Capitolo 1

Le transizioni strutturali del DNA, gli esperimenti su singola molecola ed i modelli teorici

Il DNA o acido deossiribonucleico è stato individuato come la molecola contenente il materiale ereditario alla fine degli anni '40, inizio degli anni '50, grazie ad esperimenti con batteri e fagi (cioè virus che infettano i batteri). Gli studi biochimici compiuti da E. Chargaff hanno stabilito che la quantità di adenina è sempre pari a quella di timina e la quantità di guanina è sempre pari a quella di citosina indipendentemente dalla composizione totale di basi del DNA. Nel 1953 J. Watson e F. Crick hanno messo insieme questa osservazione e gli studi di diffrazione a raggi X di R. Franklin e M. Wilkins [Fra 53] per dedurre la struttura a doppia elica del DNA (mostrata in figura 1.1) e sottolineare come l'accoppiamento specifico delle basi del DNA suggerisce un meccanismo di copia del materiale genetico [Wat 53].

1.1 Struttura del DNA

La struttura primaria

La molecola di DNA consiste in una doppia sequenza di nucleotidi legati chimicamente tra loro. Ciascun nucleotide è composto da una base azotata, uno zucchero ed un fosfato (vedi figura 1.2). Come mostrato in figura 1.1 i gruppi zucchero-fosfato formano lo scheletro molecolare mostrato in figura 1.3 che supporta le basi fissate su di esso. In condizioni fisiologiche i fosfati sono carichi negativamente, inoltre come mostrato in figura 1.3 la posizione 5' o 3' dei fosfati sullo zucchero dà un orientamento al filamento di DNA. Le basi, mostrate in figura 1.4 sono quattro: l'Adenina (A), la Timina (T) (essa nel RNA è rimpiazzata dall'Uracile U), la Citosina (C) e la Guanina (G) esse si appaiano per mezzo di legami idrogeno in maniera selettiva nella formazione della doppia elica: l'Adenina si lega alla Timina attraverso due legami idrogeno, mentre la Guanina si lega alla Citosina con tre legami idrogeno. È l'alternanza delle basi o sequenza che forma il codice genetico:

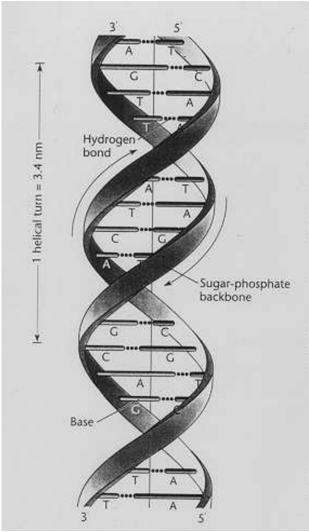

Figura 1.1: La doppia elica di Watson e Crick. Da [Sny96].

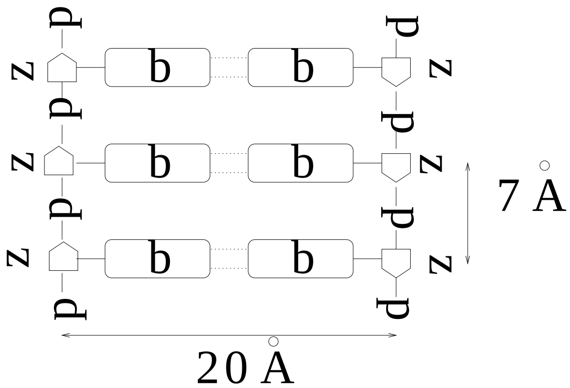

Figura 1.2: Rappresentazione schematica della molecola di DNA srotolata. Essa è formata da una sequenza di nucleotidi, costituiti da uno zucchero (z) un fosfato (p) ed una base (b), che è legata per mezzo dei legami idrogeno ad una sequenza complementare. Il diametro del BNA B è di 20 Å, mentre la distanza tra due fosfati lungo lo scheletro è di 7 Å. Da [Cal 97].

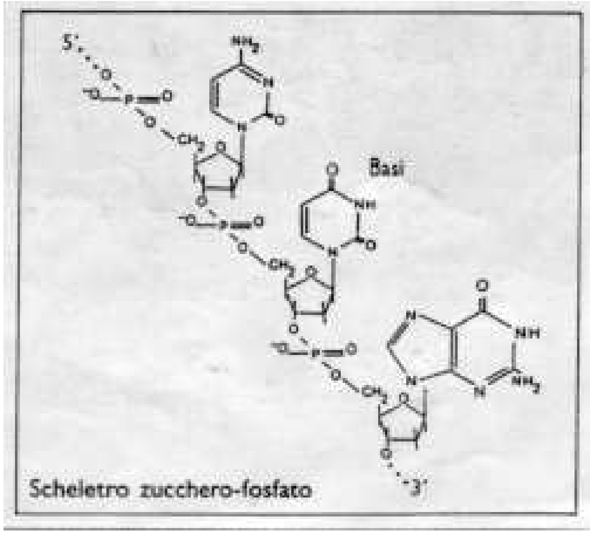

Figura 1.3: Rappresentazione chimica dello scheletro del DNA. La posizione 5' o 3' dei fosfati sullo zucchero dà un orientamento ad un singolo filamento di DNA. Da [Dim98].

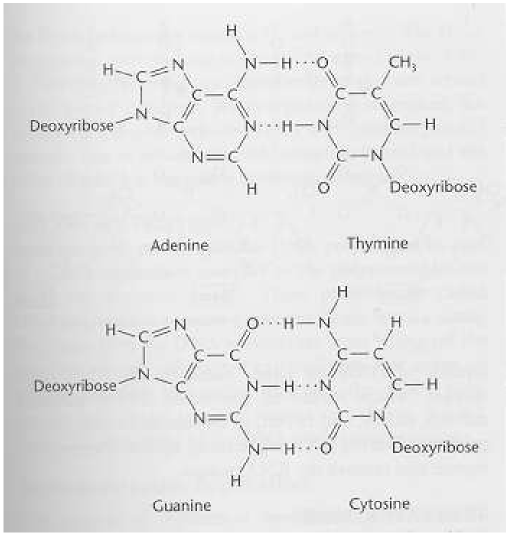

Figura 1.4: Rappresentazione chimica delle coppie di basi del DNA. I legami idrogeno stabiliscono i due possibili accoppiamenti A-T, G-C. Da [Sny96].

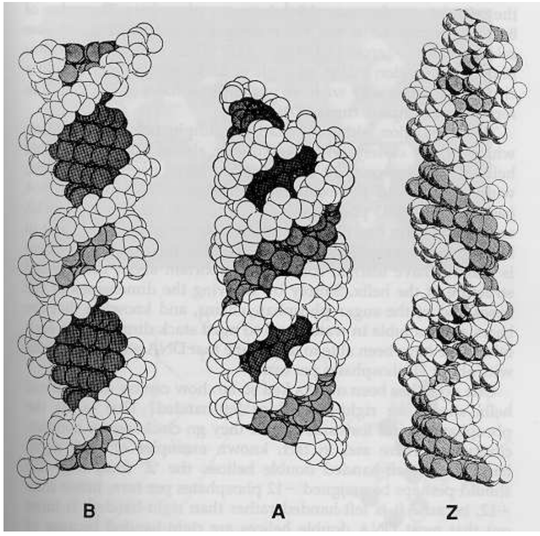

Figura 1.5: La struttura del DNA B, che si trova in condizioni fisiologiche, confrontata con quella del DNA A e del DNAZ. Da [Cal97].

durante la trascrizione questo viene letto da una RNA polimerasi e trascritto su un RNA messaggero dal quale vengono sintetizzate le proteine.

La Struttura secondaria

La molecola di DNA consiste in due filamenti, orientati in senso opposto, avvolti l'uno nell'altro nella formazione di una doppia elica. La struttura individuata da Watson e Crick o DNA B, che si trova in condizioni fisiologiche, è una doppia elica destrogira caratterizzata da una distanza fosfato-fosfato lungo lo scheletro di 7 Å, un diametro di 20 Å, 10.4 coppie di basi per giro ed una distanza assiale tra una coppia di basi e la successiva di 3.4 Å.

Cambiando le condizioni di salinità e di idratazione si possono avere altre strutture come quelle mostrate in figura 1.5 come il DNA A che è un'elica destrogira caratterizzata da una distanza fosfato-fosfato lungo lo scheletro di 5.9 Å, con 11 coppie di basi per giro, o la struttura DNA Z, levogira, con lo scheletro disposto a zig-zag e con 12 coppie di basi per giro.

La struttura terziaria

Nella cellula Il DNA è avvolto intorno a delle proteine (istoni) ed assume dunque una struttura terziaria a solenoide. Una molecola di DNA libera in soluzione quando viene superavvolta si può ripiegare su se stessa formando delle strutture terziarie chiamate plectonemi. I plectonemi ed i solenoidi verranno descritti più avanti.

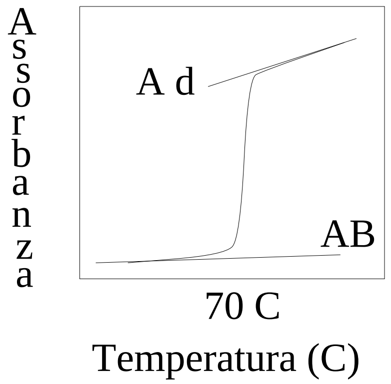

Figura 1.6: Profilo tipico dell'assorbanza U.V. in funzione della temperatura. In seguito alla denaturazione del DNA l'assorbanza A d cresce del 30 *o* 40%, rispetto all'assorbanza A B prima della transizione. L'assorbimento di radiazione ultravioletta fornisce la percentuale di basi aperte. Da [War85].

