Capitolo 3

Denaturazione termica e meccanica del DNA : teoria a confronto con gli esperimenti

In questo capitolo si mostrerà come attraverso la meccanica statistica del modello si ottengono dei risultati in ottimo accordo con esperimenti di diverso tipo su molecole di DNA in soluzione. Una molecola di DNA in soluzione con una sequenza molto lunga è un sistema termodinamico in equilibrio con l'ambiente esterno: la soluzione di cui si controlla ad esempio la temperatura. Tramite la meccanica statistica del modello si ricavano delle proprietà termodinamiche come l'energia libera o il valore medio del raggio a una data temperatura. Si ricavavano analogamente proprietà collegate al grado di elicità della molecola che, come abbiamo visto, sono molto importanti dal punto di vista biologico, come l'andamento dell'angolo medio di twist in funzione della temperatura.

La denaturazione termica della molecola può essere descritta come una transizione tra due fasi con strutture differenti : la doppia elica del DNA B in cui le coppie di basi sono appaiate dal legame idrogeno e la struttura denaturata del DNA d in cui i due filamenti sono liberi. Si può dedurre l'energia libera di denaturazione ad una data temperatura al di sotto della temperatura di denaturazione, cioè la differenza di energia libera tra la fase DNA B e la fase DNA d.

Per finire la meccanica statistica del modello si collega ad un esperimento effettuato recentemente su una singola molecola di DNA in soluzione del gruppo di D. Bensimon e V. Croquette [Str 98b]. Nell'esperimento in questione si applica meccanicamente una coppia di torsione su un estremo di una molecola di DNA mentre l'altro estremo è fisso e la molecola è mantenuta dritta da un' opportuna forza di tensione. Ad un grado critico di superavvolgimento negativo inizia la coesistenza tra la fase DNA d che si presenta in bolle di denaturazione localizzate e la fase DNA B.
Mediante il nostro modello si può riprodurre teoricamente l'esperimento introducendo una coppia di torsione su una estremità della molecola, mantenendo l'altra fissa. La coppia di torsione ha il ruolo di un secondo parametro esterno e, come per la transizione liquido-gas controllata dai due parametri temperatura e pressione, si può tracciare un diagramma

della transizione DNA B-DNA d, in funzione della temperatura e della coppia di torsione. La regione di coesistenza della transizione di fase è parametrizzata con il grado di superavvolgimento in accordo con le osservazioni sperimentali.

Questo approccio può sembrare troppo semplificato per dare delle predizioni veritiere su un sistema complicato come il DNA ma i risultati, come ad esempio la coppia critica di denaturazione a temperatura ambiente, ed il grado di superavvolgimento corrispondente, tornano in ottimo accordo con i risultati sperimentali!

La prima parte del capitolo sarà riservata alla descrizione dei risultati sperimentali sulle proprietà termiche del DNA in soluzione, sulla transizione di denaturazione guidata dalla temperatura e sulla denaturazione indotta da una coppia di torsione. In una seconda parte si descriverà la tecnica usata per calcolare le proprietà termodinamiche del sistema, cioè il metodo dell'integrale di trasferimento . Nella terza parte del capitolo si esporranno i risultati ottenuti.

3.1 Fluttuazioni termiche e denaturazione del DNA

3.1.1 Le fluttuazioni della distanza assiale con la temperatura da misure di diffusione di neutroni

A partire dal 1987 H. Grimm, A. Rupprecht e collaboratori hanno studiato le proprietà statiche e dinamiche di DNA in fibre attraverso la diffusione di neutroni [Gri 87, Gri 91, Gri 97]. In particolare dal fattore di struttura statico si ricava la periodicità dell'elica e si fissa il valore della distanza assiale a $h = 3.38\,\text{Å}$ e delle sue fluttuazioni termiche a $\Delta h = 0.2\,\text{Å}$[Gri 87] .

