

ТОРИЧЕСКИЕ КОНФОРМАЦИИ МОЛЕКУЛ ДНК

В.Н. Блинов¹, В.Л. Голо^{2, 3, 4}, Ю.Ф. Крупянский²

¹ *Научный Центр РАН в Черноголовке*

² *Институт химической физики РАН им. Н.Н. Семенова*

³ *Механико-математический факультет Московского Государственного
Университета им. М.В. Ломоносова*

⁴ *National Research University, Higher School of Economics*

voislav.golo@gmail.com

Поступила 07.06.2015

Мы рассматриваем тороидальные конфигурации как один из вариантов плотной упаковки ДНК в клетках и вирусах. Экспериментальные исследования плотных упаковок такого типа выявили наличие нетривиальной внутренней структуры. В реальной клетке, однако, такие образования должны сочетать компактность с возможностью осуществления биофизических процессов (репликация и т.п.). Возникает вопрос, как изменяются такие плотные образования во время тех или иных процессов жизнедеятельности клеток. Современная экспериментальная техника не может дать ответ на этот вопрос, поэтому возникает необходимость применения новых инструментов, таких как XFEL.

УДК 517.15

1 Образование компактных, глобулярных форм ДНК

Образование глобул является характерным признаком длинных мягких молекул полимерного типа, что может быть объяснено энтропийными соображениями, [1]. Казалось бы, соответствующая теория может быть применена и к молекуле ДНК, рассматриваемой на масштабе много большем, чем её длина персистентности, благодаря чему можно пренебречь упругими свойствами ДНК. Но оказалось, что В-форма ДНК способна обра-

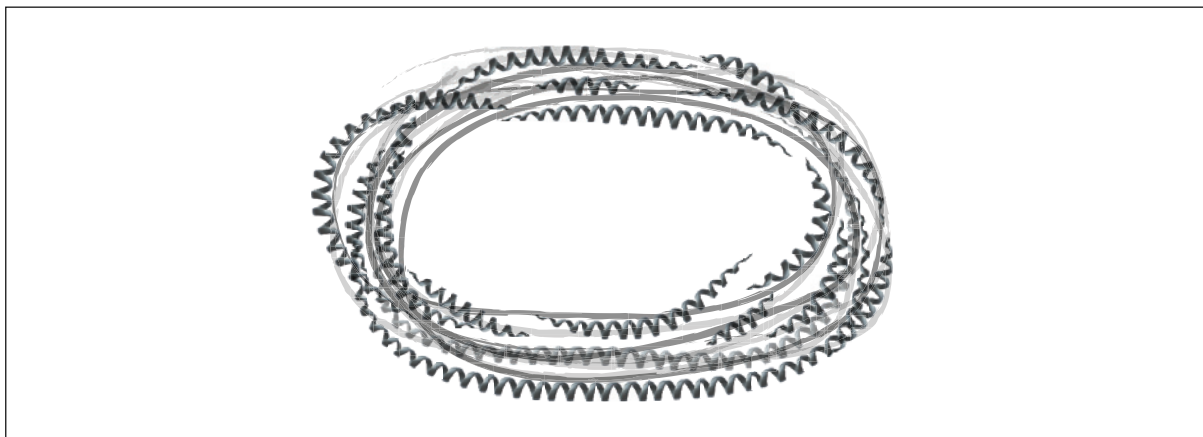


Рис. 1. Торoidalная конформация молекулы ДНК

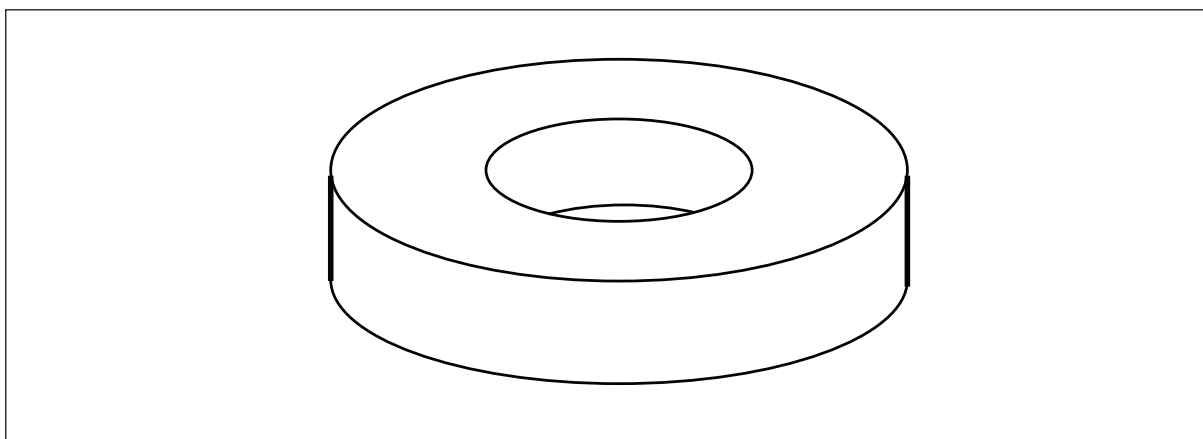


Рис. 2. Та же конформация ДНК что на предыдущем рисунке, 1, но представленная схематически

зовывать более сложные компактные структуры, чем на это способны обычные полимеры, [2], [3].

При соответствующих условиях глобулы ДНК могут иметь тороидальную форму, а также сферическую или цилиндрическую.

Исследование ДНК тороидов значительно стимулируется изучением конформации молекулы ДНК в вирусах и клетках. Тороиды ДНК состоят из отдельных петель, [4], [5], и образуются в результате выпадания, *коллапса*, из первоначально однородного раствора. Коллапс может быть вызван добавлением нейтрального полимера, обычно полиэтиленгликоля (PEG), при наличии достаточной концентрации солевого раствора. Это явление получило название ψ -конденсации. Оно является обратимым переходом и может осуществлено в ту или другую сторону, компактная форма ДНК $\rightleftharpoons$ изотропный раствор, посредством изменения концентрации солевого раствора, или PEG. Таким образом, речь идёт об обратимом конформационном переходе. ДНК тороиды часто имеют внешний диаметр порядка 100 *nm* и внутренний диаметр, дырку, порядка 30 *nm*. При теоретическом рассмотрении можно убедиться, что за счёт изменения упругих свойств ДНК или характеристик противоионов раствора, содержащего молекулу, можно получить сферические образования вместо торических. G. S. Manning, [7], предложил трактовку этих явлений, исходя из предположения, что на пространственных масштабах больше длины персистентности молекула ДНК может быть описана в рамках классической механики деформируемых сред, при учёте электростатических явлений, связанных с зарядами фосфатных групп ДНК.

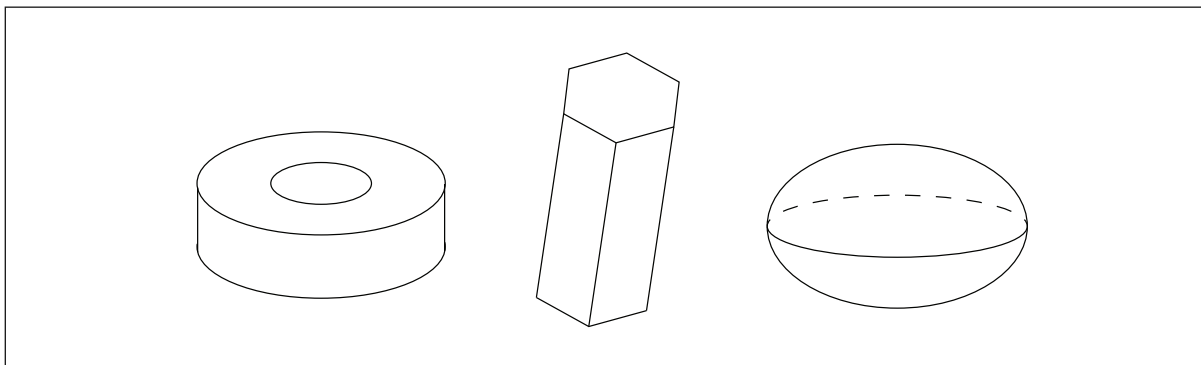


Рис. 3. Схематическое изображение типов компактных образований молекул ДНК

При этом очень существенно, что модули Юнга молекулы и распределение зарядов соответствуют её поперечной анизотропии. Идеи G. S. Manning'a, в той или иной форме, лежат в основе теоретических работ по компактным формам молекулы ДНК. Существенно, что молекула ДНК характеризуется тремя различными пространственными масштабами:

1. микромасштаб порядка $3.4 \text{ \AA}$, соответствующий расстоянию между соседними парами нуклеотидов, образующих двойную спираль диаметра порядка $20 \text{ \AA}$;
2. мезомасштаб порядка $1000 \text{ \AA}$, нескольких длин персистентности;
3. макромасштаб, порядка длины молекулы ДНК, который может достигать до нескольких мм. Поскольку молекула ДНК на мезо-масштабе нескольких длин персистентности содержит несколько тысяч атомов, представляется, что её можно рассматривать в этой отношении в рамках механики деформируемых сред и применять классическую теорию упругости.

В том, что касается упругих свойств ДНК, на указанном выше мезомасштабе её можно представить себе как классический упругий стержень. При этом возникает проблема расположения молекулы ДНК в ограниченном объёме, например, в клетке, которую приходится решать в рамках теории упругости. Это нетривиальная « контактная » задача теории упругости.

Тороидальные образования молекул ДНК были также обнаружены при условиях, когда цепь молекулы ДНК подвергалась сильному пространственному ограничению, так что система была близка к режиму наиболее плотной упаковки. Таковые были обнаружены в экспериментах с ДНК в наноканалах, жидких каплях, липосомах и вирусных капсидах, включая бактериофаги. Это сравнительно простые системы, если учесть, что образование компактных форм ДНК может иметь место и в живых клетках, в которых исследование этого явления представляет значительные трудности, [8]. Представляет значительный интерес исследование характера расположения молекул ДНК в липосомах, пузырьках-мембранах, самопроизвольно образующихся в смесях фосфолипидов. В частности, это диктуется важными медицинскими применениями.

Следует отметить, что одной из наиболее типичных форм самоорганизации ДНК является её способность образовывать жидкокристаллические (ЖК) холестерические фазы, как *in vivo*, так и *in vitro*. В частности, высказывалось утверждение, что митохондриальная ДНК находится в холестерической ЖК-фазе. Правда, следует иметь ввиду, что утверждение о холестерической ЖК структуре ДНК в хроматине основывается всего лишь на наличии у соответствующих образцов кругового дихроизма, [9].

Возвращаясь к тороидальным формам ДНК заметим, что они, возможно, играют важную роль в динамике жизнедеятельности клетки, [10]. В этом круге вопросов, по-видимому,

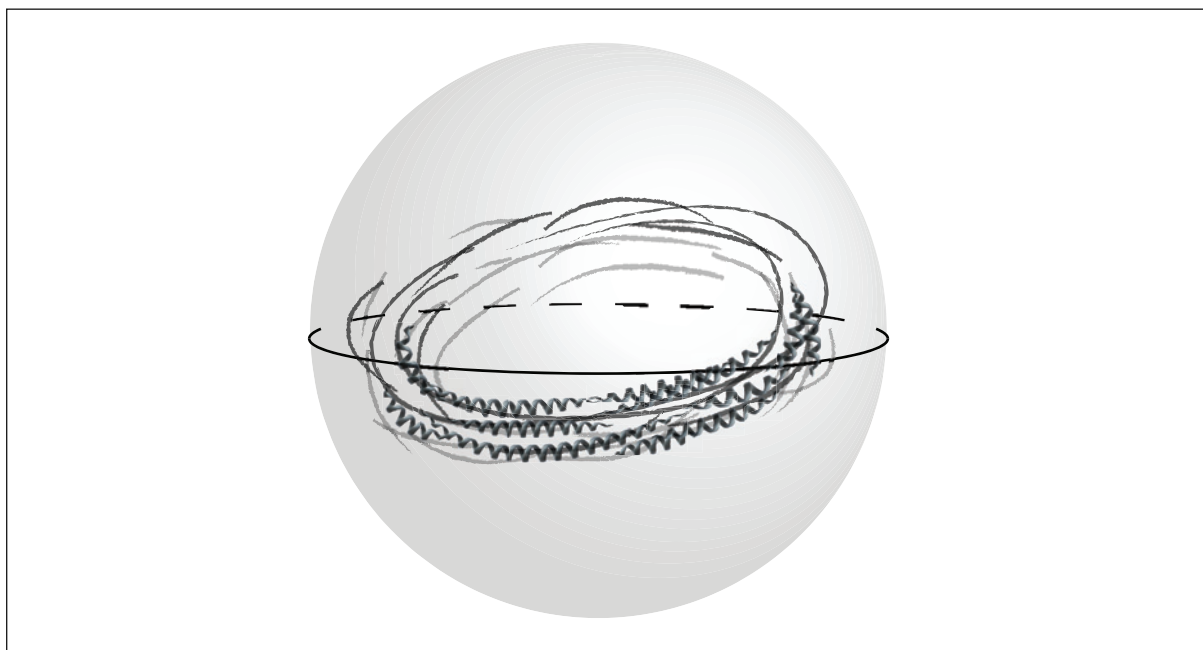


Рис. 4. Схематическое изображение расположения молекулы ДНК в липосоме

также играют существенную роль задачи оптимальной упаковки или укладки молекулы ДНК в клетке, и вытекающие отсюда проблемы нарушения предполагаемой симметрии получающихся структур. По-видимому, роль симметрии в строении тороидальных структур ДНК велика и требует внимательного рассмотрения, что до настоящего момента особо внимательно не исследовалось, хотя уже при изучении ψ -конденсации использовались симметричные соображения с целью упрощения решения теоретических задач, в основном, вычислительного характера.

Тороидальные формы ДНК могут иметь важные медицинские приложения для новых методов генной терапии, с помощью которых лекарственный препарат в виде гена будет доставляться непосредственно в клетку. В этой связи исследование образования тороидных форм ДНК представляет значительный интерес.

Особую роль играет явление образования торических и нанокристаллических структур при взаимодействии молекул ДНК с белками, что важно для понимания внутриклеточных процессов. В экспериментах *in vitro* было показано, что при взаимодействии стресс-индуцированного белка *DPS* и ДНК образуются стабильные нанокристаллы, в которых ДНК защищена от внешних воздействий. Данные криоэлектронной микроскопии показывают, что параметры решетки комплексов *in vitro* и *in vivo* близки друг к другу. Нанокристаллы в нуклеоиде *E. coli* имеют размер порядка нескольких сотен нанометров, а кристаллы, получаемые *in vitro* – порядка 1 мкм. Данные кристаллы изучались методами криоэлектронной микроскопии и томографии, [10], а также диффузного рентгеновского рассеяния [?]. В результате было охарактеризовано расположение додекамеров *Dps*, однако, точная укладка цепи ДНК в нанокристаллах остается неизвестной.

