

УДК 532.74

КОНДЕНСАЦИЯ И ПОСЛЕДУЮЩЕЕ ПЕРЕРАСТВОРЕНИЕ ДНК ПОЛИАМИНАМИ

Э. А. Аллахьяров¹, Н. Г. Гусейн-заде²

Ключевую роль в поддержании клеточной ДНК в компактном состоянии играют линейные многовалентные полиамины: трехвалентный спермидин (spermidine (Spd)) и тетравалентный спермин (spermine (Spe)). Существуют экспериментальные данные по уплотнению и перерастворению ДНК молекул соответственно при концентрациях C_c и C_d спермина. Между этими пороговыми значениями $C_c < C < C_d$ плотная жидкая фаза ДНК сосуществует с растворенной фазой ДНК. В данной работе исследуется фазовая диаграмма молекул ДНК в водных растворах в присутствии тетравалентных ионов на основе численных расчетов эффективных ДНК-ДНК взаимодействий.

Линейные многовалентные полиамины, такие как трехвалентный спермидин (spermidine (Spd)) и тетравалентный спермин (spermine (Spe)), играют ключевую роль в поддержании клеточной ДНК в компактном состоянии [1]. В прошлое десятилетие различные эксперименты показали конденсацию и последующее перерастворение ДНК в водных растворах при увеличении концентрации полиамина C [2 – 4]. Уплотнение и перерастворение происходит соответственно при концентрациях C_c и C_d . Между этими пороговыми значениями $C_c < C < C_d$ плотная жидкая фаза ДНК сосуществует с растворенной фазой ДНК. Несколько теоретических объяснений ДНК конденсации,

¹Институт высоких температур РАН, Ижорская 13/17, Москва 119991, e-mails.

²Институт общей физики им. А. М. Прохорова РАН, Вавилова 38, Москва 119991, e-mail rustamka@mtu-net.ru.

основанных на противоионном притяжении между ДНК, были представлены в [1, 2]. В серии экспериментальных работ группа Livolant и др. [3, 4, 2] демонстрировали, что ионы спермидина и спермина провоцируют жидкокристаллические структуры в ДНК фрагментах.

В этой статье нами исследуется конденсация и перерастворение ДНК путем детального рассмотрения на молекулярном уровне с помощью компьютерного расчета с явно учитываемыми микроионами. Конденсация и перерастворение связываются с притяжением и существованием двух минимумов в эффективном потенциале между двумя параллельными молекулами ДНК. Фактически глубина и положение минимума в потенциале притяжения играют критическую роль в определении фазового перехода газ-жидкость, т.е. перехода расслаивания раствора ДНК на плотную (жидкость) и разреженную (газ) фазы.

Параметры системы. Рассматриваются молекулы В-ДНК в модели МАМ [5]. Система содержит N_Q тетравалентных ионов (спермин, заряд $q_Q = 4$ и диаметр $d_Q = 8\text{\AA}$). Также в системе присутствуют $N_- = N_{s-} + q_Q N_Q$ одновалентных коионов (анионы) и $N_+ = N_{s+} + N_c$ одновалентных противоионов (заряд $q_c = \pm 1$ и диаметр $d_c = 4\text{\AA}$). Здесь $N_{s+} = N_{s-} = N_s$ - число добавленных пар ионов соли, N_c фиксирован зарядом ДНК из-за условия полной зарядовой нейтральности; $N_c = 60$ для одной ДНК и $N_c = 120$ для двух молекул ДНК. Все ионы моделируются как заряженные твердые сферы. По отношению к ионам спермина такое приближение оправдано, так как текучесть упорядоченной фазы ДНК предполагает, что Sре, который является линейным полимером, связывается с одной ДНК как обычный ион, а не создает поперечные переплетные соединения между соседними молекулами ДНК [3, 4]. Типичная картина ячейки расчета проиллюстрирована на рис. 1.

Потенциалы взаимодействия между пятью разного сорта частицами (три из них - вышеупомянутые мобильные ионы в растворе, другие: одна заряженная, другая нейтральная - принадлежат молекуле ДНК) состоят из комбинации исключенного объема и потенциалов Кулона [5]. Все численные расчеты проводились в рамках большой канонической молекулярной динамики [5].