3.1.2 La variazione dell'angolo di twist con la temperatura da misure di elettroforesi

Nel 1975 R. Depew e J.C. Wang ([Dep 75]) hanno studiato le fluttuazioni di conformazione dell' elica del DNA. Nell'esperimento effettuato essi chiudevano circolarmente delle molecole di DNA in soluzione ad una data temperatura; quindi, mediante elettroforesi su gel, individuavano il numero di twist, divenuto una costante topologica. Variando la temperatura, essi hanno trovato una variazione dell'angolo medio di twist di $\frac{\Delta\theta}{\Delta T} = -0.01\,\text{gradi}/K = -1.7 10^{-4}\,rad/K$. Analizzando, con la stessa tecnica, DNA di lunghezza diversa in soluzione a condizioni fisiologiche, J. Wang nel 1979 ha trovato un passo della doppia elica di 10.4 ± 1 coppie di basi per giro [Wan 79]. Questo valore differisce dal valore di 10 coppie di basi per giro per la struttura del DNA B in fibre. Lo stesso valore è stato ritrovato da D. Rhodes e A. Klug nel 1981 [Rho 81] con un esperimento differente in cui immobilizzavano il DNA su una superficie e lo digerivano con un enzima che taglia sui legami fosfodiesterici più accessibili. La distanza tra i siti di taglio misurata mediante elettroforesi su gel forniva direttamante la periodicità della doppia elica.

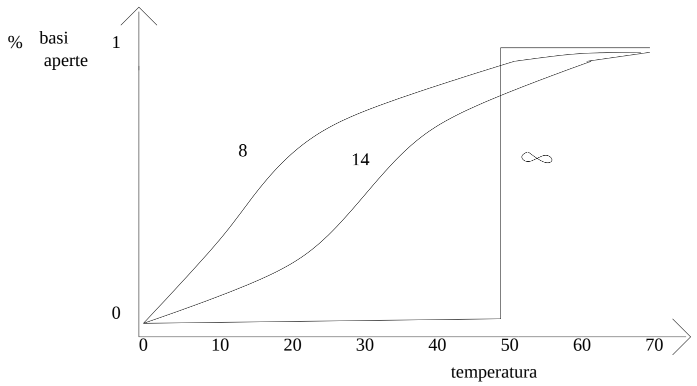

Figura 3.1: Profilo di denaturazione per DNA a sequenza poliA-poliU di lunghezza: 8,14,∞. L'assorbimento di radiazione ultravioletta fornisce la percentuale di basi aperte. Per DNA lunghi la transizione è a gradino e la temperatura di denaturazione è di circa 50^oC a 10 mM Na^+. Da [Sae 84]

3.1.3 Misure ottiche della temperatura di denaturazione di molecole di DNA in soluzione

Come già discusso nel capitolo introduttivo (1.2) Lo spettro UV di molecole di DNA in soluzione è un buon indicatore della formazione e della rottura della doppia elica (vedi fig. 1.6).

3.1.4 Dipendenza dalla composizione, dalla concentrazione ionica e dalla lunghezza del DNA: Formula empirica per la temperatura di denaturazione

La temperatura di denaturazione varia oltre che con la lunghezza della sequenza (come mostrato in fig. 3.1) con il rapporto CG/AT (vedi fig 1.7) e con la forza ionica del mezzo. A partire dalla classificazione delle temperature di denaturazione di diverse sequenze, in diverse condizioni ioniche sono state ricavate delle formule empiriche per predire indicativamente la temperatura di denaturazione di una sequenza qualsiasi [Sae 84]

$$T_m = 354.5 + 16.6 \log_{10}[Na^+] + 0.41\%(G + C) - 600/N \tag{3.1}$$

Per la sequenza poli(dG-dT)poli(dA-dC) a una concentrazione di 19.5 mM Na^+, che prenderemo come riferimento, la temperatura sperimentale di denaturazione è di 77^oC. Per una sequenza di una percentuale di AT pari a quella di GC e in 10 mM PB, come il λfago utilizzato nell'esperimento che analizzeremo in seguito si ottiene $T_m \simeq 67^oC$.

