В заключение отметим, что развитие исследований по нелинейной конформационной динамике ДНК показывает возможность получения реальных, экспериментально значимых результатов в рамках достаточно простых теоретических моделей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Волков С. Н. Конформационные возбуждения в макромолекулах типа ДНК // Молекулярная биология. 1992. Т. 26. Вып. 4. С. 835-846.

2. Зенгер В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот. М., 1987.

3. Иванов В. И. В→А переход в ДНК и транскрипция // Биополимеры и клетка. 1985. Т.1. № 1. – С. 5–13.

4. Волков С. Н., Савин А. В. Солитонная динамика локальных переходов в бистабильной одномерной системе // Укр. физ. журн. 1992. Т. 37. № 4. – С. 498–504.

5. Немцов В Б., Камлюк А.Н. Динамические модели молекул ДНК и их частотный спектр.-Минск: БГТУ, 2000. - С. 280-282.

6. Baumann G. et al. Stretching of single collapsed DNA molecules // Biophys. J. V. № 78. 2000. – P. 1965–1978.

УДК 536.758

А.Н. Камлюк, ассистент; В.Б. Немцов, профессор

КОМПАКТИЗАЦИЯ ДНК НА НУКЛЕОСОМНОМ УРОВНЕ СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ХРОМОСОМ

The modern data on DNA packing on the nucleosome level of structural organization of chromosomes are considered. The force schemes of the first-level packing are proposed. These schemes are analyzed depending on the adjacency type of DNA fragment to the histon octamer.

1. Введение

Выяснение молекулярных механизмов функционирования сложных клеточных структур является одним из наиболее актуальных аспектов активно развивающегося направления в современной биологии – клеточной инженерии. Среди исследуемых проблем одно из главных мест занимает проблема строения, организации и работы хромосомного аппарата. Решение данного вопроса позволило бы понять, каким образом происходит дифференцировка клеток, являющихся элементарными единицами организма, злокачественный рост; привело бы к созданию общей теории регуляции работы генов высших организмов, в том числе и человека.

В клетке основная масса ДНК содержится в ядрах и обнаруживается при митозе в дискретных структурах – хромосомах, которые являются основными структурами наследственного аппарата клетки. В обычном состоянии в интерфазных ядрах генетический материал представляет собой хроматин. Диспергированный хроматин, фиксированный формальдегидом в буфере с низкой ионной силой, в электронном микроскопе выглядит как цепочка бусин (нуклеосом).

Хромосомы изучаются уже более ста лет. Они легко различимы под микроскопом, поскольку их минимальная длина равна 0.2 мкм, а максимальные размеры достигают 50 мкм. Сейчас очевидно, что в состав хромосом, кроме ДНК, входит еще ряд компонентов – гистоны, негистоновые белки, РНК и липиды.

ДНК бывает локализована в вирусных частицах, в клетках прокариот и в ядре эукариотических клеток. Суммарная длина ДНК в классах организмов, стоящих на различных ступенях эволюционной лестницы, варьируется от нескольких микрометров до нескольких сантиметров. По мере повышения уровня эволюционного развития организма количество содержащегося в клетке генетического материала увеличивается от 10^4 до ~ 10^{10} пар нуклеотидов.

В клеточном ядре эукариот, объем которого приблизительно такой же, как объем всей бактериальной клетки, содержится гораздо большее количество ДНК, поэтому ее структурная организация в этом случае существенно сложнее.

Как известно [1, 2], хромосома эукариот содержит одну непрерывную молекулу двухцепочечной ДНК. Это означает, что длина ДНК в хромосоме составляет несколько сантиметров. В то же время линейный размер метафазных хромосом несколько микрон. Разница в длине составляет ~ 10⁴. Иными словами, ДНК в хромосоме упакована таким образом, что линейные размеры структуры сокращаются в 10⁴ раз.