1.2 La denaturazione termica della molecola ed alcuni modelli che la descrivono

In questa sezione introduciamo alcuni modelli utilizzati per indagare la denaturazione termica del DNA. Riscaldando una soluzione contenente DNA si può osservare sperimentalmente la separazione che avviene ad alte temperature dei due filamenti. L'apertura delle coppie di basi è infatti accompagnata da un aumento dell'assorbimento di radiazione UV [Sae 84]. Lo spettro UV è quindi un buon indicatore della formazione e della rottura della doppia elica. Descriviamo innanzi tutto la denaturazione di molecole omogenee sintetizzate in modo da essere costituite dalla ripetizione di una piccola sequenza, tipicamente di una o due coppie di basi, (es. poli (AT),poli (AT-CG). Se la temperatura di una soluzione di questo DNA viene aumentata lentamente, ad una certa temperatura l'assorbimento UV cresce improvvisamente perchè la struttura ordinata a doppia elica si dissocia in modo altamente cooperativo, come mostrato in figura 1.6. Il punto di mezzo della transizione è chiamato la temperatura di denaturazione T_m. Con l'aumentare della lunghezza della catena la pendenza al punto di inflezione (T_m) diventa più ripida, segno di una rafforzata cooperatività.

La denaturazione di sequenze eterogenee, come il DNA naturale, composte da regioni ricche in AT e regioni ricche in GC è un processo multifasico che porta ad uno spettro UV a gradini; infatti le regioni ricche in AT denaturano prima poiché tale coppia di basi è più debole di quella GC (due legami idrogeno anzichè tre) come mostrato in figura 1.7. La derivata dell'assorbanza rispetto alla temperatura permette di individuare in questo caso le differenti regioni.

Il fenomeno della denaturazione termica verrà ripreso più dettagliatamente nel capitolo 3. Nei paragrafi che seguono descriveremo alcuni approcci teorici alla denaturazione del DNA come quelli basati sull'applicazione del modello di Ising e quelli basati sul modello

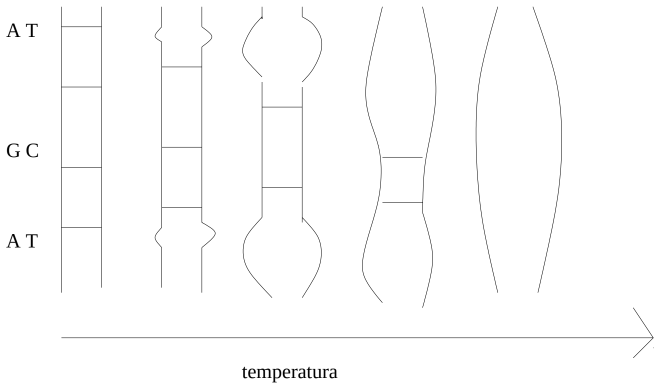

Figura 1.7: Schema che descrive i processi coinvolti nella denaturazione del DNA : le regioni ricche di A-T si aprono prima dando luogo agli stati intermedi. Da [Sae84].

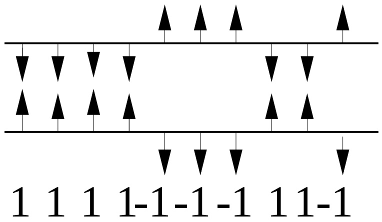

Figura 1.8: Modello di Ising per il DNA: le coppie di basi possono essere nello stato legato dal legame idrogeno ($s_n = 1$) o non legato ($s_n = -1$). Da [Dau93d].

sviluppato da Peyrard e Bishop. Quest'ultimo in particolare costituisce la base del modello introdotto in questo lavoro di tesi.

Modello di Ising per la transizione di denaturazione

L'idea dell'applicazione del modello di Ising (vedi appendice B.1) per studiare la transizione di denaturazione, negli acidi nucleici come nelle proteine, è nata nel 1959 [Hil 59] [Zim 59]. Come illustrato nell'articolo di rivista [War 85], una coppia di basi, indicata con l'indice n può assumere in questi modelli due stati: lo stato legato dai legami idrogeno (al quale si associa il valore $s_n = 1$), o lo stato aperto (al quale si associa il valore $s_n = -1$), vedi figura 1.8. Diversi parametri che si possono ricavare in modo fenomenologico entrano nella scrittura dell' energia libera del sistema:

- la stabilità di una singola coppia di basi, questa può prendere due valori perchè ci sono due coppie di basi possibili (A-T,G-C). Essa si scrive nel modello di Ising con un campo aleatorio, perchè dipendente dalla sequenza, su ciascun sito.

- La stabilità verticale di una doppia coppia di basi, ottenuta considerando le interazioni di impilamento e gli effetti idrofobici; questa può prendere 10 valori

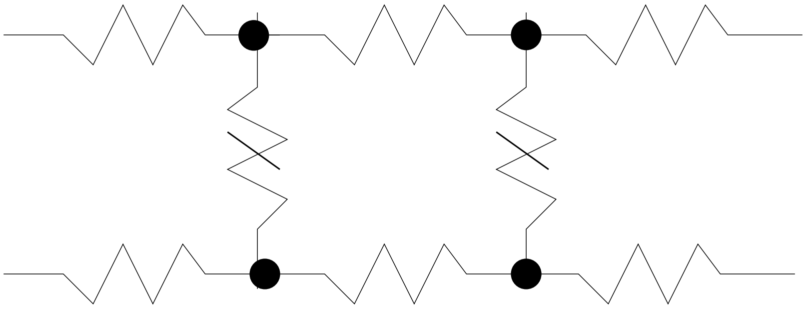

Figura 1.9: Rappresentazione schematica del modello PB : ogni base è rappresentata da una massa puntiforme. Le masse sono connesse da molle lungo un filamento e sono collegate nella coppia dal potenziale di Morse che rappresenta il legame idrogeno, esso è indicato con una barra trasversale. Da [Pro95].

differenti (AA,AC,AT,AG,CC,CG,CT,GG,GT,TT); nel modello di Ising il termine corrispondente si scrive con un accoppiamento tra gli spin vicini lungo la catena.

- L'entropia configurazionale supplementare che hanno due filamenti dissociati rispetto al doppio filamento del DNA B. È un contributo che dipende dalla taglia della bolla di denaturazione (cioè il numero di basi), dalla sequenza e che è stimato in modo approssimato.
- L'equilibrio di dissociazione che risulta dalla separazione spaziale (o viceversa dall'unione) dei due filamenti non appaiati da legami idrogeno . Quest'ultimo risulta un fattore importante soprattutto per sequenza corte.

Attraverso questi modelli si riproducono correttamente le curve di denaturazione per DNA di sequenza generica, bisogna però ricordare la presenza di un gran numero di parametri aggiustati fenomenologicamente.

Il modello di Peyrard-Bishop

Il modello introdotto da M. Peyrard e A. Bishop [Pey 89], vedi figura 1.9 si differenzia dai modelli di Ising essenzialmente per la presenza di variabili di stato continue: per ciascuna coppia di basi n si definisce come variabile continua r_n l'apertura di essa rispetto alla posizionedi riposonel minimo dell'energia potenziale del legame idrogeno. L'energia potenziale del sistema, nella seconda versione del modello introdotta da T. Dauxois e M. Peyrard [Dau 95], si scrive:

$$E = \sum_n \left[D \left(e^{-a\, y_n} - 1 \right)^2 + \frac{K}{2} \left(1 + \rho\, e^{-b(y_n + y_{n+1})} \right) \, (y_n - y_{n-1})^2 \right] \tag{1.1}$$

Su ciascuna coppia di basi il primo termine è un potenziale a corta portata che rappresenta il legame idrogeno, l'andamento di questo potenziale, detto potenziale di Morse, è mostrato in figura 2.2; il secondo termine invece rappresenta l'energia di interazione tra una coppia di basi e quelle adiacenti, esso contiene l'energia di impilamento, cioè la presenza di interazioni elettrostatiche tra le coppie di basi nella configurazione impacchettata del DNAB, e la presenza di uno scheletro rigido, per cui anche per coppie di basi non a diretto contatto, come in un singolo filamento, la posizione di una coppia di basi è legata a quella della sua vicina. Il prefattore del termine quadratico nel potenziale di impilamento decresce, di conseguenza, dal valore $K/2\ (1+\rho)$ per coppie di basi chiuse (DNA B) al valore $K/2$ per coppie di basi aperte (DNA denaturato). Tramite questo modello, fissando opportunamente i valori dei parametri, si riproduce la brusca transizione di denaturazione di una sequenza ripetuta [Dau 95]. Come risulta dal lavoro di D. Cule e T. Hwa [Cul 97] fissando parametri differenti per il potenziale di Morse delle coppie di basi AT o GC si riproduce anche il comportamento a gradini nella curva di denaturazione di una sequenza eterogenea. Y.Zhang *et al* in [Zha 97] e A. Campa e A. Giansanti in [Cam 98] hanno inoltre esteso la teoria della denaturazione basata sul modello di Peyrard Bishop al caso di catene corte, introducendo l'equilibrio di dissociazione tra il DNA a doppia elica ed il DNA a singola elica.