2 Экспериментальные данные

Известно, [6], что ДНК в живых клетках находится в сильно конденсированном состоянии, и что такого рода конденсация ДНК весьма существенна для жизненного цикла клетки. Можно считать, что тороидальная форма является оптимальной упаковкой молекулы

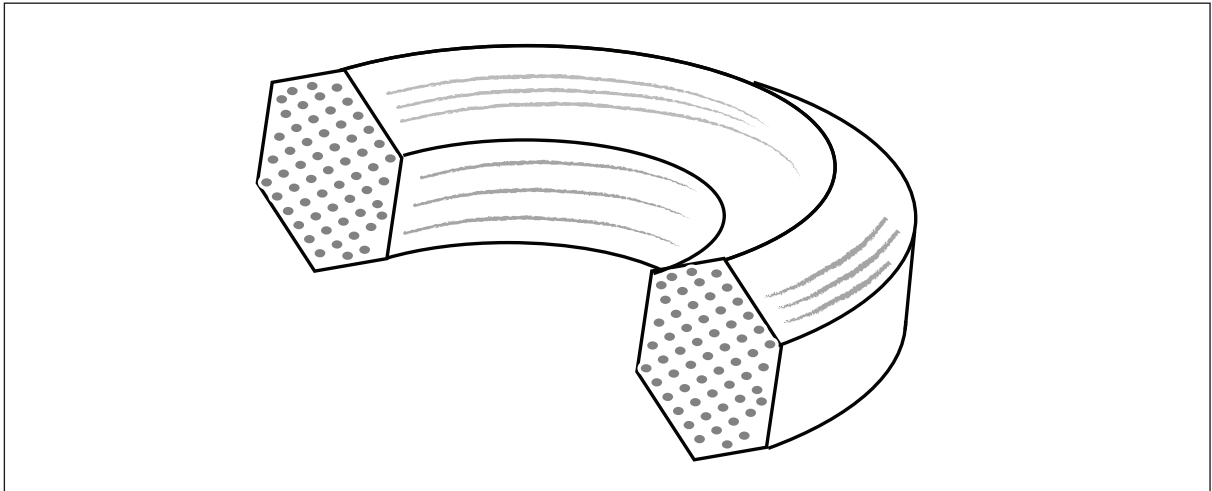


Рис. 5. Поперечное сечение тороида с гексагональной симметрией петель ДНК, выявленное в экспериментах по рентгенографии

ДНК в клетках. Стоит отметить, что явление конденсации ДНК представляет значительный интерес для генной терапии, поскольку может быть использовано для разработки средств доставки искусственных генов.

В работе [6] применялась криоэлектронная микроскопия, что позволило получить разрешение порядка одного нанометра для ДНК тороидов, замороженных в лёд. При этом скорость заморозки такова, что *микрофотографию образца можно рассматривать как моментальный снимок молекулы ДНК в жидкости до заморозания*. Были получены образы, имеющие беспрецедентную точность и четкость изображения, [6].

Укладки ДНК в виде тороидов носят регулярный характер, имеется ряд симметрий и дефектов. Экспериментально установлено, что часть тороидов соответствует регулярной / правильной упаковке молекулы ДНК почти по всей окружности тороида. Однако отмечается, что полная регулярность укладки по всем 360° не имеет места. Часть тороидов обладает упаковкой по гексагональной решетке, но при этом видно, что имеются нарушения правильной укладки. Таким образом, если рассматривать тороид ДНК как своего рода кристаллическую организацию, то она соответствует кристаллу с дефектами. Происхождение и роль этих дефектов не ясны.

В работе [10] было показано, что образование торических форм ДНК играет существенную роль в жизнедеятельности клеток, например, при переходе "изголодавшихся" бактериальных клеток в устойчивое состояние, которое характеризуется образованием пространственно упорядоченных тороидальных структур в хроматине (авторы даже употребляют термин - кристаллических). При этом, по-видимому, существенную роль играет белок *DPS*. Авторы отмечают, что это имеет место только для бурно (экспоненциально) растущих клеток, в то время как споры и бактерии, находящиеся в стационарном состоянии, характеризуются аморфным и однородным состоянием цитоплазмы. Механизм, ответственный Gerald'ом Maning'ом в 60-х годах прошлого века. В рассматриваемом случае он предоставляет возможность качественно описать влияние электростатических сил посредством эффективного механического момента, действующего на молекулу ДНК, рассматриваемую как упругую анизотропную нить. В результате, следуя идеям G. S. Manning'a, конформацию ДНК удастся описать в рамках классической теории Kirchhoff'a одномерной эластики, [17].

Будем рассматривать осевую линию молекулы ДНК как упругую нить или стержень. Как было отмечено выше, на промежуточных (мезо)масштабах конформация этой нити опре-

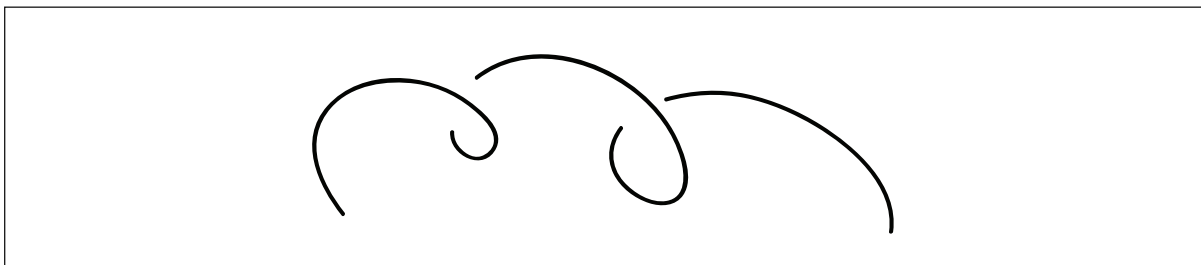


Рис. 6. Кривая, иллюстрирующая решение уравнения Кирхгофа

деляется, в основном, ее упругой энергией. Последняя обычным образом может быть разложена по тензору деформации. Для интересующих нас вопросов существенно наличие внутренне-анизотропной упругости молекулы, т. е. тот факт, что упругие модули не изотропны. Эта анизотропия упругих модулей появляется естественным образом, так как, заменяя двойную спираль одной упругой линией (осью спирали), мы обязательно должны учесть анизотропную структуру ДНК. Во многих работах указанную анизотропию не учитывают, что приводит к существенному загромождению, а то и вовсе потере результатов. На механическом языке полинуклеотидные нити, образующие двойную спираль, могут быть представлены как винтовые бороздки на рассмотренном выше упругом стержне, причем одна из этих бороздок узкая, а другая широкая. Это же обстоятельство приводит к очень важному для ψ -конденсации следствию. Напомним, что молекула ДНК является заряженной и несет элементарный заряд $-2e$ на пару фосфатных остатков. Далее, за счет «конденсации» противоионов из раствора происходит частичная компенсация отрицательного заряда ДНК. Такая задача о заряженной нити (полиионе) в растворе, содержащем противоионы, рассматривалась многими авторами. Было показано, что при заряде полииона, превышающем некоторое критическое значение, противоионы «конденсируются» на полион, снижая плотность заряда до критического значения. Отличительная черта такой модели, как уже отмечалось выше, состоит в представлении о внутренней анизотропии макромолекулы, в том числе и по распределению плотности заряда в узкой и широкой бороздках полииона. Это означает, в частности, что компенсация заряда за счет противоионов происходит неоднородно и анизотропно по длине молекулы, например, в силу неоднородности поля, создаваемого отрицательными зарядами фосфатных групп в узкой или в широкой бороздке. В результате удастся получить качественно верное описание тороидальных структур, [18]. А именно, полученные таким способом результаты дают описание тороидальных структур и находятся в качественном согласии с экспериментом, в том, что касается численных данных. Во всяком случае, размеры тороидов получаются вполне разумные. Недостатком данного подхода является то, что он не учитывает стерическое отталкивание отдельных сегментов молекулы и оставляет в стороне вопрос о гексагональной симметрии. Во всяком случае здесь необходимо дополнительное исследование. Но если учесть, что гексагональная симметрия обычно вводилась «руками», то вполне возможно, что этот недостаток является в действительности достоинством. Во всяком случае, можно ожидать, что уравнения Kirchhoff'a дадут решения, удовлетворяющие некоторой симметрии. Какой именно и как она будет согласовываться с экспериментом, «remains to be seen».

Здесь следует отметить, что тороидальные формы ДНК могут образовываться при условиях, когда электростатическим взаимодействием можно пренебречь. По-видимому, не существует единого механизма возникновения тороидов, и рассмотренный выше электростатический подход является только одним из возможных.