Наконец, активация генетического аппарата, т. е. его вовлечение в активную транскрипцию, осуществляется через структурный переход, предсказанный теоретически [3] и который в некоторых случаях можно наблюдать даже в световом микроскопе [1]. Следует отметить, что основным содержанием такого перехода является декомпактизация, деконденсация до этого плотно упакованного хроматина.

Таким образом, очевидно, что понимание укладки ДНК в хромосоме позволит подойти к пониманию механизмов функционирования последней, от которого в значительной мере зависят успехи в изучении таких важных и сложных вопросов, как клеточная дифференцировка, злокачественный рост, роль биополимеров в регуляции экспрессии генетической информации и многие другие не менее важные процессы на клеточном уровне.

Цель данной работы состоит в кратком обзоре структурной организации хромосом и в теоретическом моделировании нуклеосомной упаковки молекулы ДНК.

2. Нуклеосомный уровень: общие сведения

К настоящему времени достигнуты большие успехи в изучении структурной организации генетического материала эукариот [1, 2, 4, 5] и прокариотических с танизмов [6].

Первым и общепризнанным уровнем компактизации хромосом является цепь плотно прилегающих друг к другу нуклеосом. Последние (рис. 1) напоминают по форме сплюснутые эллипсоиды, сердцевина которых состоит из октамера гистонов (по две молекулы гистонов H2A, H2B, H3 и H4) и накрученного на него фрагмента ДНК длиной около 26,8 нм [7]. Участок ДНК, навитый на один октамер в виде левых 1,75 витка, называется нуклеосомной кор-частицей, а соединительный участок ДНК между соседними нуклеосомами – линкерным.

Гистоны расположены латерально, так что внешняя поверхность ДНК оставлена свободной. Они способны осциллировать между комплементарными нитями ДНК. Предполагается [3], что боковая нейтрализация фосфатных групп с помощью гистонов индуцирует свертывание ДНК в нуклеосомы. Т. е. гистоновый октамер связан с ДНК таким образом, что гистоны нейтрализуют отрицательные заряды лишь с одной стороны двойной спирали; на противоположной стороне нейтрализация зарядов отсутствует, и все это должно способствовать изгибанию молекулы ДНК вокруг гистонового кора [8].



Рис. 1. Модель нуклеосомного кора [8], состоящего из гистонового октамера – 1 и фрагманта ДНК – 2 (гистон Н1 – 3 находится у края нуклеосомы и скрепляет точки "входа" и "выхода" ДНК)

С линкерной ДНК связана одна молекула гистона типа H1. Молекула этого лизинбогатого гистона располагается у края нуклеосомы и связана с ДНК в месте ее "входа" и "выхода" из коровой частицы [8]. Взаимодействия гистонов H1 дают основной вклад в стабилизацию наднуклеосомной организации – более плотной структуры, которая здесь рассмотрена не будет, т. к. на данном этапе нас интересует только первый уровень структурной организации генома.

3. Конденсация молекул ДНК в ионных условиях

Молекула ДНК образует упорядоченную компактную структуру не только при взаимодействии с гистоновым октамером. Она обладает способностью компактизоваться и сама по себе, например, в присутствии солей или инертных полимеров. В таких условиях происходит спонтанная конденсация молекулы ДНК. Такое же явление наблюдается и при добавлении в систему полиаминов или этанола. Добиваясь самоорганизации подобным образом, можно моделировать упаковку ДНК, что представляет значительный интерес. При этом считают [9], что такие физические взаимодействия, как изгибание и изменение кулоновских взаимодействий, также должны принимать участие в упаковке ДНК в эукариотическом ядре и прокареотическом нуклеотиде.

В последнее время при проведении исследований по изучению зависимости конденсации одиночных молекул ДНК от ионных условий и степени растяжения наблюдали кривые сила-растяжение с плато [10–13]. Плато напоминает поведение ДНК при перерастяжении, а также может быть обусловлено взаимодействием между двумя или более конденсированными молекулами ДНК, что и наблюдалось в [10].