1.3 Esperimenti di singola molecola

Il lavoro che verrà illustrato in questa tesi si ricollega anche ad un nuovo campo, sviluppatosi negli ultimi sette anni nello studio dei sistemi biologici: la biofisica su singole molecole. Una serie di nuove tecniche e metodi (pinze ottiche e magnetiche, microscopia a forza atomica, spettroscopia di correlazione di fluorescenza ecc.) sono stati sviluppati in questo campo per la visualizzazione e lo studio di singole biomolecole, aprendo un nuovo campo di investigazione dei processi biologici al loro livello più fondamentale. Una raccolta dei lavori portati avanti in questo campo si trova in [Emb 99], come esempi rappresentativi citiamo la caratterizzazione di singoli motori molecolari, in particolare la miosina che si muove sull' actina o la chinesina che si muove sui microtuboli [Spu 94, Sch 97, Fun 95]; l'osservazione e lo studio della rotazione del sistema che sintetizza l'ATP a partire dall'ADP +P, l' F1-ATPase [Noj 97]. Come esempi sul DNA ricordiamo gli studi sull'apertura meccanica a cerniera della doppia elica [Boc 97], [Ess 97][Boc 98], l'osservazione diretta della forza prodotta da una singola RNA polimerasi quando si muove su una molecola di DNA [Yin 95] e gli esperimenti legati all'elasticità di una singola molecola di DNA che qui di seguito descriviamo in dettaglio.

1.4 L'elasticità di una singola molecola di DNA

A partire dal lavoro di Bustamante e collaboratori del 1992 [Smi 92] diversi gruppi di ricercatori hanno potuto misurare l'elasticità di una singola molecola di DNA. Ci riferiamo, in particolar modo, ai lavori del gruppo di C. Bustamante [Smi 92, Smi 96], al lavoro di

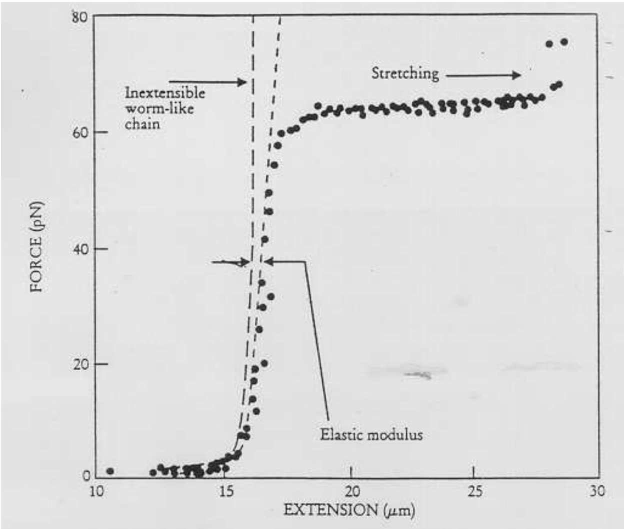

Figura 1.10: Andamento della curva forza estensione per un DNA di λ-fago di lunghezza naturale di $16.4\mu m$ in 150 mM NaCl, 10mM EDTA, pH 8.0. Per $F < 10\,pN$ la soluzione della WLC data in [Bus 94] con la lunghezza di persistenza $A = 53nm$ riproduce l'andamento sperimentale, per forze $10\,pN < F < 65\,pN$ entra in gioco il modulo di tensione del DNA B; Il plateau a $F = 65\,pN$ indica la transizione altamente coperativa alla forma DNA S. Dalla referenza [Smi96].

P. Cluzel *et. al* [Clu 96], ai lavori del gruppo di D. Bensimon e V. Croquette [Str 96] e a quello del gruppo di D. Chatenay [Leg 99a].

Il principio degli esperimenti consiste nell'attaccare le due estremità del DNA in soluzione su oggetti che si manipolano in modo da poter esercitare una tensione sulla molecola e misurare l' allungamento prodotto in funzione della forza di tensione. Inoltre a partire dal lavoro del gruppo di D. Bensimon e V. Croquette [Str 96] del 1996 sono stati realizzati degli esperimenti [Str 96, Leg 99a] in cui la molecola del DNA viene sottoposta a tensione e torsione contemporaneamente. Si misura quindi l'allungamento in funzione della tensione e del superavvolgimento. Gli oggetti al quale il DNA viene chimicamente attaccato sono da una estremità una superficie di vetro, dall'altra una biglia magnetica in [Smi 92, Str 96]), due biglie latex una delle quali attaccata ad una micropipetta, l'altra controllata da una trappola ottica [Smi 96] , oppure rispettivamente una biglia latex attaccata ad una micropipetta ed una fibra ottica [Clu 96, Leg 99a]. Gli strumenti per misurare la forza sono trappole ottiche costruite con laser in [Smi 96] o con fibre ottiche in [Clu 96, Leg 99a]), oppure la regisrazione del movimento browniano della biglia magnetica in [Str 96], (quest'ultimo caso è spiegato in dettaglio nel paragrafo 3.2.1 ed illustrato in figura 3.2).

Il regime delle forze misurate è tipicamente quello dei piconewton: l'energia tipica è l'energia termica $1k_bT$ e la lunghezza tipica è quella del nanometro, da cui una forza tipica di $1K_bT/1nm = 4\,pn$ [All 97] (vedi appendice A), ma le tecniche sperimentali permettono una estensione molto ampia del regime di forza applicabile: dai 0.01 $< F < 200\,pN$. Nei prossimi paragrafi descriveremo i risultati che si ottengono da questi esperimenti e come essi hanno beneficiato di modelli teorici ai quali hanno contribuito i lavori di J. F. Marko e E. D. Siggia [Bus 94, Mar 94], di C. Bouchiat e M. Mézard [Bou 98] e le simulazioni di A. Leburn e R. Lavery [Clu 96, All 98]. Un articolo di rivista sui primi lavori sperimentali e teorici sull' elasticità di una singola molecola è dato nella referenza [Aus 97].

1.4.1 La curva forza estensione

Quattro regimi di elasticità caratterizzano la curva forza estensione di figura 1.10 ottenuta su una molecola di λ fago con una lunghezza naturale di $L_0 \simeq 17\mu m$ (che corrisponde a 50000 coppie di basi) in 150 mM NaCl, 10mM EDTA, pH 8.0:

- Il regime di bassa forza $0.01 < F < 10\,pN$ e di estensioni $z < 16.1\,\mu m$ ovvero $z/L_0 < 0.98$ è caratterizzato dalla elasticità entropica; in questo regime la forza di tensione rimuove il ripiegamento termico del DNA dalla configurazione a random coil (ovvero a matassa disordinata). Il primo modello elaborato per descrivere questo regime di forza è stato la Freely Jointed Chain che però descrive correttamente i risultati sperimentali fino a forze $F \simeq 0.1\,pN$ [Smi 92]. Il modello della Worm Like Chain risolto da Marko e Siggia [Bus 94, Mar 94] permette al contrario di riprodurre perfettamente il comportamento elastico del DNA in tutto il regime di forza $F < 10\,pN$, tanto che la curva teorica è ora comunemente usata per tarare l'apparato sperimentale ad ogni nuovo esperimento. Secondo questo modello, il DNA viene

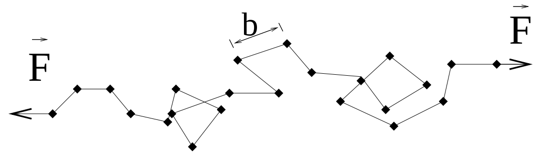

Figura 1.11: Rappresentazione del modello FJC; la catena è costituita da N maglie indipendenti di lunghezza b. Da [All97].

caratterizzato nel regime entropico dalla lunghezza di persistenza $A = 50\,nm$ che rappresenta la distanza sulla quale l'asse della molecola appare dritto.

- Per $10\,pN < F < 65\,pN$, $z < 17.2\,\mu m$ ovvero $z/L_0 < 1.05$, la lunghezza della molecola è vicina a quella cristallografica, dunque non ci sono più contributi entropici all'elasticità , ma si inizia ad esercitare una tensione sulla struttura stessa del DNA: la costante che caratterizza l' elasticità della molecola è il suo modulo di Young.
- A $F = 65\,pN$, intorno ad $z/L_0 = 1.05$, si osserva un 'plateau' della forza poiché il DNA si allunga improvvisamente ad una lunghezza $z = 28\mu m$ ovvero $z/L_0 = 1.7$.
- Per $F > 65pN$ ed oltre l'estensione $z/L_0 = 1.7$ la forza cresce di nuovo velocemente con l'estensione.

Il plateau a $F = 65\,pN$ è stato interpretato come una una transizione strutturale, altamente cooperativa, ad una nuova forma che è stata chiamata DNA S. La transizione è reversibile come si prova tornando indietro sperimentalmente sulla curva forza estensione. Incredibilmente questa transizione strutturale ad una forma di lunghezza di circa il doppio era stata già prevista nel 1951 da M. Wilkins e collaboratori [Wil 51], ancora prima cioè che la struttura del DNA fosse stabilita. Nell'esperimento essi tiravano un agglomerato di fibre di DNA e ne osservavano un' estensione reversibile di circa il doppio, una riduzione del diametro molecolare del 20% ed un cambiamento dell'assorbimento di radiazione ultravioletta ed infrarossa ([Fra 51]) polarizzata (spettroscopia di dicroismo circolare) che associavano ad un cambiamento dell'architettura molecolare caratterizzato da un' inclinazione delle coppie basi.