3.1.5 L'energia libera di denaturazione da misure calorimetriche

Nel 1986 Breslauer *et al.* hanno, da misure calorimetriche e spettroscopiche, misurato la differenza di energia libera (ΔG), entalpia (ΔH) ed entropia tra lo stato DNA B e quello DNA d, a temperatura fissa e su corte catene di oligonucleotidi e polinucleotidi in soluzione (a 1 M NaCl, 298 K). Usando i dati termodinamici sulle possibili interazioni a primi vicini (10 dimeri), costruiti a partire dai dati spermentali, si può predire la stabilità di una molecola di DNA conoscendo la sua sequenza. Essi trovano che l'entalpia non dipende dalla temperatura, ed è la sequenza oltre che la composizione di basi che influisce sulla stabilità della molecola, il duplex poli(dA).poli(dT), ad esempio, è molto più stabile del duplex poli(dAT).poli(dAT) pur avendo la stessa composizione. In effetti l'energia totale che stabilizza un dimero di coppie di basi può essere divisa in una componente orizzontale (accoppiamento di basi) ed una verticale (energia di impilamento). La prima è esclusivamente dipendente dalla composizione mentre la seconda è influenzata sia dalla composizione che dalla sequenza. Le forze elettrostatiche che regolano l'interazione di impilamento sono accessibili da calcoli quanto-meccanici; anche tramite questi ultimi sono stati forniti dei valori dell'entalpia (ΔH) per i 10 possibili dimeri del DNA [Sae 84](tabella pag 139). Una formula dunque utilizzabile per predire l'energia libera di denaturazione a partire dalla conoscenza della entalpia è

$$\Delta G = \Delta H \; (1 - T/T_m) \tag{3.2}$$

Se si usa il valore di $\Delta H = 9.7\, k_B T$ fornito in [Bre 86] per la nostra sequenza di riferimento, (è da notare però che nel dato fornito la concentrazione è più alta di quella del nostro sistema di riferimento quindi il valore di ΔH potrebbe essere più elevato di quello effettivo) si ottiene un $\Delta G \simeq 1.4\, k_B T$. Mentre per una sequenza ricca in AT usando un $\Delta H \simeq 13\, k_B T$ (mediato sui 3 dimeri possibili) [Bre 86] [Str 98a] si ottiene $\Delta G \simeq 1.1\, k_B T$

3.2 Esperimento di Allemand, Bensimon, Croquette e Strick

L' esperimento che viene descritto in questo paragrafo è stato messo a punto dal gruppo di D. Bensimon e V. Croquette nel 1996. Una molecola di λfago lunga $\simeq 16\, \mu m$ ($\simeq 50 Kbp$), in 10 mM PB, è attaccata su una estremità ad una superficie di vetro e sull'altra ad una biglia magnetica di $2.8\, \mu m$. Variando la distanza tra il campione e dei magneti fissi si controlla la forza di tensione sulla molecola, mentre ruotando i magneti si superavvolge la molecola vedi figura 3.2. Gli esperimenti condotti su DNA superavvolto hanno indicato che una molecola di DNA, estesa e superavvolta negativamente, denatura localmente per alleviare lo stress torsionale accumulato; le bolle di denaturazione che si formano a partire dalle regioni ricche in AT sono stabili.

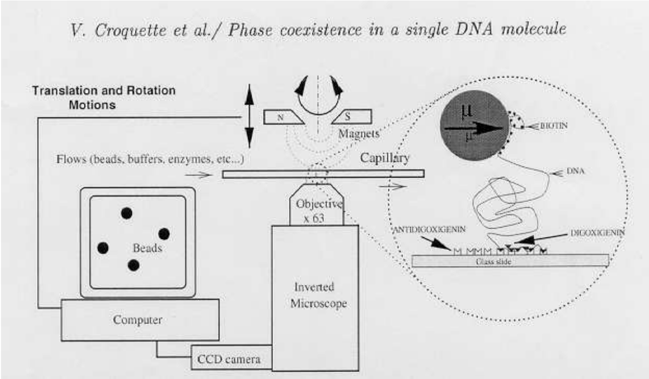

Figura 3.2: Vista schematica dell'apparato sperimentale, dalla referenza. Da [Str99c].