Однако в ходе совместного анализа экспериментальных данных две группы ученых [11], придя к единому мнению, постулировали, что плато силы, вызываемое мультивалентными катионами, возникает из-за внутримолекулярной конденсации ДНК. Следующие наблюдения подтверждают интерпретацию этого явления: во-первых, плато возникает в присутствии трехвалентных катионов гексаамина кобальта (Ш) и спермидина³⁺, которые известны как конденсирующие агенты в водных растворах, но не с двухвалентными катионами Mg^{2+} и путресцином²⁺, несмотря на то, что эти ионы уменьшают персистентную длину; во-вторых, ионные условия, требуемые для индуцирования плато силы, согласуются с теми условиями, которые необходимы для индуцирования критической степени нейтрализации заряда перед конденсацией ДНК. И наконец, светорассеяние возрастает, что сопровождает конденсацию ДНК в объеме раствора, совпадающую с потерей поведения червеобразной цепи и появлением плато силы в

экспериментах с одиночными молекулами. При этом одна группа (из Миннесоты-Орегона) наблюдала постоянное плато силы при (1÷4)·10⁻¹² Н как для циклов натяжения, так и ослабления в условиях конденсирующих растворов, в то время как вторая группа (из Принстона) наблюдала плато около 20·10⁻¹² H [11]. Обе группы согласны, что обратимое поведение постоянной силы наиболее вероятно представляет "чистое" поведение, свойственное конденсации ДНК. Однако кажется, что при компактизации в опытах Принстона наблюдаются некоторые виды структур, которые могут стать целью дальнейшего изучения. Следует отметить, что плато возникает и при более высоких значениях сил растяжения (~ 65·10⁻¹² H) [12, 13].

Если плато силы представляет собой распаковку ДНК из конденсированного состояния, то можно предположить, что как раз именно его значение может соответствовать силе, которая требуется для декомпактизации определенного уровня до этого плотно упакованной структуры.

4. Теоретическое моделирование нуклеосомной упаковки

Быстрое накопление экспериментальной информации делает весьма актуальным развитие теоретического материала. При этом теоретический анализ может послужить незаменимым средством для выяснения интересующих вопросов о структурной организации генома.

На рисунке 2 представлены схемы навивки ДНК на гистоновый октамер с различными вариантами упаковывающей нагрузки.

При рассмотрении предложенных моделей наибольший интерес будут представлять форма изогнутой оси молекулы ДНК и, конечно же, зависимость между силовым фактором компактизации Т (или q) и углом γ, который характеризует степень прилегания навиваемой ДНК к гистоновому октамеру.

Кривизна фрагмента ДНК, связанная с изгибающим моментом, определяется величиной [14]

$$\frac{1}{\rho} = y'' = \frac{M}{x_{\rm b}},\tag{1}$$

где ρ – кривизна фрагмента ДНК; M – изгибающий момент, определяемый в зависимости от схемы нагружения, x_b – жесткость на изгиб (для всех схем принята равной $4.1 \cdot 10^{-28}$ H·м² [15]).

Составим уравнение упругой линии, нагруженной на конце сосредоточен. ой силой T, как показано на рисунке 2a. Для этого поместим начало координат в точку O. При этом изгибающий момент в сечении X равен M = T(b - x). Подставив это выражение в (1) и дважды проинтегрировав полученное уравнение, найдем

$$y = \frac{1}{x_{\rm b}} \left[Tb \frac{x^2}{2} - T \frac{x^3}{6} + c_1 x + c_2 \right],$$

где c_1 и c_2 – постоянные интегрирования, определяемые из граничных условий. В данном случае при x = 0 имеем y = 0 и $y' = tg\gamma$, откуда $c_1 = x_b tg\gamma$, $c_2 = 0$. Тогда

$$y = \frac{1}{x_b} \left[Tb \frac{x^2}{2} - T \frac{x^3}{6} + x_b x tg\gamma \right].$$