L'osservazione di questa nuova forma di DNA: il DNA S è biologicamente rilevante perchè è stato suggerito [Clu 96, Mar 98] che essa potrebbe essere simile alla conformazione del DNA legato alla proteina che compie la ricombinazione generale nei procarioti: Rec A. Nel complesso con Rec A infatti il duplex di DNA viene esteso di un fattore 1.5 ed il complesso appare al microscopio elettronico come un filamento elicoidale con un passo di ~ 100 Å e con 18.6 coppie di basi per giro [Sta 82].

Modello della Freely Jointed Chain

Il modello della Freely Jointed Chain [Smi 92, Aus 97, All 97], illustrato in figura 1.11, descrive il DNA come una catena costituita da N maglie rigide di lunghezza b le cui

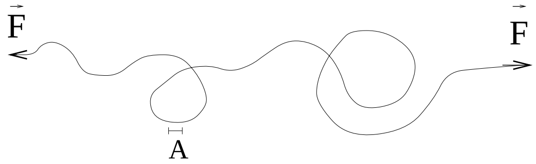

Figura 1.12: Rappresentazione del modello WLC; la catena continua è caratterizzata dalla lunghezza di persistenza A, cioè la lunghezza sulla quale la direzionalità è mantenuta. Da [All97].

direzioni nello spazio sono scorrelate in assenza di forza esterna. Quando si sottopone questa catena, di lunghezza totale $L = N\,b$, ad una forza di tensione qust'ultima tende ad orientarla. L' energia associata a ciascuna maglia si scrive $E_i = -F\,b\cos\theta_i$ dove θ_i è l'angolo tra la direzione della maglia e quella della forza. Questo problema è analogo all'orientamento dei momenti dipolari in un campo magnetico uniforme. La funzione di partizione del sistema è di conseguenza:

$$Z = \int_0^\pi \prod_{i=1}^{N} 2\pi\ \sin\theta_i d\theta_i \prod_i e^{\beta F b\ \cos\theta_i} = \frac{4\pi\,k_B T}{F\,b} \sin\left(\frac{F\,b}{k_B T}\right) \tag{1.2}$$

mentre il valor medio dell'estensione è dato da

$$< z > /L_0 =< \cos\theta >= \mathcal{L}\left(\frac{F\,b}{k_B\,T}\right) = \coth\left(\frac{F\,b}{k_B\,T}\right) - \frac{k_B\,T}{F\,b} \tag{1.3}$$

dove $\mathcal{L}$ è la funzione di Langevin che caratterizza il paramagnetismo. Il comportamento a bassa forza di questa espressione è dato da

$$\frac{< z >}{L_0} \sim \frac{1}{3}\frac{F\,b}{k_B\,T}. \tag{1.4}$$

L'estensione è lineare nella forza, quindi il DNA si comporta come una molla con lunghezza di riposo nulla con la costante di forza dipendente dalla temperatura. Per estendere il DNA ad una frazione rilevante della sua lunghezza di contorno è necessaria una forza $F_s \approx \frac{k_B\,T}{b} \simeq 0.1\,pN$. Ad alta forza

$$1 - \frac{< z >}{L_0} \sim \frac{k_B\,T}{F\,b} \tag{1.5}$$

ha una divergenza in $1/F$. Mentre il modello FJC descrive bene la curva sperimentele per $F < F_s$ la divergenza a grandi forze risulta troppo rapida.

Modello della Worm Like Chain (WLC)

Il modello della Worm Like Chain (vedi figura 1.12) rappresenta la molecola di DNA nel continuo ed introduce una energia di curvatura per la catena che, aggiunta ad un

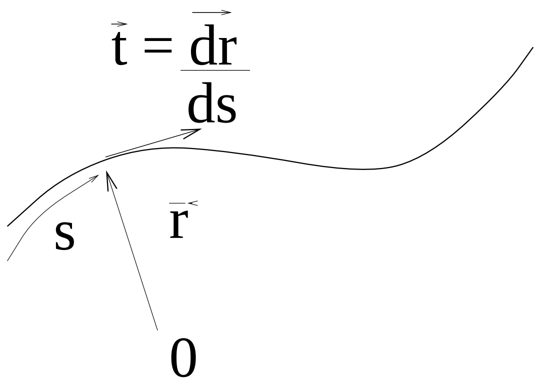

Figura 1.13: Nel modello WLC la posizione di un punto di ascissa s è data dal vettore $\vec{r}$, $\hat{t}$ è il vettore unitario tangente nel punto. Da [Leg99b].

termine dovuto alla forza esterna analogo a quello introdotto nella FJC, porta alla seguente espressione per l'energia:

$$\frac{E}{k_B T} = \frac{A}{2}\int_0^{L_0} ds \left(\frac{\partial \hat{t}}{\partial s}\right)^2 - F\int_0^{L_0} \left(\hat{z}.\hat{t}(s)\right) ds \tag{1.6}$$

dove $\hat{t}(s)$ è il vettore unitario tangente alla catena sulla ascissa curvilinea s vedi disegno 1.13, mentre $\hat{z}$ è la direzione della forza. L'inestensibilità della catena è data dal fatto che il vettore tangente ha modulo unitario. La funzione di partizione $Z(\hat{t}_0, s_0 = 0, \hat{t}_1, s_1 = L_0)$ si scrive attraverso l'integrale di cammino:

$$Z(\hat{t}_0, s_0 = 0, \hat{t}_1, s_1 = L_0) = \int D\hat{t}\; e^{-\frac{A}{2}\int_0^{L_0}\left(\frac{\partial \hat{t}}{\partial s}\right)^2 ds + F\int_0^{L_0}\left(\hat{z}.\hat{t}(s)\right) ds} \tag{1.7}$$

Questa formula rappresenta la somma su tutte le configurazioni di $\hat{t}(s)$ possibili di cui le condizioni ai bordi sono $\hat{t}_0$ ed $\hat{t}_1$, tali configurazioni sono indicate con la misura di integrazione $D\hat{t}$. Per capire la definizione della lunghezza di persistenza della molecola mettiamo la forza a zero nella (1.7) e consideriamo il semplice caso di uno spazio bidimensionale; Il vettore unitario $\hat{t}$ si scrive, in coordinate polari:

$$\hat{t} = \begin{pmatrix} \cos\theta(s) \\ \sin\theta(s) \end{pmatrix} \tag{1.8}$$

da cui si ricava

$$\left(\frac{\partial \hat{t}}{\partial s}\right)^2 = \left(\frac{\partial \theta}{\partial s}\right)^2. \tag{1.9}$$

Dunque si può scrivere la seguente equazione di Langevin [Par 88] per l'evoluzione di θ lungo la catena:

$$\frac{\partial \theta}{\partial s} = \eta(s) \tag{1.10}$$

dove $\eta(s)$ ha le caratteristiche di un rumore termico infatti

$$< \eta(s)\eta(s') >= \delta(s-s')\,\frac{1}{A}. \tag{1.11}$$

Allora

$$\theta(s) = \theta(0) + \int_0^s \eta(s)\,ds \tag{1.12}$$

sarà significativamente diverso da $\theta(0)$ su una distanza pari ad A, da qui la definizione di lunghezza di persistenza della molecola, in tre dimensioni il ragionamento è analogo. Il calcolo della funzione di partizione e delle proprietà di equilibrio del sistema, come il valore medio della distanza tra un estremo e l'altro della catena, si risolvono tramite la conoscenza dell'energia dello stato fondamentale e della funzione d'onda corrispondente dell' equazione di Schrödinger

$$\frac{\partial\psi(\theta)}{\partial s} = \left[\frac{\mathbf{L}^2}{2A} + F\,\cos\theta\right]\psi(\theta) \tag{1.13}$$

dove θ è l'angolo tra $\hat{z}$ e $\hat{t}$ ed $\mathbf{L} = \hat{t} \times \nabla_{\hat{t}}$ è l'operatore di momento angolare. La stessa equazione si scrive per gli autostati di un dipolo con momento di inerzia A sottoposto ad un campo elettrico F. J. Marko e E. Siggia sono stati i primi ad ottenere numericamente la curva di forza estensione per il WLC [Mar 95a]. Essi hanno inoltre dato una formula analitica approssimata dei valori ottenuti [Bus 94] :

$$F = \frac{k_B T}{A}\left[\frac{1}{4\,(1-z/L_0)^2} - \frac{1}{4} + \frac{z}{L_0}\right] \tag{1.14}$$

Da questa formula si ritrova il limite a basse forza del modello FJC, mentre per alte forze la divergenza è in $1/\sqrt{F}$. Tale formula approssimata è stata poi migliorata da C. Bouchiat *et al* in [Bou 99a] aggiungendovi un opportuno polinomio di grado 7 che fornisce i termini di correzione in modo che la differenza con la curva ottenuta numericamente sia inferiore a 10^{-4}. Quest'ultima formula viene utilizzata per calibrare i dati sperimentali.

