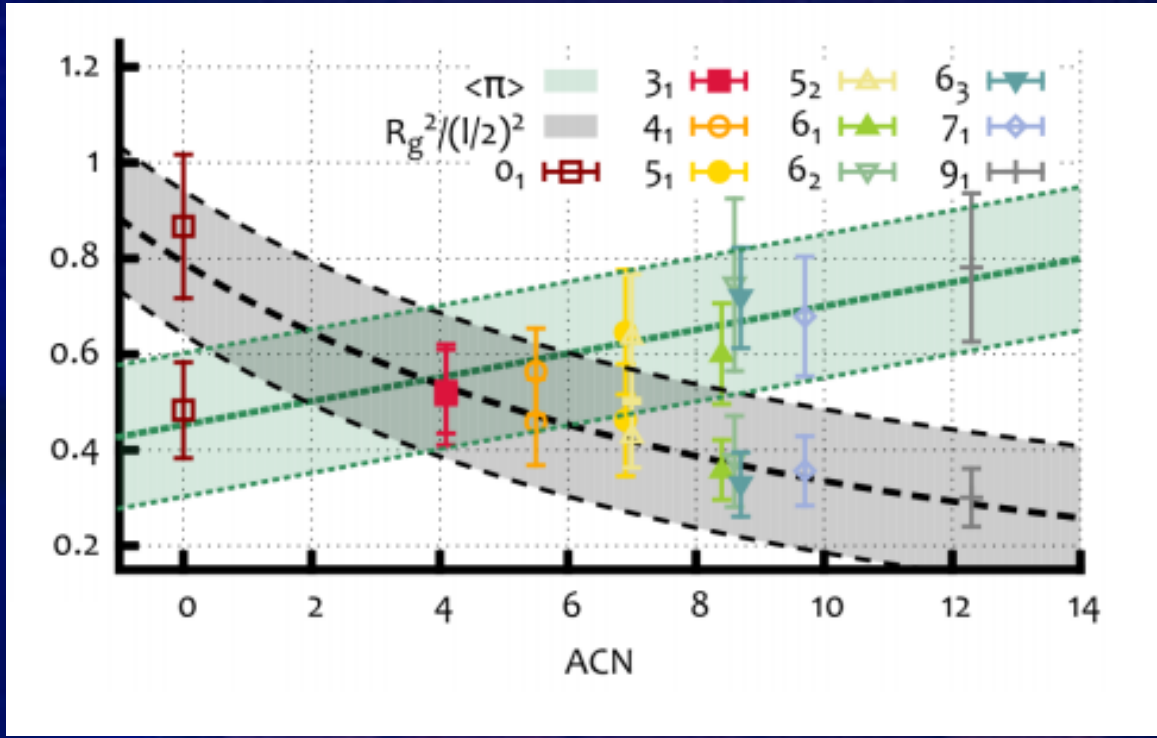


- Rysunek definiujący przekłucie i liczbę splątania.
- Dla danej projekcji konfiguracji węzła skrzyżowania definiują zestaw regionów, które oddziałują z dyskiem projekcyjnym R – na niebiesko
- Startując z punktu P daleko od powierzchni projekcji przekłuwamy dysk R ścieżką losowo
- Bezwzględna wartość linking number jest obliczana pomiędzy konformacja węzła a każdą zamkniętą ścieżką