Одна молекула ДНК и флуктуация заряда. Сначала рассматривается одна молекула ДНК. Известно, что в присутствии многовалентных ионов ионное облако может не только компенсировать заряд ДНК, но и превысить его, приводя к противополож-

ным значениям электростатического потенциала на некоторых расстояниях. Параметр компенсации заряда фосфатных групп ДНК, определенный как

$$\theta(r) = \int_0^r (q_Q \rho_Q(r') + q_+ \rho_+(r') + q_- \rho_-(r')) \times \\ \times 2\pi r' dr' + N_p q_p, \quad (1)$$

составляет интегрированный полный заряд на расстоянии r от поверхности ДНК. Здесь N_p – число фосфатных зарядов на длину шага ДНК, $\rho_i(r)$ ($i = Q, +, -$) – концентрации ионов на расстоянии r от оси ДНК. Данные для параметра θ , который часто называется зависящим от расстояния эффективным зарядом ДНК, показаны на рис. 2 для различных концентраций S_{re} и соли.

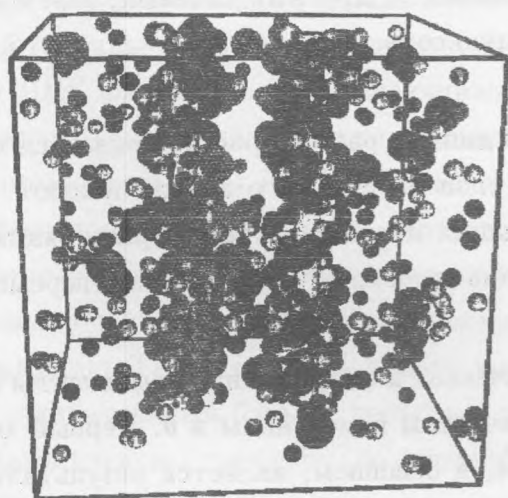


Рис. 1. Типичный снимок ячейки расчета. Ионы Sr_{re} показаны как большие черные сферы, светлые сферы – катионы, серые сферы – противоионы.

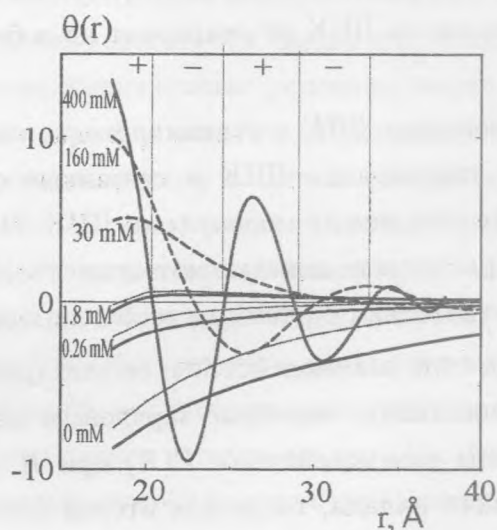


Рис. 2. Параметр перезарядки ДНК θ как функция расстояния r от оси ДНК для различных концентраций S_{re} и соли C_s . Толстые линии – $C_s = 25$ мМ, тонкие линии – $C_s = 100$ мМ. Концентрации S_{re} показаны рядом с соответствующими кривыми. Вертикальные линии отделяют слои заряда разного знака для случая $C = 400$ мМ.

Для низких концентраций S_{re} эффективный заряд ДНК уменьшается по абсолютной величине при увеличении C , пересекая ноль около поверхности ДНК при $C = 1.8$ мМ.

Затем параметр θ растет в сторону положительных значений около поверхности ДНК при добавке ионов Sre .

При $C = 400 \text{ мМ}$ явно видны несколько чередующихся заряженных слоев разного знака, см. промежутки между вертикальными линиями на рис. 2. Такая слоистая структура в θ появляется из-за объемных периодических изменений плотности заряда в сильных электролитах. Для более концентрированной соли (см. пунктирные линии на рис. 2) перезарядка наступает раньше по сравнению с низкой концентрацией соли. Наши дополнительные расчеты с $qQ = 3$ (не показанные здесь) свидетельствуют, что в этом случае перезарядка при тех же самых концентрациях соли имеет место при больших плотностях C . Заметим, что для длинной ДНК состояние перезарядки метастабильно, так как ДНК в конечном счете подвергается полной конденсации в тороидальную структуру и становится полностью электронейтральной.

Численные расчеты показывают, что для концентрации Sre $C > 1.8 \text{ мМ}$ (перезаряженная ДНК) влияние соли на параметр θ уменьшается, другими словами, перезаряженная молекула ДНК не реагирует на добавленную соль.

Пара молекул ДНК и осциллирующие силы. В данном разделе рассматривается вопрос, как перезарядка ДНК и связанные с ней слои переменного заряда влияют на взаимодействие между молекулами ДНК. На больших межмолекулярных расстояниях, $R > 24 \text{ \AA}$, расчеты не показывают существенной зависимости $F(R)$ от угловых переменных в соответствии с ранними сообщениями [5].