3.2.1 Apparato sperimentale e metodo di misura

La biglia magnetica è posta in un tubo capillare in cui si inietta la soluzione con le molecole di DNA. L'osservazione si fa per mezzo di un microscopio; l'immagine è trattata da un computer munito di una scheda di acquisizione video, il computer pilota anche i motori che regolano la forza di trazione che agisce sulla biglia e il suo orientamento, imponendo la direzione del campo magnetico. Alla biglia, ricoperta di streptavidina, si attacca su più punti una estremità della molecola biotinizzata; mentre l'altra estremità, ricoperta di digoxigenina, si attacca su una superficie di vetro ricoperta di antidigoxigenina. L'attaccatura su più punti serve ad evitare che la molecola ruoti attorno al suo punto di ancoraggio [Str 96].

Descriviamo brevemente la tecnica adottata per misurare la forza di tensione sulla biglia, basata sul movimento browniano. Per uno spostamento della biglia rispetto alla sua posizione di equilibrio nella direzione x: δx, la forza di richiamo è data dalla proiezione della forza lungo questo asse (vedi fig 3.3): $F_x = F \sin(\delta\alpha) \simeq F \sin(\delta x/l) \simeq F\,\delta x/l$. Dunque la rigidità della forza di richiamo è $k_x = F/l$. Quest'ultima è associata, tramite il teorema di equipartizione dell'energia, alle fluttuazioni browniane: $1/2 k_x \langle \delta x^2 \rangle = 1/2 k_B T$.

L'estensione della molecola e le fluttuazioni sono registrare con la videocamera e i dati elaborati tramite il computer. Si possono misurare forze nel regime da $6\,fN$ a $100\,pN$. Dalle fluttuazioni longitudinali (lungo l'asse z) si ricava la rigidità della molecola, infatti la risposta alla forza in questa direzione corrisponde direttamente alla rigidità della molecola: $k_z = (\frac{\partial F}{\partial l}) = k_B T \langle \delta z^2 \rangle$. Per assicurarsi che si sta tirando su una singola molecola, ad inizio esperimento bisogna costruire la curva di forza/estensione della biglia candidata e compararla alla curva ottenuta teoricamente dal modello WLC. Ruotando i magneti di n giri interi, se la molecola non è libera di ruotare (non è rotta in un punto, o non può ruotare intorno al punto di ancoraggio) il numero di legame del DNA cambia di $\Delta L_k = n$.

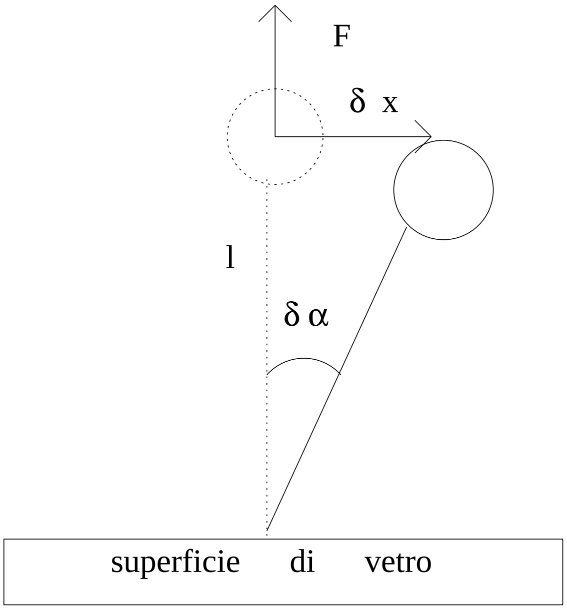

Figura 3.3: Metodo di misura della forza di tensione a partire dalle fluttuazioni browniane. Da [All97].

3.2.2 Curve di estensione-superavvolgimento a forza di tensione fissa

Le curve di estensione superavvolgimento per piccoli valori della forza di tensione ($F < 0.5\,pN$) mostrano che il DNA si comporta come un tubo elastico. Se si arrotola l'estremità di un tubo elastico, mantenendo l'altra estremità fissa e tesa, c'e' un punto, chiamato instabilità di 'buckling', in cui la torsione viene improvvisamente alleviata, mediante la formazione di strutture arrotolate nello spazio: i plectonemi (analogamente a quanto succede alla corda del telefono) e il filo si accorcia [Bou 99c].