б



Рис. 2. Модели нуклеосомной упаковки

Для получения зависимости $tg\gamma = f(T)$ заметим, что при x = b $y = R\cos\gamma$. Если подставить это значение в уравнение упругой линии и учесть условие стыковки со вторым участком в форме $\frac{x_b}{R} = M = Tb$, то после несложных преобразований получим следующее выражение:

$$\frac{1}{\sqrt{1+tg^2\gamma}} - \frac{x_{\rm b}}{R^2 T} tg\gamma - \frac{1}{3} \frac{x_{\rm b}^2}{R^4 T^2} = 0$$

a

или

$$\frac{1}{\sqrt{1+a^2}} - aK_f - \frac{1}{3}K_f^2 = 0,$$
(2)

где $a = tg\gamma$; $K_f = \frac{x_b}{R^2 T}$; **R=3.5 нм** – радиус гистонового октамера.

Полученное уравнение (2) связывает интересующие нас параметры: угол γ и н агрузку *Т*. В результате анализа данного уравнения заметим, что при $\gamma = 0$ (это соответ $\gamma = 90^{\circ}$ (т. е. для случая абсолютного прилегания) значение $T_{\max 1} \rightarrow \infty$, что и следовало бы ожидать.

Если заменить сосредоточенную силу T на равномерно распределенную нагрузку с интенсивностью q (рис. 26), то изгибающий момент будет равен $M = \frac{q(b-x)^2}{2}$, а уравнение для упругой линии с учетом постоянных интегрирования, определенных так же, как и для предыдущей схемы, примет следующий вид:

$$y = \frac{1}{x_b} \left[qb^2 \frac{x^2}{4} - qb \frac{x^3}{6} + q \frac{x^4}{24} x_b x \ tg\gamma \right].$$

Как и в первом случае, интересующая нас зависимость может быть получена аналогичным способом (заметим, что теперь $b = \sqrt{\frac{2x_b}{Ra}}$):

$$\frac{1}{\sqrt{1+a^2}} - \sqrt{2}aK_q - \frac{1}{2}K_q^2 = 0,$$
(3)
где $K_q = \sqrt{\frac{x_b}{R^3 q}}.$

Нетрудно получить для $\gamma = 0$ минимальное значение интенсивности равномерно распределенной нагрузки $q_{\min 1} = \frac{x_b}{2R^3} = 4.78 \cdot 10^{-3} (H/m)$, тогда как при $\gamma \to 90^\circ$ имеем $q_{\max 1} \to \infty$.

Перейдем к рассмотрению схемы, представленной на рисунке 2*в*. При данчом варианте силовой нагрузки изгибающий момент равен $M = T(R \cos \gamma - y)$, а ура ение упругой линии имеет следующий вид:

$$y = c_3 \sin\left\{\sqrt{\frac{T}{x_b}x}\right\} + c_4 \cos\left\{\sqrt{\frac{T}{x_b}x}\right\} + R\cos\gamma.$$

Здесь постоянные интегрирования с учетом начальных условий (при x = 0 имеем y = 0 и $y' = tg\gamma$) имеют следующие значения: $c_3 = \sqrt{\frac{x_b}{T}}$ и $c_4 = -R\cos\gamma$. Тогда искомое уравнение с учетом c_3 и c_4 записывается как

$$y = \sqrt{\frac{x_b}{T}} t g \gamma \sin\left\{\sqrt{\frac{T}{X_b}x}\right\} - R \cos \gamma \left[\cos\left\{\sqrt{\frac{T}{X_b}x}\right\} - 1\right].$$

Зависимость угла γ от силового фактора может быть получена при выполнении своеобразного условия стыковки участка молекулы ДНК с гистоновым октамером, кривизна которого равна R⁻¹, т. е. из выражения $\frac{1}{R} = \frac{M}{x_b}$. Таким образом, после соответствующих преобразований имеем следующее уравнение:

$$\frac{1}{\sqrt{1+a^2}} - K_f = 0.$$
 (4)

Откуда при $\gamma = 0$ можно получить $T_{\min 2} = \frac{x_b}{R^2} = 33.5 \cdot 10^{-12} (H)$, а при $\gamma = 90^\circ$, как и ранее, $T_{\max 2} \to \infty$.