Полная сила взаимодействия, ее электростатическая и энтропийная компоненты [5] имеют осцилляции, подобные зарядовым периодическим изменениям в θ . Первый минимум силы взаимодействия $F(R)$ при $R = 30 \text{ \AA}$, в основном, является результатом энтропийного вклада, тогда как второй минимум при $R = 41 \text{ \AA}$ имеет электростатическое происхождение. Появление двух минимумов в $F(R)$ является сигналом возможного сосуществования двух жидких фаз в растворах ДНК, что находится в согласии с экспериментальными данными [2 – 4]. По мере увеличения C ширина и глубина первого минимума уменьшаются, появляется второй максимум, высота которого увеличивается, и положение которого сдвигается к поверхности ДНК.

Интегрирование сил взаимодействия для различных концентраций Sre дает эффективный парный потенциал взаимодействия $U(R)$, показанный на рис. 3. Видно, что малая добавка Sre ионов приводит к притяжению между молекулами ДНК, см. кривую (2) для $C = 0.1 \text{ мМ}$. Учитывая, что показанные на рис. 3 потенциалы рассчитаны для

сегмента молекулы длиной в 1 винтовой шаг ДНК, длинные молекулы ДНК легко могут быть захвачены в минимум кривой (2). Строго говоря, это означает, что скопление ДНК молекул может появиться даже при концентрации S_{pe} , когда ДНК молекула не перезаряжена. Положение первого минимума $U(R)$ не зависит от C . Однако глубина минимума сначала увеличивается и затем уменьшается с увеличением C . При больших концентрациях S_{pe} минимум переходит через ноль и становится положительным. Полностью другое поведение обнаружено для хвоста потенциала $U(R)$. Сначала развивается отталкивательный максимум, который увеличивается по высоте и перемещается к поверхности ДНК при увеличении C . За максимумом следует относительно слабый притягивательный минимум, чья глубина, подобно глубине первого минимума $U(R)$, сначала увеличивается и затем уменьшается с ростом C .

Отметим, что потенциал с двумя минимумами, см., например, линию (6) на рис. 3, является необходимым условием сосуществования двух жидких структур, наблюдаемых в экспериментах [2 – 4]. Для монодисперсных ДНК фрагментов минимум с глубокой ямой глобально устойчив, а другой минимум метастабилен. Однако для полидисперсных ДНК фрагментов, встречающихся в экспериментальных условиях, картина более сложная. Так как потенциалы взаимодействия линейно зависят от длины ДНК, самые длинные фрагменты ДНК могут быть пойманы в ловушку в слабом втором минимуме и сформировать жидкостную структуру. Вместе с этим, энергетический барьер, определенный как разница между значениями $U(R)$ в максимуме и во втором минимуме, приводит к сильному отталкиванию для длинных фрагментов ДНК, препятствуя их сближению. Таким образом, только короткие ДНК фрагменты в состоянии преодолеть отталкивательный барьер, попасть в первый минимум и сформировать более плотную гексагональную структуру (по тенденции, замеченной в экспериментах). В работах [3, 4] сообщается, что плотноупакованная гексагонально-подобная структура, главным образом, создана короткими ДНК фрагментами, а жидкостная холестерическая фаза ДНК состоит из относительно длинных молекул ДНК. Численные расчеты показывают, что второй минимум происходит, главным образом, от электростатических взаимодействий.

По известным потенциалам взаимодействия можно вычислить свободную энергию жидкой фазы и исследовать разделение системы на газовую и жидкую фазы. Система параллельных ДНК молекул может быть рассмотрена как двумерная моночастичная система дисков, взаимодействующих посредством потенциала $U(R) \times \ell$, где ℓ обозначает длину ДНК в единицах винтового шага P . Применяя теорию возмущений для свободной энергии двумерной системы взаимодействующих жестких дисков, легко определить воз-

возможные концентрации сосуществующих фаз. В рамках теории возмущений потенциал взаимодействия Weeks–Chandler–Anderson разделяется на отталкивательную и притягивательную части в точке его первого минимума, $U(R) = U_r(R \leq R_{min}) + U_a(R \geq R_{min})$. Полная свободная энергия для взаимодействующих дисков записывается как

$$\frac{A}{Vk_B T} = \rho(C_0 + \ln \eta) + \rho \frac{(2\eta_0 - 1) \ln(1 - (2\eta_0 - 1) \frac{\eta_{eff}}{\eta_0}) - \ln(1 - \frac{\eta_{eff}}{\eta_0})}{2(1 - \eta_0)} + \frac{\rho^2}{2} \int_{\sigma}^{\infty} \frac{U_a(R)}{k_B T} g_{hd}(R) 2\pi R dR, \quad (2)$$