La transizione alla forma S

La piattezza della curva intorno ad $F = 65pN$ ricorda una transizione di fase in materia condensata. Per interpretare questo plateau è stato proposto infatti da P. Cluzel [Clu 96, Leg 99b] un modello di Ising analogo a quello proposto per la transizione di denaturazione. In tale modello la molecola è divisa in N piccole cellule, ad esempio le coppie di basi, che possono esistere in due stati. Lo stato DNA B e lo stato DNA S ai quali è associata rispettivamente una lunghezza L_B, L_S ed un' energia E_B, E_S. Per ciascuna cellula si definisce una variabile di spin $\sigma_i = \pm 1$ se essa si trova nello stato DNA B o rispettivamente nello stato DNA S. L'Hamiltoniana della catena si scrive dunque:

$$H = \sum_{i=1}^{N}(E_i - F\,L_i) + \frac{\omega}{2}\sum_{i=1}^{N-1}(1 - \sigma_i\,\sigma_{i+1}) \tag{1.15}$$

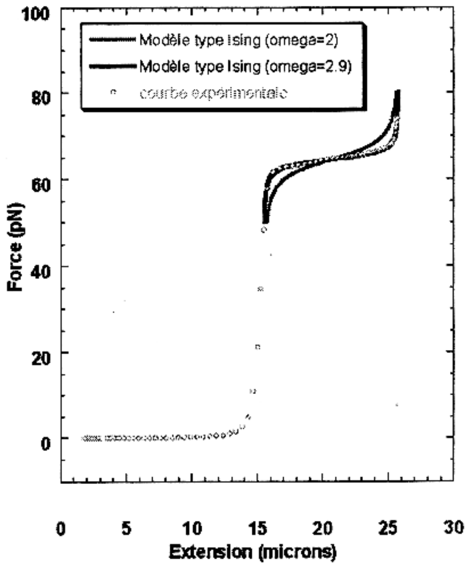

Figura 1.14: Curva di forza estensione per la regione attorno al plateau ottenuta dal modello di Ising. Le due linee corrispondono all'andamento teorico con $\omega = 2$ e $\omega = 2.9$, i punti corrispondono all'andamento sperimentale. Da [Leg99b].

dove ω rappresenta l'accoppiamento tra gli stati B ed S cioè il costo energetico di una frontiera DNA B-DNA S. Tenendo conto che $N = n_S + n_B$ ed $\sum_i \sigma_i = n_S - n_B$ l' Hamiltoniana H si riscrive nel modo seguente:

$$H = -\frac{1}{2}(\Delta E - F\Delta L)\sum_{i=1}^{N}\sigma_i - \frac{\omega}{2}\sum_{i=1}^{N-1}(\sigma_i\sigma_{i+1} - 1) \tag{1.16}$$

dove $\Delta E = E_S - E_B$ e $\Delta L = L_S - L_B$. Il termine $h = \Delta E - F\Delta L$ gioca il ruolo del campo magnetico esterno nel modello di Ising classico. L'energia libera f si calcola come in (B.1) aggiungendo all'Hamiltoniana il campo magnetico h. A partire da essa si ottiene la curva forza estensione

$$< \Delta L(F) >= \frac{N}{2}\Delta L\frac{\partial f}{\partial h} \tag{1.17}$$

che, come mostrato in figura 1.14, è in grado di riprodurre bene la curva sperimentale per $60\,pN < F < 70\,pN$ [Leg 99b] per un valore del coefficiente $\omega \simeq 2.9 k_B T$ su un esperimento fatto a 100 mM PB, 500 mM NaCl, Ph=7.4 a $T = 17^o C$.

WLC estendibile

J. Marko ha ampliato il modello WLC per descrivere con esso anche il regime di grandi forze. Nel nuovo modello la struttura interna della catena si può allungare e c'e' un minimo

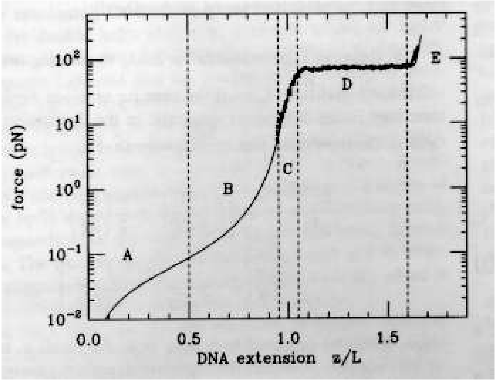

Figura 1.15: La curva forza estensione ottenuta con la WLC estensibile, paragonata all'andamento, rappresentato con i punti, ottenuto sperimentalmente in [Clu96]. Da [Mar98].

relativo dell'energia interna della molecola per un allungamento 1.7 volte maggiore di quello del DNA B [Mar 98]. L'energia della WLC estensibile è data dalla seguente espressione:

$$\frac{E}{k_B T} = \int_0^{L_0} d\xi \left\{ \frac{A}{2} \left(\frac{1}{u+1} \frac{d\hat{t}}{d\xi} \right)^2 + \frac{C_0}{2}\Omega^2 + \frac{\gamma_0}{2} u^2 + g\, u\, \Omega + \frac{w}{2} \left(\frac{du}{d\xi} \right)^2 + V(u) - F(u+1)\, \hat{t}.\hat{z} \right\} \tag{1.18}$$

per introdurre la possibilità di allungamento si definisce la coordinata interna $0 < \xi < L_0$, che differisce dall'ascissa curvilinea $0 < s < L$ per una molecola allungata di distanza cristallografica L; l'allungamento assiale relativo u è definito per un elemento $d\xi$ della catena dalla relazione:

$$u = \frac{ds}{d\xi} - 1 \tag{1.19}$$

da cui si ottiene $\frac{\partial t}{\partial s} = \frac{\partial t}{\partial \xi} \frac{1}{u+1}$, ed il termine $F\, ds\, \hat{t}.\hat{z}$ di (1.6) diventa $F\, d\xi (u+1) \hat{t}.\hat{z}$. Il terzo termine in (1.18), elastico nell' allungamento u, introduce il modulo di Young γ_0 della catena. Tramite il sesto termine si introduce il potenziale $V(u)$ per descrivere l'esistenza di una forma stabile di DNA allungata; la forma più semplice proposta da J. Marko è $V(u) = -q\frac{u^3}{3} + Y(u - \alpha)$ dove la funzione $Y(u - \alpha)$ è nulla per $u < \alpha$ ed infinita per $u > \alpha$, questo permette di imporre che la molecola non si tiri oltre un certo limite fissato dai legami chimici interni. Il quinto termine rende la cooperatività del cambiamento di struttura DNAB-DNAS ed è analogo al termine in ω introdotto nel modello di Ising (1.15). Infine è introdotta una elasticità di twist nel secondo termine, Ω rappresenta la deviazione dell'angolo di twist del DNAB che in condizioni fisiologiche è pari a $2\pi/10.4$; il quarto termine rappresenta l' accoppiamento allungamento-srotolamento. Per descrivere un DNA senza vincoli esterni sulla torsione basta sommare sulle fluttuazioni in Ω e l'energia effettiva restante si scrive:

$$\frac{E}{k_B T} = \int_0^{L_0} d\xi \left\{ \frac{A}{2} \left(\frac{1}{u+1} \frac{d\hat{t}}{d\xi} \right)^2 + \frac{\gamma}{2} u^2 + \frac{w}{2} \left(\frac{du}{d\xi} \right)^2 + V(u) - F(u+1)\, \hat{t}.\hat{z} \right\}. \quad (1.20)$$

Per ottenere la relazione forza-estensione a partire da questa espressione dell'energia si procede come per l'inestensibile WLC: ottenendo un' equazione di Schrödinger effettiva e risolvendola numericamente o con un metodo variazionale. Anche se c'è un numero piuttosto importante di parametri aggiustabili $(A, \gamma, q, w, \alpha)$ questo aggiustamento è sensato perchè ciascun parametro agisce quasi esclusivamente su una regione precisa della curva, vedi figura 1.15. La lunghezza di persistenza $A = 55\, nm$ corrisponde al regime entropico (regione B nella figura), il modulo di Young ($\gamma = 300\, nm^{-1}$) fissa la pendenza della curva giusto prima dell'inizio del plateau (regione C nella figura), il parametro w influenza la pendenza della curva al livello del plateau (regione D nella figura) rendendo la transizione più o meno cooperativa ($w = 10 nm$), infine variare il parametro $q = 560 nm^{-1}$ del potenziale non lineare equivale a cambiare l'altezza del plateau e cambiare il parametro $\alpha = 0.83$ comporta uno spostamento della fine del plateau.