И, наконец, рассмотрим последнюю схему (рис. 2г), для которой изгибающий момент в сечении Y равен $M = \frac{q(R\cos\gamma - y)^2}{2}$. В этом случае при определении уравнения упругой линии приходим к нелинейному дифференциальному уравнению второго порядка:

$$y'' - \frac{1}{x_{\rm b}} y^2 \frac{q}{2} + \frac{1}{x_{\rm b}} y q R \cos \gamma - \frac{1}{x_{\rm b}} \frac{q}{2} R^2 \cos^2 \gamma = 0.$$

Полагая p(y) = y'(x), приходим к уравнению первого порядка с разделяющимися переменными:

$$\int \frac{dt}{\sqrt{t^3 + c}} = \int \frac{dx}{\sqrt{3}R \cdot K_q}$$

где $t = \frac{y}{R} - \cos \gamma$; dy = Rdt; $c = \cos^3 \gamma - \frac{3tg\gamma}{K_q^2}$, решение которого представляется через

эллиптический интеграл $F\left\{ \phi, m \right\}$, т. е.

$$\frac{1}{3^{\frac{1}{4}}\sqrt{t^{3}+c}} \left[2(-1)^{\frac{1}{6}}c^{\frac{1}{3}}\sqrt{(-1)^{\frac{5}{6}}\left(-1+\frac{(-1)^{\frac{1}{3}}t}{c^{\frac{1}{3}}}\right)} \right] \times \left[\sqrt{1+\frac{(-1)^{\frac{1}{3}}}{c^{\frac{1}{3}}}t} + \frac{(-1)^{\frac{2}{3}}}{c^{\frac{2}{3}}}t^{2}}F\left\{ -\frac{\varphi}{2}, m\right\} \right] = \frac{x}{\sqrt{3R}\cdot K_{q}} + c_{5}$$

rge $\varphi = \arcsin\left\{ \frac{\sqrt{-(-1)^{\frac{5}{6}}-\frac{(-1)^{\frac{5}{6}}}{c^{\frac{1}{3}}}t}}{3^{\frac{1}{4}}} \right\}; m = (-1)^{\frac{1}{3}};$
 $F\left\{ -\varphi, m\right\} = \int_{0}^{\varphi} \left(1-m\sin^{2}(\theta) \right)^{-\frac{1}{2}} d\theta.$

Далее получим выражение для c5:

$$c_{5} = \frac{1}{3^{\frac{1}{4}}\sqrt{c - \cos^{3}\gamma}} \left[2(-1)^{\frac{1}{6}} c^{\frac{1}{3}}\sqrt{(-1)^{\frac{5}{6}} \left(1 - \frac{(-1)^{\frac{1}{3}}\cos\gamma}{c^{\frac{1}{3}}}\right)} \right] \times \left[\sqrt{1 - \frac{(-1)^{\frac{1}{3}}\cos\gamma}{c^{\frac{1}{3}}} + \frac{(-1)^{\frac{2}{3}}\cos^{2}\gamma}{c^{\frac{3}{3}}}} F\left[\phi_{1}, m \right] \right]$$

При этом $\phi_{1} = \arcsin \left\{ \frac{\sqrt{-(-1)^{\frac{5}{6}} - \frac{(-1)^{\frac{5}{6}}\cos\gamma}{c^{\frac{1}{3}}}}{3^{\frac{1}{4}}} \right\}.$

Что же касается зависимости $tg\gamma = f(q)$, то ее получим аналогичным образом, как и для схемы 2*6*, используя условие стыковки

$$\frac{1}{\sqrt{1+a^2}} - \sqrt{2}K_q = 0.$$
 (5)

Из уравнения (5) минимальное значение для интенсивности находим при $\gamma = 0$:

 $q_{\min} = \frac{2x_b}{R^3} = 19.1 \cdot 10^{-3} (H/M)$, тогда как при $\gamma \to 90^\circ$ имеем $q_{\max 1} \to \infty$.