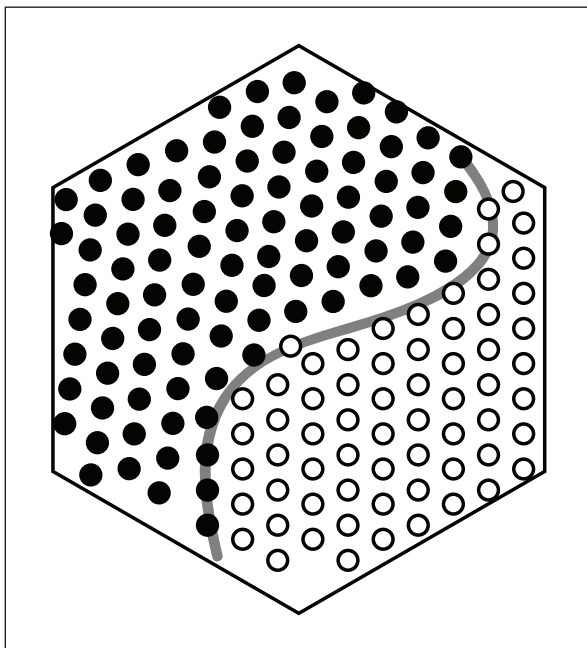


Рис. 7. Нарушение гексагональной симметрии в тороиде

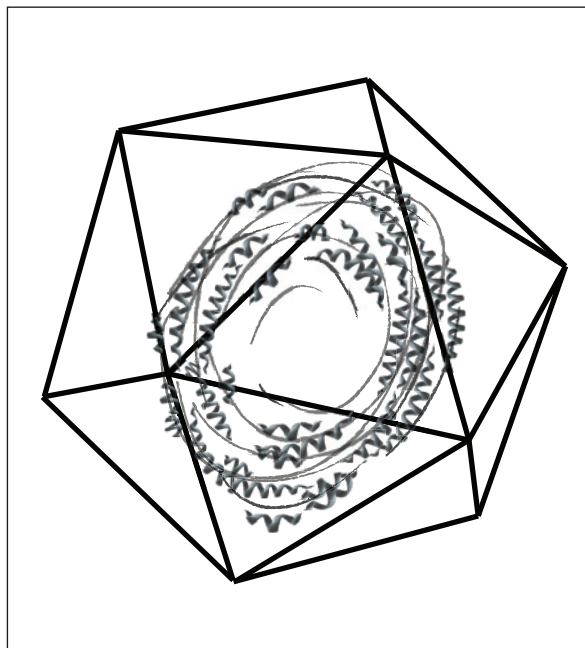


Рис. 8. Компактное образование из молекулы ДНК внутри икосаэдрической капсулы

4 Проблема особенностей укладок и намоток.

Соображения о гексагональной симметрии торических укладок ДНК уже давно используются в теоретических работах, [19]. В основе лежат соображения математической целесообразности, поскольку для того чтобы хоть что-то просчитать авторам нужны упрощающие соображения. Экспериментаторы, в свою очередь, охотно видят то, что им советуют увидеть теоретики (например, работа Hud'a & Downing'a, [6], которая, надо отдать им должное, выглядит как вполне честная работа). По-видимому, эти симметричные соображения вполне адекватны для тороидов, образовавшихся в свободном растворе, т. е. когда нет влияния стенок (клеточных мембран, капсидов вирусов и т. п.), но в случае, когда такие ограничения имеются, нужно решать соответствующую задачу теории электро-упругости, и далеко не ясно, сохраняться ли «общепринятые» условия симметрии.

4.1 *Analysis situs* укладок ДНК.

Соотношения гексагональной симметрии, по-видимому, действительно имеют место, но нужно учитывать, что они могут быть приближенного характера. В сущности, проблема похожа на задачу «смотреть садовый шланг таким образом, чтобы его можно было запихнуть в небольшой ящик». Можно ожидать, что тут должны проявиться явления, основанные на требовании согласования метрических и симметричных свойств системы – мотка ДНК. Задача согласования метрики и симметрии для намоток не изучалась. Она актуальна, и её следует исследовать. Она может быть полезна при анализе экспериментальных данных, которая как показывает работа Hud'a & Downing'a, не тривиальна. Среди прочего, она представляет значительный интерес для исследования икосаэдрических ДНК-вирусов, расположение молекулы ДНК в которых как-то не особенно обсуждалось в литературе (наука безмолвствует, что можно рассматривать как биомолекулярный вариант финальной сцены «Бориса Годунова»).

4.2 Особенности и преимущества вирусной проблемы.

Исследование укладок ДНК в вирусах интересно с одной стороны, потому что это актуальная биологическая задача, результаты исследования которой могут иметь важные практические последствия, значимость которых может превзойти ожидания, и, с другой стороны, она выглядит как более трактательная нежели аналогичная задача расположения тороида ДНК в клетке общего типа. Во всяком случае, её понятно как ставить в рамках теории электро-упругости, а значит что-то можно и разрешить. Постановка задачи конформации тороида ДНК в клетке общего вида - *не ясна*.

4.3 Укладки ДНК в хроматине.

ДНК в клетке хранится в специально упакованном виде. Такая упаковка – *хроматин* – имеет одинаковую структуру в клетках различных организмов и определяется несколькими уровнями. Так, на микроскопическом уровне он представляет собой совокупность *нуклеосом* [20]. Нуклеосома состоит из ядра – белковой глобулы из восьми субъединиц, *гистонов*, – обёрнутого в молекулу ДНК, обычно содержащую 147 пар оснований. В нуклеосомное ядро входит по две субъединицы каждого из четырёх различных гистонов (Н2А, Н2В, Н3 и Н4). Нуклеосомы соединяются между собой посредством гистона Н1, образуя следующий уровень упаковки в структуры больших масштабов, в конечном счёте образуя хроматин. Данная упаковка схематично изображена на рисунке 9; хромосомы представляют собой плотные клубки хроматиновых нитей, каждая из которых есть, в свою очередь комплекс нуклеосом.

Такая упаковка позволяет значительным образом сократить объём, занимаемый молекулой ДНК (в 30-40 раз). Столь сильное сжатие обуславливает значительную деформацию молекулы ДНК: длина персистентности молекулы составляет порядка 500 Å, как раз эту величину имеет петля из молекулы нуклеиновой кислоты в нуклеосоме. При моделировании молекулы ДНК как однородного стержня сжатие было бы равномерным, в результате чего образовывалась бы петля. Реальная ДНК имеет более сложную структуру: борозд-