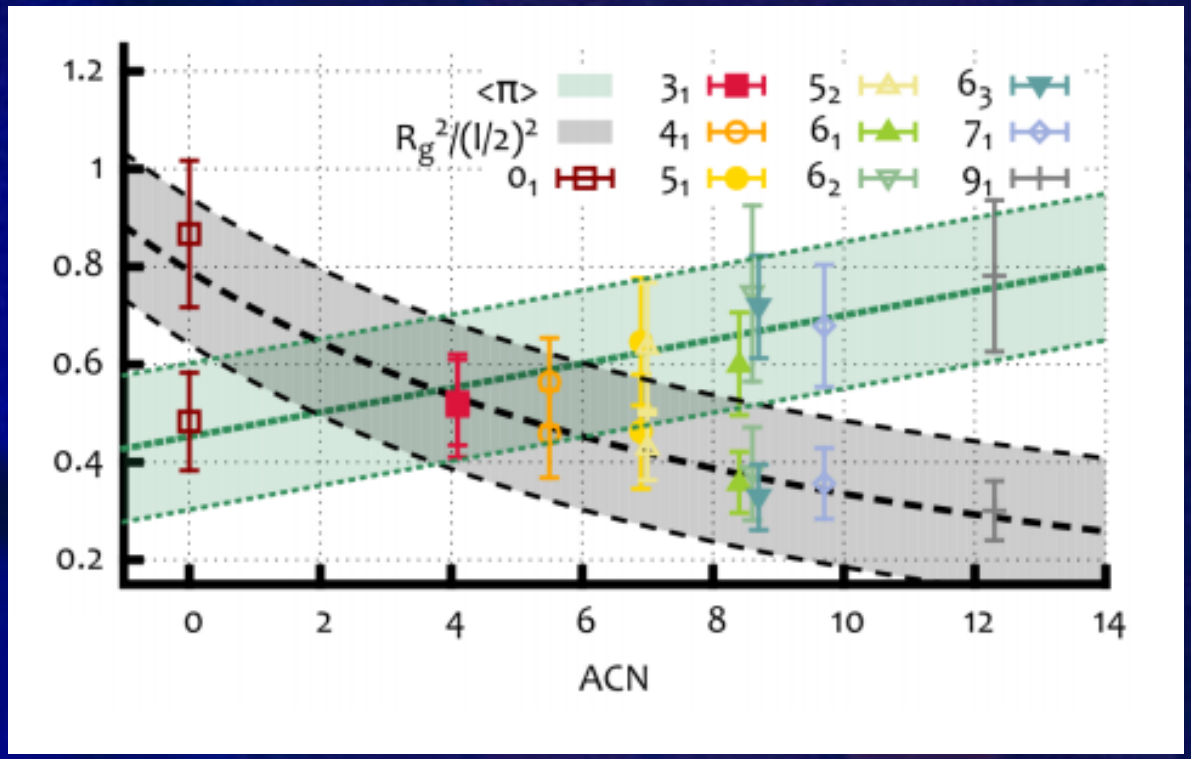
Niezawęźlona konformacja węzła oraz konfiguracja węzła 9_1. Kolorowanie podaje wartość absolutną liczby splecenia. Dla węzła 9_1 widzimy rejony bardziej podatne na splątanie z końcówkami żelu

- By ocenić, czy stworzona ścieżka oddziałuje topologicznie z konfiguracją węzła obliczono absolutna wartość liczby splecenia pomiędzy tą okrągłą ścieżką i węzłem
- Rysunek a i b przedstawia wynik takiego działania zastosowany do dwóch węzłów
- Przez uśrednienie liczby splecenia z paru kolistych ścieżek (inne Q) przy innej konfiguracji węzłów zdefiniowano średnią liczbę splątania π, która mierzy stopień splatania pomiędzy pętlami węzła i żelem