С целью проведения заключительного анализа полученных результатов представим решения уравнений (2) – (5), которые определяют зависимость $a = f(K_f)$ или

 $a = f(K_q)$ (при этом учтем, что при переходе $q = \frac{T}{R}$ справедливо равенство $K_q = K_f^2$), в графическом виде на рисунке 3.



Рис. 3. Зависимость угла γ, характеризующего степень прилегания фрагмента ДНК к гистоновому октамеру, от силового фактора для различных схем нагружения: *1*- схема 2*a*, *2*- схема 2*b*, *3*- схема 2*b*, *4*- схема 2*b*

Наиболее оптимальной будем считать ту схему, для которой при меньших значениях упаковывающей нагрузки будет обеспечено наиболее плотное прилегание фрагмента ДНК к гистоновому октамеру.

Такому требованию отвечает кривая 4, которая соответствует схеме упаковки 2г. Как видно из графика, уже при силе ~ $65 \cdot 10^{-12}$ Н участок ДНК отстает от гистонового октамера при $\gamma \approx 70^{\circ}$, что говорит о достаточно хорошем прилегании. Однако природа подобных сил пока не установлена окончательно. Необходимы дополнительные как экспериментальные, так и теоретические работы в этом направлении. Кроме того, представляет интерес расчет сил, возникающих на участке прилегания фрагмента ДНК к гистоновому октамеру.

Таким образом, проблемы организации хроматина в интерфазном ядре весьма сложны и все еще далеки от своего решения. Однако можно надеяться, что представленный материал и его анализ дадут новый импульс для последующих исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Георгиев Г.П., Бакаев В.В. Три уровня структурной организации хромосом эукариот // Молекулярная биология. Т12. Вып. 6.– 1978. – С. 1205–1229.

2. Бакаев В.В. Исследование структурно-функциональных отношений в хроматине эукариот // Биологическая химия. Т.16 – М.:ВИНИТИ, 1982. – С. 128–170.

3. Гросберг А.Ю., Хохлов А.Р. Статистическая физика макромолекул. – М.: Наука, 1989. – С. 344.

4. Газарян К.Г., Тарантул В.З. Геном эукариот: молекулярная организация и экспрессия. –М.: МГУ, 1983. – С. 271.

5. Эренпрейса Е.А. Организация хроматина в ядре интерфазной клетки. – Рига: Зинатне, 1990. – С. 120.

6. Лихошвай Е.В., Киселева Е.В. Укладка ДНК в нуклеотиде прокариот. – Новосибирск: Инст. цитологии и генетики, 1985. – С. 36.

7. Мушкамбаров Н.Н. Аналитическая биохимия. –М.:Экспедитор, 1996.– Т.2. – С. 768.

8. Зенгер В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот – М.: Мир, 1984. – С. 584.

9. Bloomfield V.A. DNA condensation by multivalent cations // Biopolimers. V. 44, 1997.- P. 269-282.

10. Rief et al. Single molecule force spectroscopy of spectrin repeats: low unfolding forces in helix bundles // J. Mol. Biol. V. 286, 1999. – P. 553–561.

11. Baumann G. et al. Stretching of single collapsed DNA molecules // Biophys. J. V. 78. 2000. - P. 1965-1978.

12. Marko J.F. Stretching must twist DNA // Europhys. Lett. V.38, 1997. - P. 183-188.

13. Haijun Zhou, Yang Zhang, Zhong-can Ou-Yang. Elastic property of single doublestranded DNA molecules: Theoretical study and comparison with experiments // Physical Review. V.62. N1. 2000. – P. 1045–1058.

14. Феодосьев В.И. Сопротивление материалов.-М.: Наука, 1986.-С. 512.

15. Немцов В.Б., Камлюк А.Н. Динамические модели молекул ДНК и их частотный спектр.-Минск: БГТУ, 2000. - С. 280-282.