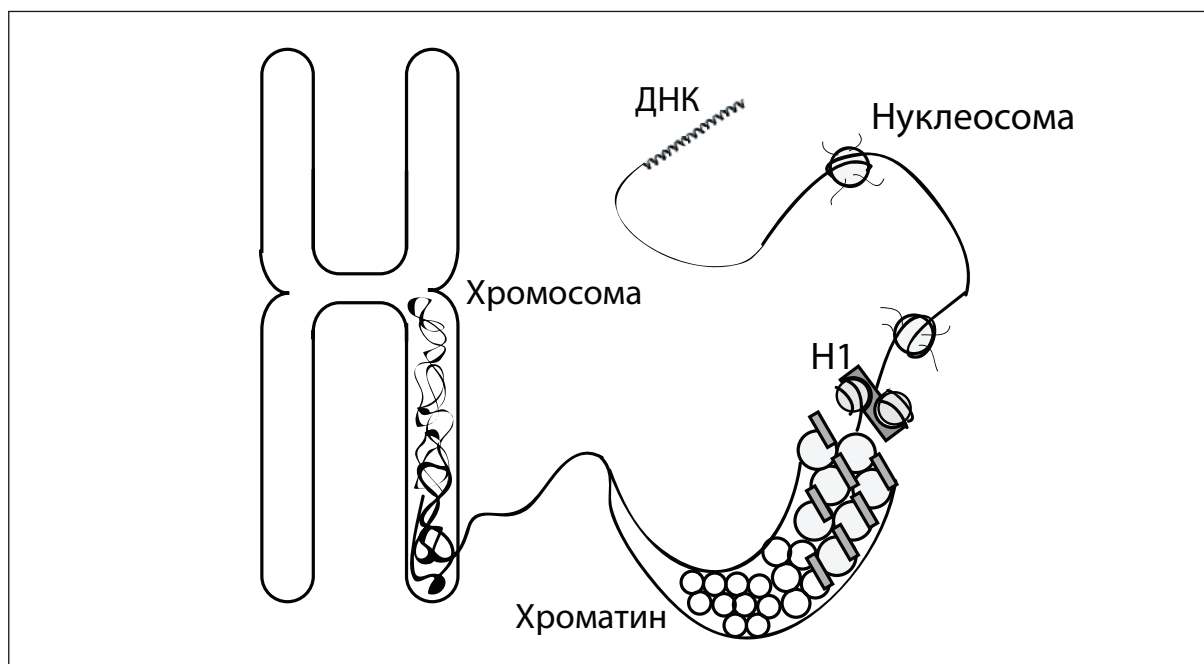


Рис. 9. Иллюстрация структуры хроматина в клетке

ки и наличие двух нитей, что существенным образом влияет на её упругие свойства при намотке на гистоновое ядро. Во-первых, ДНК начинает сильнее изгибаться по бороздкам, то есть, в тех местах, в которых она прилегает одной из бороздок к октамеру. С другой стороны, поскольку отрицательный заряд несёт сахаро-фосфатный остов, в тех областях поверхности октамера, где имеется положительный заряд, энергетически выгоднее оказывается конформация, когда ДНК прилегает к гистонам своим остовом. Таким образом, на молекуле ДНК появляются два типа характерных областей, определяющих её деформацию: это точки электростатического прикрепления ДНК и ядра, а также точки изгиба молекулы по бороздкам. Эти особенности видны как экспериментально (на микроскопической структуре, полученной в рентгеноструктурном анализе), так и в полноатомных моделях в молекулярно-динамических вычислениях. В частности, было показано, что ДНК находится в сверхспирализованном по отношению к обычной В-форме состоянии: расположение двух положительно заряженных областей на гистоновом ядре оказывается ближе, чем шаг спирали, в результате чего ДНК вынуждена "докручиваться", чтобы обе эти области соприкасались с остовом молекулы нуклеиновой кислоты. Интересно, что сам факт наличия изломов (*kinks*) известен достаточно давно, [24].

Важным обстоятельством здесь является то, что роль подобных намоток с биофизической точки зрения исследована плохо. Имеется множество гипотез о том, как структура хроматина связана с действием различных белков, влияющих на регуляцию связанных с ДНК процессов транскрипции и репликации, [27]. С этой точки зрения интересны исследования структуры хроматина и белков, участвующих в его образовании, [26].

Хроматин является крайне сложной структурой, на которую могут значительным образом влиять параметры среды. По этой причине значительный интерес представляют типы деформации двойной спирали и условия, при которых они могут возникать. Так, например, способ намотки молекулы ДНК зависит от нуклеотидной последовательности и виток может содержать 146 пар оснований [25]. Структура нуклеосомы значительным образом зависит от условий, в которых находится комплекс (ионный состав, ионная сила раствора и др., [21]). Это, в частности, обусловлено и свойствами молекулы ДНК как полииона. Можно предположить, что увеличение ионной силы раствора приведёт к усилению экранировки зарядов фосфатного остова молекулы, что, в свою очередь, уменьшит длину персистентности ДНК. Это будет означать, что молекула будет деформироваться значительно легче.

С точки зрения процессов в клетке значительный интерес представляет также механизм прикрепления молекулы ДНК к гистоновому октамеру; нуклеотидная последовательность ДНК влияет на её механические свойства, а потому энергия связи нуклеиновой кислоты с ядром оказывается больше или меньше для различных последовательностей. Известна т.н. 601-я последовательность пар оснований, которая очень хорошо связывается с гистоновым октамером, и часто используется в экспериментальных исследованиях. Можно предположить, что свойства таких важнейших процессов как репликация или транскрипция будут зависеть от нуклеотидной последовательности ДНК. Кроме того, подобные исследования могут выявить корреляцию между последовательностью пар оснований и регуляцией генов.

Наглядно структуру нуклеосомы можно сравнить с толстой нитью, виток которой намотан на боковую поверхность цилиндра. В роли цилиндра при этом выступает гистоновый октамер, имеющий нетривиальную структуру. Как было отмечено ранее, гистоновый октамер состоит из четырёх пар одинаковых белков: H2A, H2B, H3 и H4, которые, объединяясь, образуют нуклеосомное ядро, рис. 12. Внешняя поверхность такого ядра имеет множество полярных аминокислот, обуславливающих значительный заряд на поверхности. Боковая поверхность, при этом, оказывается заряженной положительно, поэтому отрицательно заряженная поверхность молекулы ДНК прилипает к ней, образуя устойчивый нуклеосом-

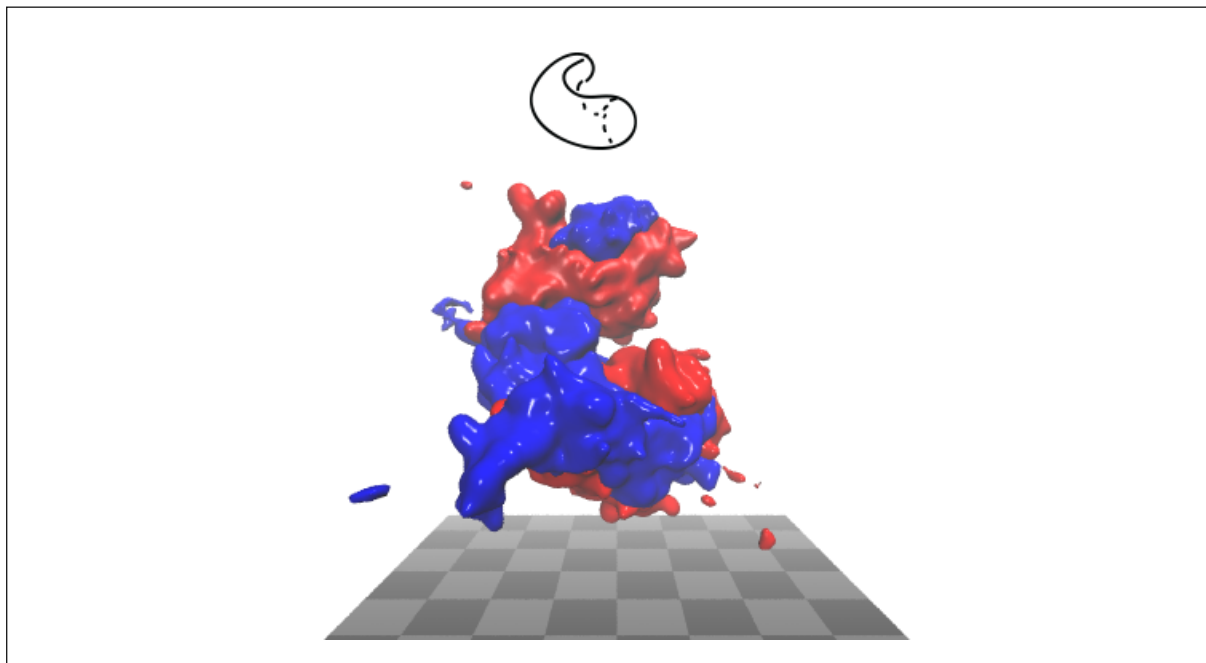


Рис. 10. Четыре субъединицы гистонового октамера: два H2A и два H2B образуют фигуру в форме подковы в горизонтальной плоскости.