Dipendenza dalla composizione, dalla salinità e dalla temperatura della curva forza estensione

La dipendenza dalla concentrazione salina della curva forza estensione è stata indagata in [Smi 96, Leg 99b]. Diminuendo la concentrazione salina da Pb 100 mM^+ 500 mM Na^+, PH=7.5 a Pb 5 mM^+ 25 mM Na^+, PH=7.5 ([Leg 99a]) si osservano tre effetti: il plateau della transizione DNA B-DNA S si abbassa perchè aumentando la repulsione elettrostatica tra i fosfati la forma estesa diventa più favorevole. Il modulo di Young γ del DNA B diminuisce perchè le molecole di DNA diventano più facilmente estensibili. Quando la concentrazione salina diventa sufficientemante bassa si osserva un fenomeno di isteresi: invece di ritornare seguendo esattamente il cammino di andata sulla curva forza estensione, il percorso del DNA al ritorno si distacca da quello dell'andata, prima di aver percorso la totalità del plateau. Una volta raggiunta l'estensione corrispondente ad una molecola interamente in forma B, il cammino dell'andata e quello del ritorno si ritrovano sovrapponendosi nuovamente. Questo è stato spiegato da S. Smith *et al* [Smi 96] perchè spesso le molecole di DNA presentano un punto di rottura dello scheletro zucchero fosfato chiamato comunemente nick. Attorno a questo nick può crearsi una zona di denaturazione locale. Rilasciando la tensione al ritorno le parti ancora a doppia elica tornano inizialmente nella fase B (infatti l'inizio del ritorno si sovrappone alla fine del plateau di andata), una volta che questo processo è compiuto si devono riallacciare le parti denaturate per ritornare nella forma B, cosa che avviene a forze più deboli, da cui l'isteresi. Questo fenomeno di isteresi dispare completamente per le molecole senza nick [Leg 99b]. Le curve forza estensione a differenti temperature ricavate da J.F. Léger [Leg 99b] su un λ DNA con nick 100 mM Pb 500 mM Na^+ a $T = 10\,^oC$, $20\,^oC$, $30\,^oC$, mostrano l'apparizione dell'isteresi tra i $20\,^oC$ ed i $30\,^oC$. Anche l'effetto della sequenza è stato indagato da J. F. Léger [Leg 99b],

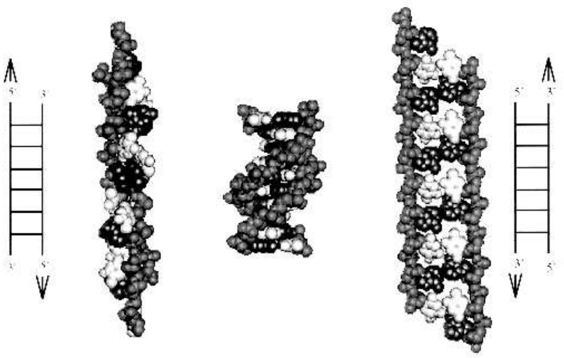

Figura 1.16: Immagini delle due forme possibili per il DNA S dalle simulazioni di R. Lavery e A. Leburn [Leb96]. La forma ottenuta dipende dal modo con cui si tira la molecola. La forma B è rappresentata nel mezzo. Da [All97].

facendo le misure oltre che sul classico λ fago (50% di basi AT) su un DNA 156 Gmac (70% di basi AT) in $100mMPb$, $500mM\ NaCl$ ed a 20^oC si osservano tre differenze principali: la lunghezza di persistenza del DNA 156 Gmac $A \approx 40\,nm$ è più corta di $A \approx\ 55nm$ del λ DNA nelle stesse condizioni. Il plateau comincia a $F = 60\,pN$ rispetto a $F = 62.5\,pN$ ed è centrato su una forza critica più bassa ($63\,pN$ contro $65\,pN$) e si estende su una gamma più grande di forze indicando che la transizione è meno cooperativa. Inoltre l'estensione della forma S è maggiore nel DNA 156 Gmac infatti alla fine del plateau l'estensione relativa della molecola rispetto alla forma B è 1.75. Lo stesso fenomeno di isteresi si osserva per il DNA 256 Gmac, ed anzi esso ha la tendenza ad essere più importante. Tutti questi risultati indicano che le coppie di basi AT sono più fragili e partecipano di meno alla rigidità globale della molecola.

La struttura della forma S

La struttura precisa della forma del DNA S è ancora sconosciuta, attraverso le simulazioni di R. Lavery [Clu 96, Leb 96] sono state ipotizzate due strutture differenti che dipendono da come si tira la molecola (vedi figura 1.16): se essa si tira per le estremità 5'5' la struttura che si ottiene assomiglia ad una fibra con una riduzione del diametro ed una forte inclinazione delle coppie di basi; le coppie di basi restano appaiate ma perdono un legame idrogeno. Se invece si tira la molecola per le estremità 3'3', la struttura ottenuta assomiglia ad un nastro: il DNA è completamente srotolato con la catena zucchero fosfato ai lati e le coppie di basi al centro situate le une sulle altre, questa forma è la stessa proposta dal gruppo di C. Bustamante [Smi 96]. Tirando le due estremità dello stesso filamento o tutte le quattro estremità si ottiene una fibra o un nastro in dipendenza della sequenza. Il gruppo di D. Chatenay [Leg 99b] ha potuto stimare attraverso le curve di forza estensione a superavvolgimento fisso l' elicità del DNA S a $2\pi/38$ al quale corrisponde considerando una lunghezza assiale pari a $1.7 \times 3.4\,\text{Å} = 5.78\,\text{Å}$ un passo di $22nm$.

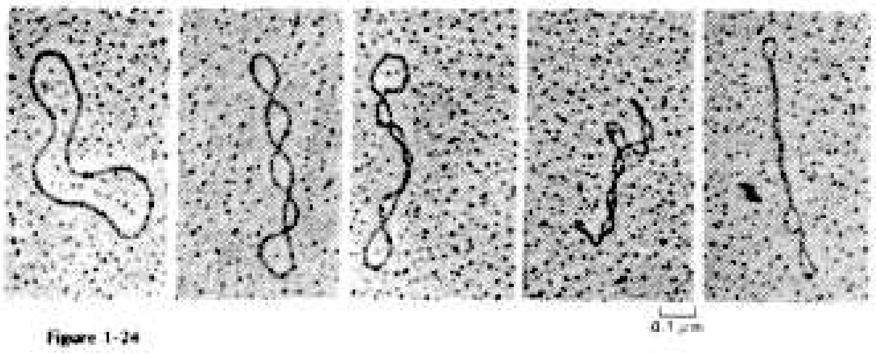

Figura 1.17: La rappresentazione di un DNA circolare, ottenuta per microscopia elettronica. Da sinistra a destra il grado di superavvolgimento aumenta a partire dal DNA rilassato. Da[All97].

1.5 Torsione e superavvolgimento

1.5.1 Alcune nozioni topologiche

Se si tiene fissa l' estremità di una corda e si arrotola l'altra, poi la si blocca in torsione e si rilascia la tensione,la corda si avvolge su se stessa producendo dei superavvolgimenti nello spazio che prendono il nome di plectonemi (vedi figure 1.17 e 1.18).

Il numero di giri prodotti arrotolando la corda è una costante topologica se le estremità rimangono bloccate; essa prende il nome di numero di legame o linking number Lk. Come si può verificare il numero di legame si ripartisce in torsione della corda o plectonemi a seconda della forza di tensione applicata. Analogamente nel DNA la torsione è definita attraverso il numero di giri della doppia elica, detto numero di twist Tw, ed il superavvolgimento nello spazio, o Writhe Wr è definito dal numero di volte che l'asse della molecola incrocia se stesso. Se le estremità della molecola sono bloccate in torsione, ad esempio nel DNA circolare, il numero di legame è una costante topologica ed è definito dalla relazione:

$$Lk = Tw + Wr \tag{1.21}$$

Il numero di legame si può dunque distribuire nella torsione, come nella corda quando è tesa, o in curvatura nello spazio, come nel caso dei plectonemi, la partizione tra i due dipende dalla forza di tensione. Un'altra famiglia di superavvolgimento nello spazio che è caratteristica del DNA sono i solenoidi; gli stessi si ottengono avvolgendo la corda intorno ad un dito (vedi figura 1.18). Un parametro equivalente al numero di legame è il grado di superavvolgimento definito da:

$$\sigma = \frac{Lk - Lk_0}{Lk_0} \tag{1.22}$$

dove Lk_0 è il numero di legame di una molecola di DNA a riposo. Esso è dato dal numero di twist $Tw = N/10.4$, dove N è il numero di coppie di basi della molecola, e 10.4 è il

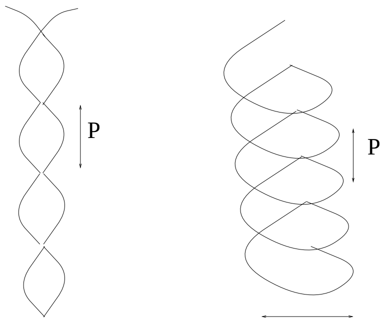

Figura 1.18: Strutture di superavvolgimento nello spazio: il plectonema ed il solenoide. Da [Mar95].

numero di coppie di basi per giro nel DNA in condizioni fisiologiche. L'interesse di definire il grado di superavvolgimento piuttosto che il numero di legame è che esso non dipende dalla taglia della molecola. Il grado di superavvolgimento può essere positivo o negativo a seconda che il numero di giri in eccesso sia imposto alla molecola nel senso della doppia elica o nel senso opposto.

1.5.2 Importanza del superavvolgimento nel DNA

Il superavvolgimento è un fenomeno che caratterizza in modo essenziale la struttura e la funzione del DNA [Cal 97, Ben 93, Ben 96, All 97]:

- Il DNA è impacchettato in maniera compatta e ordinata all'interno del nucleo cellulare. Infatti il nucleo cellulare nelle cellule umane è di qualche micron ($10^{-6}m$) di lato e contiene $\sim 3m$ di DNA diviso in 46 cromosomi. Se questi cromosomi fossero in forma di random coil non entrerebbero nel nucleo infatti la distanza media nel regime di random coil tra le due estremità del DNA è pari a $\sqrt{< z^2 >} = \sqrt{2AL}$ (1.11) dunque a ciascun cromosoma corrisponde un raggio di girazione R stimato a

$$R = \sqrt{2\,50 \times 10^{-9}\,\frac{3}{46}} \simeq 80\mu m \qquad (1.23)$$

  Il DNA è dunque avvolto a spirale intorno agli istoni nella formazione dei nucleosomi che sono a loro volta organizzati in una gerarchia successiva di avvolgimenti che compatta il DNA nei cromosomi.