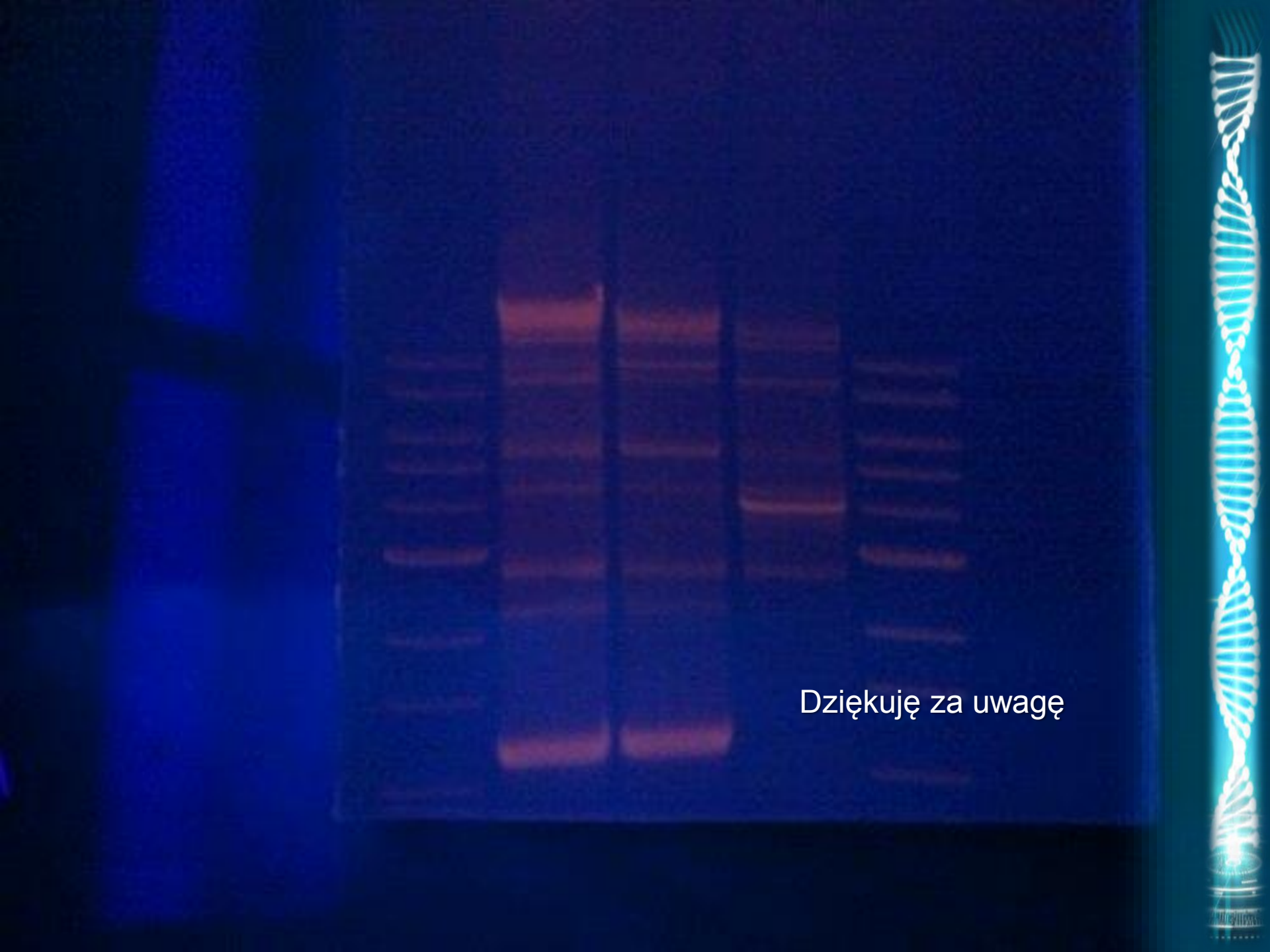
Średnia liczba splątania. Oraz średni promień bezwładności podzielony przez (l/2) – wielkość porów. Wartości dla różnych typów węzłów sklasyfikowanych według średniej ilości skrzyżowań

- Z rysunku widać, że średnia liczba splątania rośnie liniowo ze średnią ilością skrzyżowań
- Średnio bardziej złożone węzły mogą stać się bardziej uwikłane w otoczeniu nieregularnego żelu



Średnia liczba splątania. Oraz średni promień bezwładności podzielony przez (l/2) – wielkość porów. Wartości dla różnych typów węzłów sklasyfikowanych według średniej ilości skrzyżowań

- Charakter wykresu sugeruje, że niemonotoniczna ruchliwość elektroforetyczna węzłów DNA w nieregularnym żelu związana jest z interakcją miedzy średnim rozmiarem i stopniem splątania z żelem.
- Bardziej złożone węzły, mniejsze, powinny wędrować łatwiej w żelu, ponieważ nie zderzają się z jego łańcuchami, jednak gdy zderzenie się pojawi, bardziej złożony węzeł ulega większemu spleceniu z łańcuchami żelu



Dziękuję za uwagę

Literatura

- http://math.sfsu.edu/mariel/sugakuDNA-English.pdf
- http://www.slideshare.net/teresarothaar/rothaar-final-report
- Teresa Rothaar, Math 4096