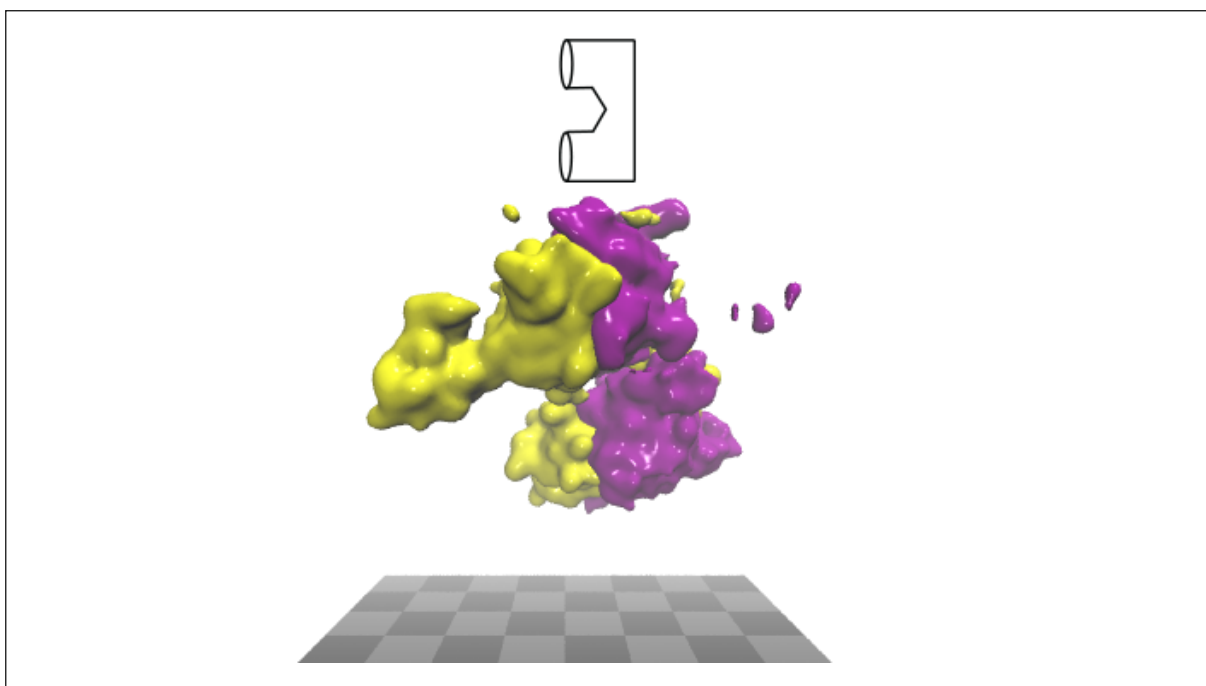


Рис. 11. Четыре субъединицы гистонового октамера: два H3 и два H4 образуют фигуру в форме подковы в вертикальной плоскости

ный комплекс. Схема сборки нуклеосомы из составных частей показана на рисунках 10 - 13.

Кроме положительно заряженной боковой поверхности, внешняя часть октамера содержит фрагменты с отрицательным зарядом, у которых также есть некоторый смысл. Помимо указанных типов гистонов имеются также и другие, которые имеют собственное предназначение – так, например, гистоны H1 служат для скрепления нуклеосом между собой. Намотка молекулы ДНК на гистоновый октамер представляет интерес в связи с двумя

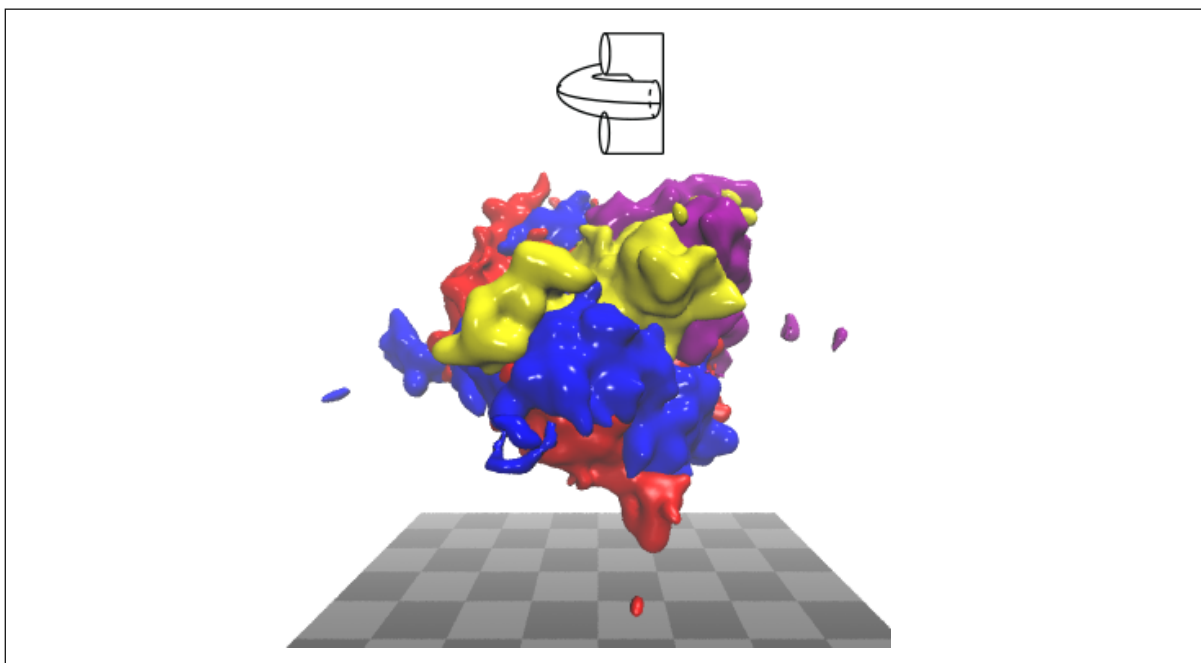


Рис. 12. Соединение двух подков с образованием гистонового октамера катушки для витка ДНК

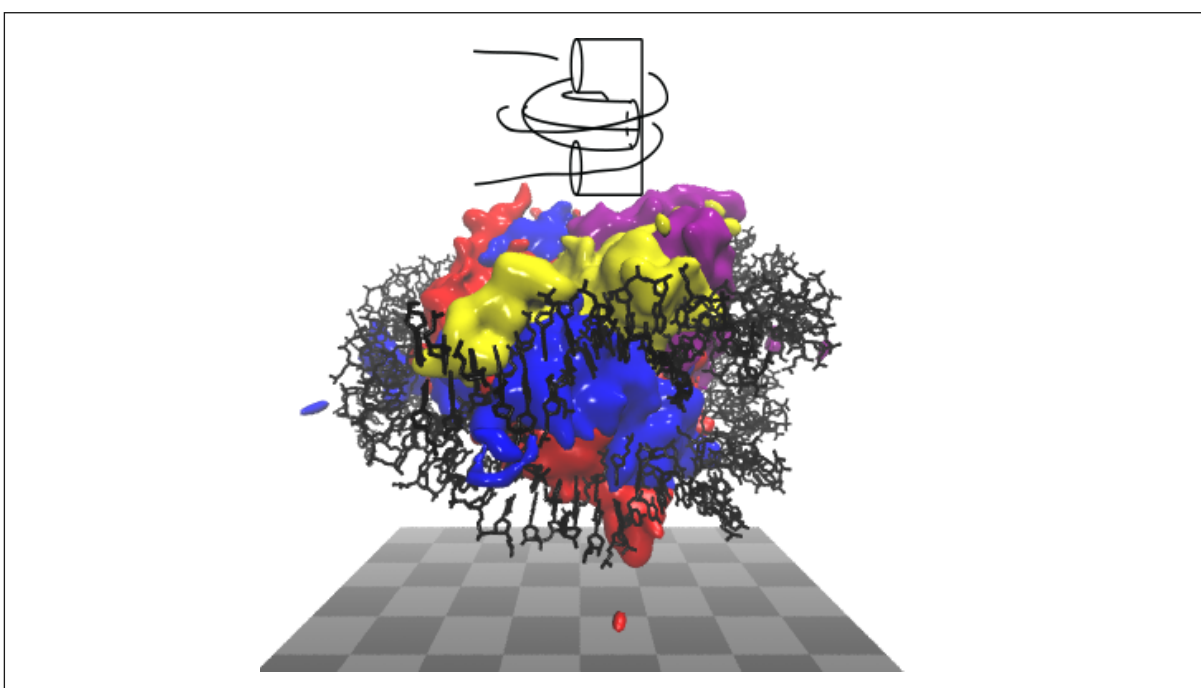


Рис. 13. Нуклеосома: гистоновый октамер с намотанным витком ДНК.