In termini tecnici si passa da uno stato dominato dal twist ad uno stato dominato dal writhe. La diminuzione della lunghezza, che risulta dalla formazione dei plectonemi, è simmetrica per superavvolgimenti positivi o negativi ed è mostrata nella curva in basso della figura di destra in 3.4, a forza di tensione $0.2pN$ [Str 96] . Per forze di tensione maggiori di $F_{c-} \simeq 0.5pN$ i risultati ottenuti non sono più simmetrici per avvolgimenti negativi o positivi: molecole superavvolte positivamente sono molto più difficili da allungare che molecole superavvolte negativamente. Questa asimmetria è dovuta alla presenza della struttura interna del DNA. Infatti non si assiste più alla formazione dei plectonemi, la molecola rimane dunque essenzialmente estesa, ma ad un valore critico del superavvolgimento $\sigma_{c-} \simeq -0.015$ (ad $F = F_{c-}$) ha luogo transizione strutturale per alleviare lo stress torsionale: si aprono delle bolle di denaturazione (vedi la curva a $f = 1pN$ di fig 3.4). Per forze superiori a $3pN$ una transizione strutturale alla forma DNAP ha analogamente luogo per superavvolgimenti positivi $\sigma_{c+} = 0.037$ (vedi la curva a $F = 8pN$ in fig 3.4)

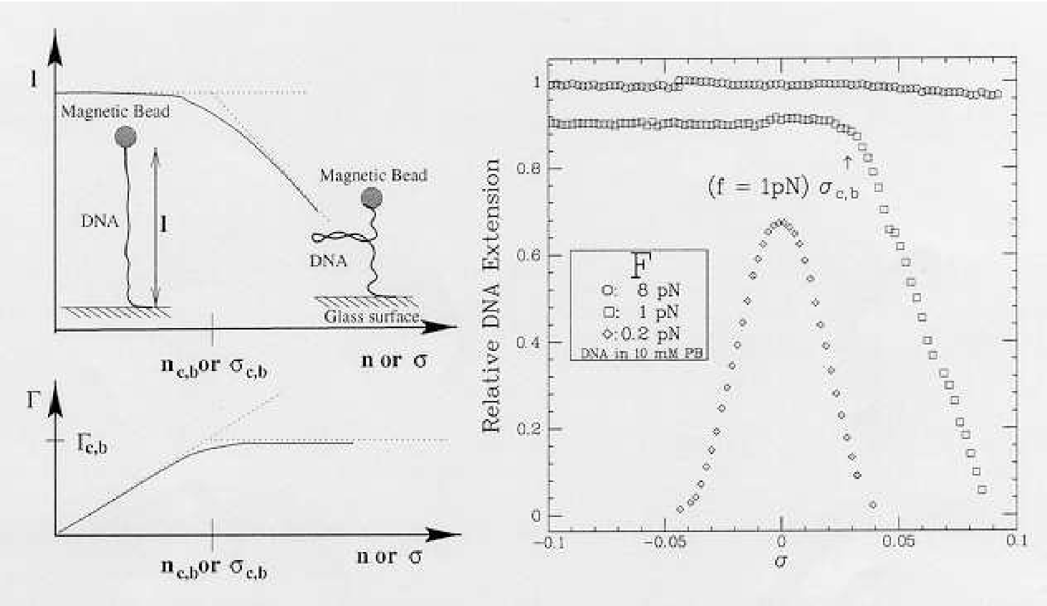

Figura 3.4: Curve di estensione-superavvolgimento. Sulla sinistra:rappresentazione schematica dell'instabilità di buckling: prima la lunghezza del tubo di gomma rimane costante e la torsione cresce linearmente con il numero di giri applicati n, poi ad un valore critico n_{cb} la lunghezza inizia a diminuire e la torsione rimane costante. Per la molecola di DNA il comportamento è simile, anche se le fluttuazioni termiche arrotondano la transizione. Sulla destra: a basse forze ($F = 0.2pN$) il modello del tubo di gomma con fluttuazioni termiche è corretto, a forze intermedie ($F = 1pN$) la transizione di buckling è osservata come predetto per $n > 0$ a n_{cb} ma sparisce per $n < 0$ a causa della transizione alla forma DNA d. Per forze ancora più grandi ($F = 8pN$) la transizione di buckling non si vede su nessuno dei due lati per la transizione per $n > 0$ alla forma P. Da [Str 99c].