где первый член в уравнении (2) соответствует идеальной части свободной энергии, V – объем системы, σ – диаметр молекулы ДНК, равный 20 \AA , C_0 – постоянная, упаковочная фракция жестких дисков определена как $\eta = \frac{\pi \rho \sigma^2}{4}$. Второй член в уравнении (2) соответствует дополнительной энергии для системы жестких дисков с эффективным диаметром $\sigma_{eff} = \sigma + \int_{\sigma}^{R_{min}} (1 - \exp(-\frac{U_r(R)}{k_B T})) dR$. Здесь $\eta_0 = \sqrt{3}\pi/6$, эффективная упаковочная фракция $\eta_{eff} = \eta \sigma_{eff}^2 / \sigma^2$. Третий член соответствует возмущению от притяжения $U_a(R)$ полного потенциала взаимодействия $U(R)$. Он содержит парную корреляционную функцию жестких дисков $g_{hd}(R)$, которая определяется либо численно, либо же в рамках теории интегральных уравнений. Здесь для простоты предполагается $g_{hd}(R) = 1$ на всех расстояниях. Рассматривая упаковочную фракцию η (или плотность ρ) как переменный параметр, можно вычислить свободную энергию $A(\rho, U)$ для потенциалов взаимодействия из рис. 3. Затем, используя метод двойного тангенса, определяются упаковочные фракции сосуществующих фаз газ–жидкость, соответственно ρ_d (для растворенной фазы) и ρ_p (для ДНК связок).

Главным недостатком теории возмущений является ее неспособность отличить два разных конденсированных состояния дисков, которые взаимодействуют через потенциал с двумя минимумами. С другой стороны, можно применить метод решеточных сумм к тем же потенциалам в предположении, что устойчивая решетка имеет треугольную форму. При этом решеточная константа напрямую связана с плотностью ДНК в растворе. Составляя полную свободную энергию из свободных энергий жидкости и треугольной решетки и применяя метод двойного тангенса, мы приходим к фазовой диаграмме, показанной на рис. 4. При малых C существует фазовый переход первого рода газ (разреженный раствор)–кристалл (твердое тело I). С увеличением C ширина области сосуществования растет за счет увеличения притяжения в системе. За пороговым значением $C \approx 0.1 mM$ притяжение становится достаточным для возникновения стабильной

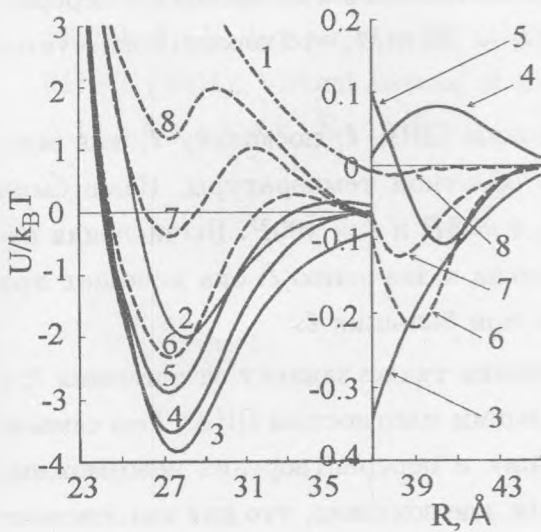


Рис. 3. Эффективный парный потенциал U взаимодействия между молекулами ДНК для $C_s = 25 \text{ mM}$ и $C = 0 \text{ mM}$ (1), 0.1 mM (2), 0.8 mM (3), 18 mM (4), 65 mM (5), 160 mM (6), 280 mM (7), 400 mM (8) в зависимости от межмолекулярного расстояния R .