обстоятельствами. Во-первых, последовательность нуклеотидов фрагмента ДНК влияет на то, насколько хорошо связывается ДНК с октамером. Как было отмечено выше, нуклеотидный состав может даже изменить количество пар оснований, связанных с белковым ядром. Во-вторых, молекула ДНК имеет бороздки, расположенные несимметрично, ввиду чего намотка оказывается не равномерной, а с изломами. Таким образом, есть почти прямолинейные отрезки молекулы, а есть с изломами. Наличие изломов достаточно интересно и исследование их положения на молекуле может влиять на энергию деформации молекулы и полную энергию системы.

Интересен также и тот факт, что нуклеосома стабильна (удерживает молекулу ДНК) даже в том случае, когда гистонов в ядре не восемь, а шесть или даже четыре. Так, с боковой поверхности нуклеосомы (со стороны обоих оснований цилиндра) может отсоединяться димер Н3-Н4. В результате, может оказаться, что виток ДНК удерживается двумя димерами Н2А-Н2В, что подтверждается проведённым нами компьютерным моделированием.

Считается, что такой именно тетрасома является промежуточным комплексом при сборке и распаде нуклеосом, [28]. При этом сборка и разборка *in vivo* осуществляется, по-видимому, при помощи вспомогательных белков, схема этого процесса изображена на рисунке 14.

Структуры нуклеосом представляют значительный экспериментальный интерес и активно изучаются в настоящее время (микроскопия и т.п.). В частности, интересен вопрос о том, как ДНК разматывается с гистонowego ядра, например, при прохождении через нуклеосому ДНК-полимеразы. Существуют различные модели этого процесса, [29], [30], которые пока опираются на косвенные данные. Следует отметить, что зернистая структура хроматина может объяснить действия различных белков и молекул на характерных расстояниях, кратных длине витка. Подобные гипотезы высказываются и имеют право на существование, однако экспериментально проверить подобные предположения крайне затруднительно. Единственный метод, который может дать некоторую информацию о подобного рода процессах, заключается в компьютерном моделировании таких систем. Молекулярно-динамические вычисления, однако, зачастую носят характер построения одной или нескольких траекторий, особенно в тех случаях, когда речь идёт о больших структурах и комплексах (в случае полноатомной модели к таковым можно отнести одну нуклеосому, а рассмотреть на современных компьютерах хроматин практически невозможно). Такой подход совершенно не учитывает статистические поправки, которые имеют место в реальной системе. Кроме того, имеется множество других проблем, связанных с моделированием молекулярных систем, которые сводятся к тому, что следует относиться к результатам моделирования с большой осторожностью, и проводить численное моделирование одних и тех же систем несколько раз различными методами.

Таким образом, молекулярное моделирование - крайне мощный инструмент для изучения макромолекулярных систем, которым не следует пренебрегать, однако использовать его с большой осторожностью.

Экспериментально основная информация о структуре молекулы получена из рентгеноструктурного анализа (pdb 1kx5 и 3lz0). В этом случае удавалось получить кристалл из нуклеосомных комплексов, после чего извлекать из кристалла структуру ячейки классическими методами. При получении структур таким образом следует помнить о двух моментах. Во-первых, структура нуклеосомы чувствительна ко внешней среде, поэтому полученная таким образом структура, вообще говоря, может отличаться от структуры *in vivo* (как, впрочем, и *in vitro*). С этой точки зрения информация о структуре, интересующая исследователей, не исчерпывается полученной таким образом. Вторым моментом является то, что в таком эксперименте координаты подвижных частей кристаллизуемого комплекса будут найдены неточно. Это, впрочем, часто оказывается не важным, поскольку про подвижность таких фрагментов часто известно *a priori*.

Ответ на вопрос, как выглядит структура нуклеосомы в условиях живой клетки обычно решается путём компьютерного моделирования, поскольку других инструментов на данный момент нет. Разработка методики, которая позволила бы исследовать нуклеосомы на XFEL представляет несомненный интерес, и одновременно является крайне сложной задачей. Моделирование динамики белковых структур и их комплексов проводится преимущественно методом молекулярной динамики, [22], [23]. При этом для анализа получаемых структур могут применяться и другие средства, как графические (например, VMD), так и аналитические (например, X3DNA для анализа деформаций молекулы ДНК). В

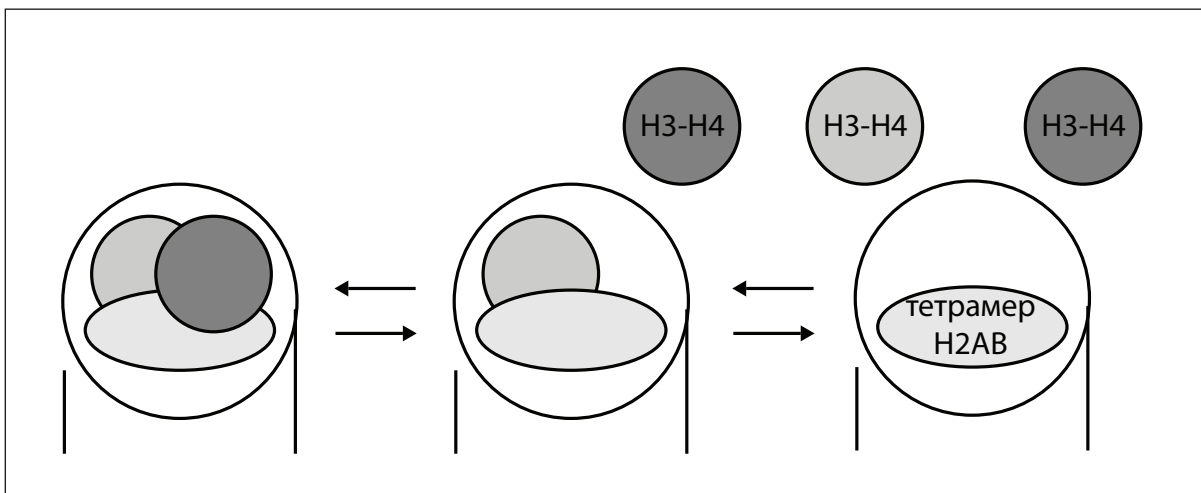


Рис. 14. Подвижность димеров H3-H4 с образованием тетрасомы

молекулярно-динамическом приближении каждый атом (или несколько атомов в случае крупнозернистых моделей) представляется шаром с массой и зарядом, а ковалентные связи – голономными или гармоническими связями конструируемой механической системы. При этом, каждому шару приписываются некоторый набор силовых констант, определяющихся используемым силовым полем и типом обозначаемого им объекта. Моделируемая система собирается из таких элементарных шариков и пружинок, после чего производится численное интегрирование уравнений Ньютона для построенной механической системы. Выше уже отмечалось, что теоретический анализ задач компактной конформации молекул ДНК представляет очень сложную задачу и требует использования различных аппроксимаций, т.е. модельных представлений. При этом необходимо учитывать, что основными силами, определяющими характер этих задач являются упругие и электростатические силы. Таким образом, необходимо последовательно работать в рамках теории электро-упругости.

5 Проблема особенностей укладок и намоток.