- Un altro processo essenziale, la trascrizione, può essere generato e regolato dal superavvolgimento. Sono stati fatti degli studi [Liu 87, Wu 88] che hanno mostrato che il moto progressivo della DNA polimerasi lungo il DNA crea un superavvolgimento negativo a monte del complesso di trascrizione ed un superavvolgimento positivo a valle che può portare all'arresto della trascrizione. Anche la replicazione del DNA possiede un simile problema topologico: una volta che la replicazione è stata completata, la nuova molecola sintetizzata si deve slacciare dalla genitrice. La replicazione dell'intero cromosoma durante la mitosi genera cromatidi altamente allacciati e la cellula muore se non riesce a separare le coppie sorelle di cromatidi appena replicate.

- Per rimuovere questo genere di problemi topologici esistono delle proteine chiamate topoisomerasi. Ce ne sono di differenti tipi, alcune possono creare dei superavvolgimenti positivi, altre negativi, altre rilasciano la tensione torsionale creando un nick temporaneo, altre ancora permettono a due pezzi di DNA di passare l'uno attraverso l'altro, cosa utile per rimuovere i nodi.

1.6 L'elasticità di una molecola superavvolta

Le curve di forza estensione sotto vincolo di torsione sono state per la prima volta ricavate dal gruppo di D. Bensimon e V. Croquette [Str 96, Str 98a, All 98] e sono mostrate in figura 1.21. Come verrà discusso in dettaglio nel capitolo 3 (vedi figura 3.4) a bassa forza di tensione $F < 0.4\,pN$ sia il DNA avvolto positivamente che quello avvolto negativamente rilascia la torsione nella formazione di plectonemi. Di conseguenza la molecola è più difficile da tirare rispetto al caso a superavvolgimento nullo.

A forza $F_c^- \sim 0.5\,pN$ le misure diventano sensibili alla chiralità intrinseca della molecola ed il DNA superavvolto positivamente è più difficile da tirare del DNA superavvolto negativamente. In questo ultimo caso, infatti, un superavvolgimento negativo maggiore di $\sigma_{c^-} = -0.015$ (a cui corrisponde una coppia di torsione $\Gamma_{c^-} \approx 9\,pN\,nm$) porta alla formazione di bolle di denaturazione locali. Il DNA mantiene dunque una forma estesa, anche ad alti superavvolgimenti, senza la formazione di plectonemi.

A forza $F_c^+ \sim 3\,pN$ anche per il DNA superavvolto positivamente si osserva una transizione da una forma poco estesa ad una forma estesa, per superavvolgimenti maggiori di $\sigma_{c^+} = 0.037$ (corrispondentemente una coppia di torsione $\Gamma_{c^+} \approx 20\,pN\,nm$) la torsione viene rilasciata in questo caso nella transizione strutturale ad una nuova forma che è stata chiamata DNA P, vedi figura 1.19 [Str 99c]. Dati sperimentali e modelli molecolari [All 98, All 97] suggeriscono che questa struttura ha ≈ 2.6 coppie di basi per giro, una estensione 1.75 volte quella del DNA B ed una lunghezza di persistenza $A_P \simeq 19\,nm$. Inoltre essa ha le basi esposte all'esterno, come la struttura che era stata proposta per il DNA nel 1953 da Pauling [Pau 53]. La curva forza estensione sotto vincolo torsionale è stata studiata a più alti valori della forza dal gruppo di D. Chatenay [Leg 99a, Leg 99b], essi hanno mostrato che, per una molecola bloccata in torsione a $\sigma = 0$, la transizione alla forma di DNAS avviene ad una forza di $F \simeq 100\,pN$. Per le curve a $\sigma < 0$ si osserva un gradino dovuto alla coesistenza tra la forma di DNA B e di DNAd nella molecola bloccata in torsione che riproduce il fatto che la porzione di DNAd transisce per forze minori alla forma S, mentre per la regione di DNA B la transizione avviene a $F \simeq 100pN$; analoga-

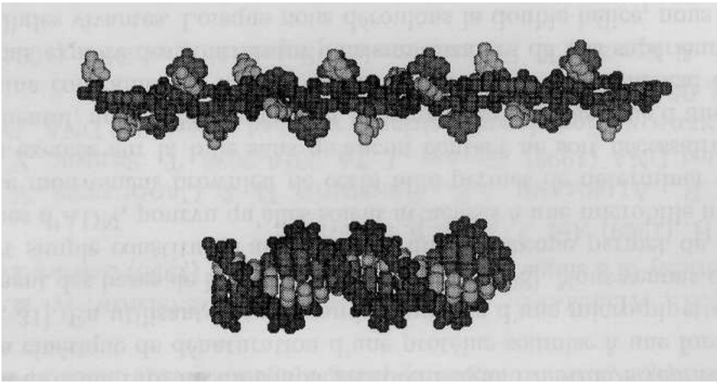

Figura 1.19: Struttura di una molecola di DNA, di 18 basi GC, sotto due forme: in basso il DNA B, in alto la rappresentazione della nuova fase chiamata DNA P ottenuta dalle simulazioni di R. Lavery e collaboratori tramite il programma JUMNA, imponendo una torsione alla molecola. Lo scheletro zucchero fosfato, all'interno della molecola nel DNAP, è più scuro, mentre le due basi, all'esterno della molecola nel DNA P, sono più chiare. Da [Str99c].

mente per i superavvolgimenti positivi la coesistenza tra il DNAB ed il DNAP dà luogo ad una curva forza-estensione a più gradini.

1.6.1 Approcci teorici per il superavvolgimento

A partire dagli anni '80 un modello elastico è stato elaborato per descrivere il fenomeno del superavvolgimento del DNA [Tsu 86]. L'idea di base di questo modello è che la formazione di strutture superavvolte nello spazio risulta dalla competizione tra l'elasticità di curvatura e l'elasticità di torsione. L'energia si scrive dunque:

$$\frac{E}{k_B T} = \frac{A}{2}\int_0^L \left(\frac{d\hat{t}}{ds}\right)^2 + \frac{C}{2}\int \left(\dot{\phi}\, cos\theta + \dot{\psi}\right)^2 ds \qquad (1.24)$$

Il termine C rappresenta il twist, cioé la rotazione di una coppia di base rispetto alla precedente nel piano ortogonale all'asse dell'elica, espresso attraverso gli angoli di Eulero mostrati in figura 1.20; su tale energia si deve imporre che il numero di legame Lk sia fisso. Il numero di legame può essere scritto come somma del Twist e del Writhe [Tsu 86, Mar 95a, Fai 96], quest'ultimo viene in genere espresso usando una rappresentazione nota in fisica dei polimeri [Wie 86]. Quando si aggiunge la forza di tensione come in (1.6) questo modello diventa una Worm like Chain che può essere sottoposta a torsione (WLRC) dove R sta per Rod. I parametri che determinano le proprietà del DNA superavvolto sono dunque la lunghezza di persistenza A e la lunghezza di persistenza di torsione C. Bisogna inoltre ricordare gli effetti elettrostatici che entrano in gioco quando i plectonemi tendono a mettere in contatto due parti della molecola. Le prime stime sperimentali di $A \simeq 50nm$

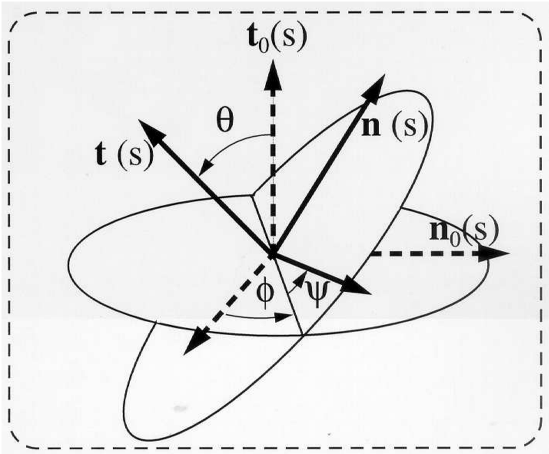

Figura 1.20: Gli angoli di Eulero θ, ϕ e ψ determinano l'orientamento degli assi $\hat{t}(s)$, $\hat{n}(s)$, del sistema di coordinate mobile, rispetto al sistema di coordinate fisso $\hat{t_0}(s)$, $\hat{n_0}(s)$. Da [Fai96].

e $40 < C < 100nm$ sono state fornite dal moto rapido di varie sonde spettroscopiche legate al DNA (depolarizzazione di luminescenza) o dalla determinazione della distribuzione di twist all'equilibrio nei plasmidi per analisi di topoisomeri [Hag 88, Sel92]. Le proprietà di molecole di DNA con livelli fisiologici di superavvolgimento sono state studiate con simulazioni Monte Carlo da Vologodskii *et al.* in [Vol 92] e le forme ottenute per i DNA superavvolti sono comparabili ai valori sperimentali ottenuti da microscopia elettronica, mostrate ad esempio in figura 1.17. Approcci analitici sono stati adottati in [Tsu 86, Fai 96] per trovare le configurazioni che minimizzano l'energia (1.24).