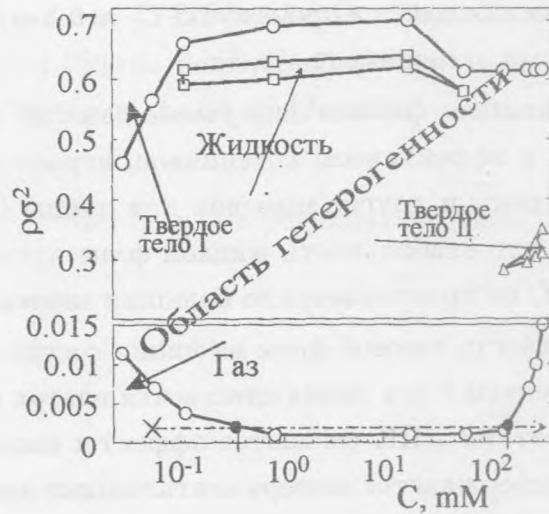


Рис. 4. Фазовая диаграмма ДНК в координатах концентрация $SpE C$ – двумерная концентрация ДНК $\rho\sigma^2$ для $C_s = 25 \text{ mM}$. Стабильными фазами являются газ, жидкость и два кристалла треугольной решетки с разными решеточными постоянными (твердое тело I и твердое тело II). Все переходы между этими фазами являются переходами первого рода. Для наглядности область малых плотностей ДНК увеличена ниже $\rho\sigma^2 < 0.015$.

жидкой структуры с плотной ДНК. Стабильность этой фазы исчезает при $C \approx 65 \text{ mM}$. При дальнейшем увеличении концентрации SpE появляется вторая стабильная решеточная структура (твердое тело II) с меньшей решеточной постоянной, чем более плотное твердое тело (твердое тело I). Это новое образование нами названо *мезокристаллом*, так как его плотность находится между плотностью газа и плотностью твердого тела II.

Обсуждение результатов. Фазовая диаграмма на рис. 4 содержит информацию о конденсации и перерастворении ДНК. Зафиксируем двумерную концентрацию ДНК $\rho\sigma^2 = 0.002$, которая соответствует 1 mg/ml плотности ДНК в экспериментах по перерастворению. Теперь увеличим концентрацию спермина по пути, указанному стрелкой на рис. 4. Как только линия сосуществования газ–кристалл пересечена, система разделяется на низкоплотную газовую фазу и высокоплотную фазу жидкости. Этот переход соответствует конденсации ДНК. При больших значениях C линия перехода пересека-

ется еще раз, и система перерастворяется. Пороговые значения конденсации и перерастворения находятся в промежутке $C_c \approx 0.3 mM$ и $C_d \approx 165 mM$, что хорошо согласуется с данными эксперимента [3, 4].

Показанная фазовая диаграмма зависит от длины ДНК ℓ , поскольку ℓ , как множитель в эффективном потенциале, играет роль обратной температуры. Нами были рассмотрены и другие значения для длины ДНК, $\ell = 5P$ и $\ell = 100P$. Вычисления показали, что стабильность жидкой фазы чувствительна к значению ℓ : она исчезает при малых ℓ , но простирается до больших значений C при больших ℓ .

Плотность газовой фазы на линии сосуществования также зависит от значения ℓ ; с уменьшением ℓ эта линия сдвигается вверх к большим плотностям ДНК. Тем самым, для коротких ДНК сегментов эффекты конденсации и перерастворения невозможны. Это подтверждается экспериментальными данными, где показано, что для конденсации ДНК фрагментов пороговое значение по длине ℓ равно $\ell \approx 15P$.

Подведем кратко итоги полученным результатам. Вычислено влияние тетравалентных противоионов на эффективное взаимодействие и на фазовую диаграмму параллельных ДНК систем посредством численных расчетов и с использованием статистических теорий. Найдено, что малая концентрация тетравалентных ионов вызывает конденсацию ДНК. Тетравалентные ионы создают слоистую зарядовую структуру вокруг молекул ДНК, которая приводит к осциллирующему эффективному потенциалу взаимодействия ДНК-ДНК с двумя минимумами. Следствием этого является перерастворение ДНК и образование новой мезокристаллической структуры. Найденные пороговые значения для концентраций тетравалентных ионов находятся в хорошем согласии с экспериментальными данными.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Bloomfield V. A. Biopolymers, **44**, 269 (1997).
- [2] Saminathan M., Thomas T., Shirahata A., et al. Nucleic Acids Research, **30**, 3722 (2002).
- [3] Pelta J., Livolant F., Sikorav J.-L. J. Biological Chemistry, **271**, 5656 (1996).
- [4] Pelta J., Durand D., Doucet J., Livolant F. Biophys. J., **71**, 48 (1996).

- [5] Allahyarov E., Löwen H., Gompper G. Phys. Rev. E, **68**, 061903 (2003); Allahyarov E., Gompper G., Löwen H. Phys. Rev. E, **69**, 041904 (2004); Virtual Journal of Biological Physics Research, **7**, (2004); Allahyarov E., Löwen H. Phys. Rev. E, **62**, 5542 (2000).

Поступила в редакцию 16 июня 2004 г.