К настоящему времени достигнуты значительные успехи в применении электронной микроскопии и рентгеноструктурного анализа к изучению компактных форм ДНК (особо отметим работу Hud'a & Downing'a). Вместе с тем нужно использовать новые инструменты (XFEL), которые позволят проверить старые результаты и получить новые, недоступные для старых методик. Во всяком случае, обещания, которые дают строители XFEL'ей, позволяют надеяться увидеть что-то новое. В этом отношении первостепенной является задача исследования симметричных дефектов тороидальных укладок ДНК, выяснения их структурных особенностей и роли в биологических процессах. Возможно, удастся посмотреть динамику образования укладок в реальном времени. Как утверждают создатели XFEL-аппаратуры, технические возможности для этого будут. Сюда же относится задача исследования расположения тороидов в клетке, по-видимому, в настоящий момент не поддающаяся теоретическому анализу, и исследование конформации ДНК в нуклеосоме и её биологическая значимость (имеющиеся данные о кристаллической структуре получены для нуклеосом в специальных условиях, при которой возможна кристаллизация; при этом, вообще говоря, неясно, так ли будет организована нуклеосома в клетке). Исследование конформации ДНК в вирусах – трудная теоретическая задача. Она представляет значительный интерес для понимания устойчивости вирусной частицы по отношению к внешним воздействиям, например, микроволновому излучению. Здесь необходимо применение мощных новых приборных средств. По-видимому, XFEL тут будет очень кстати.

Опять же, если дать волю воображению, было бы интересно посмотреть в реальном времени («кино») разрушение капсида вирусной частицы, или выбрасывание бактериофагом нуклеиново-кислотной начинки бактериофага. Никакой мало-мальски разумной теории таких процессов в настоящее время нет. Для создания таковой требуется основательная подсказка со стороны экспериментаторов. Значимость этой проблемы не требует пояснений.

В.Л.Г. благодарит Программу Прогресса Фундаментальных Исследований Высшей Школы Экономики за финансовую поддержку.

Список литературы

- [1] *Lifshitz I.M.* Some Problems of the Statistical Theory of Biopolymers // ZhETF, 1969, **28**, p.1280.
Френкель Я.И. Кинетическая теория жидкости // Л.: Наука, 1975.
- [2] *Yevdokimov Yu.M. et al.* A compact form of double-stranded DNA in solution // FEBS Lett. 1972, **23**, p.180.
- [3] *Lerman L.S.* Physico-Chemical Properties of the Nucleic Acids // J. Duchesne, ed., Academic Press, London, pp. 59-76, 1973.
- [4] *Petrov A. S., Harvey S. C.* Structural and thermodynamic principles of viral packaging // Structure, 2007, **15**(1), pp.21–27.
- [5] *Marenduzzo D. et al.* DNA–DNA interactions in bacteriophage capsids are responsible for the observed DNA knotting // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2009, **106**, pp.22269–74.
- [6] *Hud N. V., Downing K.H.* Cryoelectron microscopy of λ -phage DNA condensates in vitreous ice: The fine structure of DNA toroids // PNAS, 2001, **98**, pp.14925–14930.
- [7] *Manning G. S.* A procedure for extracting persistence lengths from light-scattering data on intermediate molecular weight DNA // Biopolymers, 1981, **20**, pp. 1751–1755.
- [8] *Leforestier A. et al.* Protein-DNA Interactions Determine the Shapes of DNA Toroids Condensed in Virus Capsids // Biophysical Journal, 2011, **100**, pp.2209–2216.
- [9] *Livolant F.* Ordered phases of DNA in vivo and in vitro // Physica A, 1991, **176**, pp. 117-137.
- [10] *Frenkiel-Krispin D. et al.* Nucleoid restructuring in stationary-state bacteria // Molecular Microbiology, 2004, **51**(2), pp.395–405.
- [11] *Vasilevskaya V. V. et. al.* Structure of collapsed persistent macromolecule: Toroid vs. spherical globule // Biopolymers, 1997, **41**(1), p. 51.
- [12] *Fenley M. O., Manning G. S. and Olson W. K.* Approach to the limit of counterion condensation // Biopolymers, 1990, **30** (13-14), pp.1191-1203.
- [13] *Manning G. S.* // Comments Mol. Cell. Biophys. 1982, **5**, 311 (1982).
- [14] *Marky N.L. and Manning G.S.* The elastic resilience of DNA can induce all-or-none structural transitions in the nucleosome core particle // Biopolymers, 1991, **31**(13), pp.1543-57.
- [15] *Manning G. S.* Packaged DNA. An Elastic Model // Cell Biophys. 1985, **7**(1), pp. 57-58.

- [16] *Manning G. S.* Electric and Elastic Instabilities of DNA //in Theoretical Biochemistry and Molecular Biophysics, ed. by O. L. Beveridge and R. Lavery. Adenine Press, New York, p. 191, 1990.
- [17] *Kirchhoff G.* Mechanik // Teubnir, Berlin, 1897.
- [18] *Golo V.L., Kats E. I., Yevdokimov Yu. M.* Toroidal Structures Due to Anisotropy of DNA-like Molecules // J. Biomolecular Structure & Dynamics 1998, **15**, pp.757-764.
- [19] *Ubbink J., Odijk T.* Polymer-and salt-induced toroids of hexagonal DNA // Biophys. J. 1995, **68**, p.54.
- [20] *Kornberg R.D.* Structure of chromatin // Annu. Rev. Biochem. 1977, **46**, pp.931–954.
- [21] *van Holde R.E.* Chromatin // Springer, New York, 1988.
- [22] *Roccatano D., Barthel A., Zacharias M.* Structural Flexibility of the Nucleosome Core Particle at Atomic Resolution Studied by Molecular Dynamics Simulation // Biopolymers, 2007,**85**(5-6), pp. 407-421.
- [23] *Materese C., Savelyev A., Papoian G.* Counterion Atmosphere and Hydration Patterns near a Nucleosome Core Particle // JACS 2009, **131**, pp. 15005-15013.
- [24] *Hogan M.E., Rooney T.F., Austin R.H.* Evidence for kinks in DNA folding in the nucleosome // Nature, 1987, **328**, pp. 554-557.
- [25] *Richmond T.J., Davey C.A.* The structure of DNA in the nucleosome core // Nature, 2003, **423**, pp. 145-150.
- [26] *Rea S. et al.* Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases // Nature, 2000, **406**, pp. 593-599.
- [27] *Narlikar G.J., Fan H.-Y., Kingston R.E.* Cooperation between Complexes that Regulate Chromatin Structure and Transcription // Cell, 2002, **108**(4), pp. 475-487.
- [28] *Donham D.C., Scorgie J.K., Churchill M.E.A.* The activity of the histone chaperone yeast Asf1 in the assembly and disassembly of histone H3/H4–DNA complexes // Nucleic Acids Research, 2011, **39**(13), pp.5449-5458.
- [29] *Luse D.S., Studitsky V.M.* The mechanism of nucleosome traversal by RNA polymerase II. Roles for template uncoiling and transcript elongation factors // RNA Biology, 2011, **8**(4), pp.581-585.
- [30] *Chang H.-W. et al.* Analysis of the mechanism of nucleosome survival during transcription // Nucleic Acids Research, 2013, **42**(3), pp.1619-1627.

TOROIDAL CONFORMATIONS OF DNA MOLECULES

V.N. Blinov¹, V.L. Golo^{2, 3, 4}, Yu.F. Krupyanskiy², A.A. Tuzhilin³

¹*Science Center in Chernogolovka RAS,*

²*Semenov Institute of Chemical Physics RAS*

³*Dept. of Mechanics and Mathematics Lomonosov Moscow State University*

⁴*National Research University, Higher School of Economics*

voislav.golo@gmail.com

Received 07.06.2015

We consider dense toroidal structures of DNA molecules in cells and viruses. The problem needs special studying. For one thing the space scale of the system being small one has to admit that such structures must be compact enough to accommodate a molecule of the DNA, for another the molecule should be easily accessible for various biochemical processes, for example replication. Theoretical treatment of the problem runs across substantial difficulties, and therefore there is a need for the experimental investigation of the DNA conformation in cells and viruses. The XFEL could be instrumental to that end.