Il modello di Marko e Siggia

Marko e Siggia in [Mar 94, Mar 95b, Mar 97] aggiungono ai contributi all'energia elastica in (1.24) le interazioni elettrostatiche per mezzo di un potenziale di Debye-Huckel. Essi calcolano così lo stato ad energia più bassa, per le due forme di superavvolgimento nello spazio che si incontrano più spesso: i solenoidi ed i plectonemi, in funzione dei parametri che lo caratterizzano ovvero il raggio ed il passo (vedi figura 1.18). Inoltre calcolano le fluttuazioni quadratiche dell'energia intorno a questi due stati in modo da ottenere un potenziale entropico effettivo per calcolare l'energia libera. L'energia libera totale fornisce lo stato favorevole tra plectonemi, solenoidi e lo stato non superavvolto in funzione del linking number. Aggiungendo una forza di tensione si calcola inoltre [Mar 97] l'estensione in funzione della forza che porta a delle curve in buon accordo con i risultati sperimentali mostrati in figura 1.21.

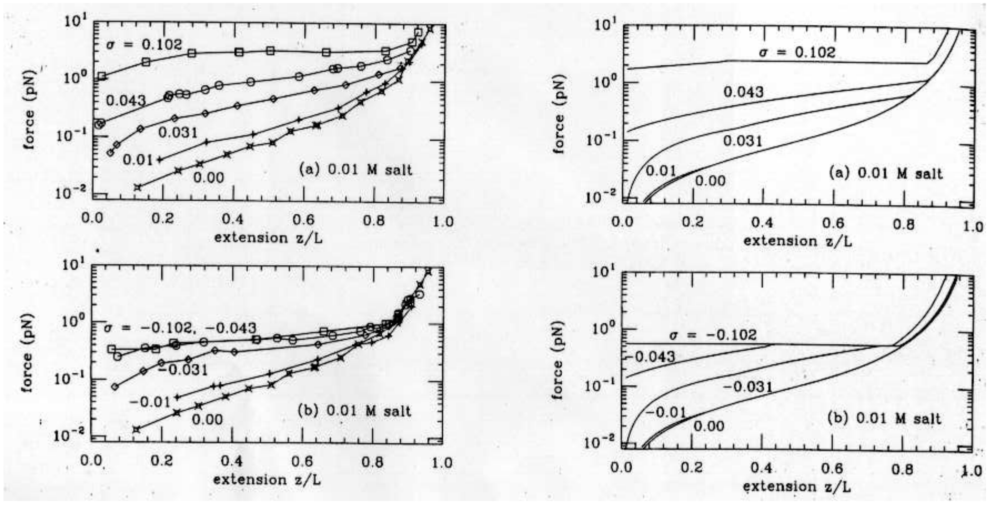

Figura 1.21: A sinistra: la curva forza estensione ottenuta sperimentalmnte da [Str96] per un λ DNA di 16 μm, $10 mMPB$ superavvolto, rispettivamente positivamente $\sigma > 0$ (in alto (a)) e negativamente $\sigma < 0$ (in basso (b)) . a) Aumentando il grado di superavvolgimento la forza assume un valore non nullo per estensioni nulle. Il plateau della forza a $F = 3\, pN$ indica la transizione strutturale al DNA P.
b)Il plateau della forza appare a $F = 0.5\, pN$ ed indica la transizione strutturale al DNA d.
A destra: curva forza estensione ottenuta teoricamente da J. Marko, includendo la coesistenza di stati plectonemici, estesi, e denaturati. Da [Mar97].

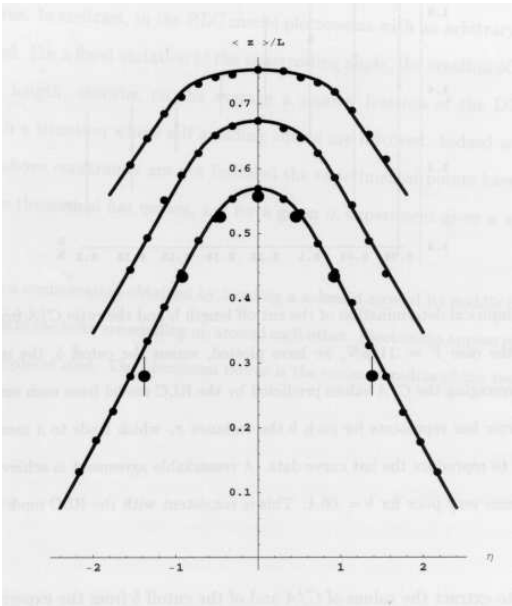

Figura 1.22: Curva elongazione vs. superavvolgimento ridotto $\eta = 94.8\,\sigma$, per forze dal basso all'alto $F = 0.116,\ 0.197\,0.328\,pN$. I punti più piccoli sono risultati sperimentali, i punti più grandi nella curva più bassa sono da simulazioni Monte Carlo e le curve piene sono i risultati teorici ottenuti da Bouchiat e Mézard. Da [Bou99].

La teoria di Bouchiat e Mézard

C. Bouchiat e M. Mézard hanno esteso l'approccio standard della WLC descritto nel paragrafo 1.4.1 per calcolare analiticamente le proprietà di equilibrio a temperatura finita di un DNA sottoposto a tensione ed a piccoli superavvolgimenti. All'energia in (1.24) essi aggiungono una forza di tensione come in (1.6), essi non considerano la auto-repulsione dovuta ad effetti elettrostatici, questo porta alla limitazione di bassi superavvolgimenti. La condizione di numero di legame fisso è imposta nel seguente modo: la prima base è scelta sul sistema di riferimento rispetto al quale si determinano gli angoli di Eulero (vedi figura 1.20) ovvero $\theta(0) = \phi(0) = \psi(0)$, mentre per l'ultima base l'asse molecolare è lungo l'asse z $\theta(L) = 0$. Dunque il superavvolgimento è dato dall'angolo di twist dell'ultima coppia di basi $\psi(L) + \phi(L) = 2\pi Lk$ che si può riscrivere come

$$2\pi Lk = \int_0^L ds \,\left(\dot{\psi}(s) + \dot{\phi}(s)\right) \tag{1.25}$$

La stessa espressione è ottenuta in [Fai 96] a partire dalla espressione del linking number come somma del Twist e del Writhe.

La funzione di partizione si scrive dunque come l'integrale di cammino nello spazio degli angoli di Eulero:

$$Z = \int \Delta\left[\theta, \phi, \psi\right] \,\delta\left[2\pi Lk - \int_0^L ds(\dot{\psi}(s) + \dot{\phi}(s))\right] e^{-E/k_BT} \tag{1.26}$$

L'integrazione gaussiana sull'angolo ψ si può fare facilmente. Dunque la funzione di partizione si può scrivere come un integrale di cammino sui due angoli θ e φ da cui se ne deriva una analogia quanto meccanica con il problema di una particella di carica unitaria che si muove sulla sfera unitaria sotto l'azione congiunta di un campo elettrico e di un campo generato da un monopolio magnetico di carica non quantificata. Il calcolo della funzione di partizione richiede l'introduzione di un passo di discretizzazione b e conduce al valore dell'elongazione in funzione della forza per vari valori di superavvolgimento. Con la scelta $b/A = 0.14$ per i tre valori della forza $F = 0.116, 0.197, 0.328\,pN$, come mostrato in figura 1.22, la scelta di $C/A = 1.64 \pm 0.04$ fornisce un accordo tra i dati teorici e quelli ottenuti dal gruppo di D. Bensimon e V. Croquette [Bou 99b]. La teoria di Bouchiat e Mézard è limitata a piccole forze e piccoli superavvolgimenti infatti il modello elastico è simmetrico per superavvolgimenti negativi o positivi e non può tenere in conto la chiralità della molecola. La stima da essi fornita del valore di C, in accordo con quella determinata dal gruppo di D. Bensimon e V. Croquette, $C/k_BT = 86 \pm 10nm$ [Str 99d] come verrà illustrato in dettaglio nel paragrafo (3.2.4), è in accordo e più precisa rispetto al valore stimato precedentemente $C/k_BT = 75 \pm 25nm$.

1.7 Osservazioni conclusive sugli esperimenti di elasticità sul DNA

Riassumiamo i progressi ottenuti tramite gli esperimenti di elasticità su singola molecola e le teorie ad essi associate:

- è stato introdotto un nuovo metodo sperimentale per la determinazione diretta delle costanti che caratterizzano l'elasticità del DNA, in particolar modo, la lunghezza di persistenza A il modulo di torsione C ed il modulo di Young γ;
- sono state caratterizzate due nuove strutture del DNA : il DNA S ed il DNA P;
- è stato messa in evidenza la possibile coesistenza, in una molecola sottoposta a vincoli di tensione o torsione, tra DNA S e DNA B, tra DNA B e DNA d e tra DNA B e DNA P;
- Lo studio dell'elasticità di una singola molecola di DNA ha una prospettiva diretta: l'indagine su singole molecole dell'interazione tra DNA e proteine. In questa direzione il gruppo di D. Bensimon e V. Croquette ha già presentato due lavori: uno sulla prima osservazione della replicazione da parte di una singola DNA polimerase di un singolo filamento di DNA mantenuto in tensione [Mai 99]; l'altro sull'osservazione diretta dell' attività di una topoisomerasi su un DNA superavvolto [Str 99b]. Il gruppo di D. Chatenay ha invece condotto degli studi preliminari sull'interazione tra il DNA e RecA [Leg 99b].