3.2.3 Coesistenza del DNA d e del DNA B

In questa sezione si illustrerà come dalle curve di Forza-Estensione, per superavvolgimenti negativi, è stata dedotta la coesistenza delle fasi DNA B e DNA d ed è stato dimostrato che al di là del valore di superavvolgimento critico σ_{c-} la molecola si separa in una fase di DNA B con avvolgimento $\sigma_{c-} \simeq -0.015$ e in una fase di DNA d on $\sigma_d = -1$ [Str 99c] .

Con l'ipotesi di separazione delle due fasi l'estensione dovuta ad una forza di tensione si scrive come la somma dell'estensione della componente di DNA B, presente in frazione α, e quella della componente DNA d, presente in frazione $1 - \alpha$:

$$l = (1 - \alpha) l_B(F) + \alpha l_d(F) \tag{3.3}$$

Analogamente il superavvolgimento si scrive:

$$\sigma = (1 - \alpha)\sigma_B + \alpha\sigma_d, \tag{3.4}$$

trascurando il valore $\sigma_B = \sigma_{c-}$ si ha $\alpha = \sigma/\sigma_d$ da cui si ottiene

$$l(\sigma, F) = (1 - \sigma/\sigma_d) l_B(F) + \sigma/\sigma_d \, l_d(F) \tag{3.5}$$

In effetti graficando l'estensione $l(\sigma, F)$ in funzione del superavvolgimento per $(-1 > \sigma > 0)$ si osserva la relazione lineare aspettata, inoltre se si ricava $l_d(F)$ dalla 3.5 a partire dalle curve $l(\sigma, F)$ ottenute su differenti valori di σ , la curva $l_d(F)$ risulta la stessa per tutti i valori di σ [Str 99c]. La coesistenza delle due fasi è stata inoltre provata mediante due altri esperimenti complementari.

Il primo esperimento [All 98] è il danneggiamento chimico delle basi non implicate in un legame idrogeno mediante un composto chimico: il glioxal. Srotolando una molecola di $\Delta n = -200$, a $F > F_{c-} = 1pN$, si aprono immediatamente delle bolle di denaturazione; il glioxal viene quindi introdotto. Riportando, in seguito, il superavvolgimento a zero e risottoponendo la molecola all'esperimento di allungamento in funzione del superavvolgimento per una forza di $F < F_{c-} = 0.2pN$ si ottengono i seguenti risultati: la zona a superavvolgimenti positivi non presenta differenze rispetto ad una molecola non danneggiata (curva 1 fig 3.4), viceversa per n da 0 a -180 giri il punto di massima estensione si trasforma in una zona piatta. Questo indica che dopo una soglia di 20 giri ($\sigma = \sigma_c \simeq -0.015$), in cui la torsione si trasmette elasticamente, ogni giro apre 10.5 basi della zona danneggiata, quest'ultima infatti si denatura facilmente, anche a forze deboli. Quando tutte le basi danneggiate si sono denaturate la torsione aumenta nuovamente e la molecola si accorcia, come di consueto, formando plectonemi.

Il secondo esperimento [Str 98b] consiste nell'introdurre nel tubo capillare, dove la molecola di DNA è sottoposta ad una forza di tensione $F > F_c$, dei filamenti omologhi ad uno dei due filamenti della regione più ricca di AT del λfago (la cui sequenza è conosciuta). Se si sottopone la molecola ad un superavvolgimento $|\sigma| > |\sigma_c|$ questa regione si apre ed il segmento omologo si appaia alle basi aperte. L'ibridizzazione viene provata rilasciando il superavvolgimento e la forza e sottoponendo nuovamente la molecola ad un esperimento di allungamento in funzione del superavvolgimento o di allungamento in funzione della forza,

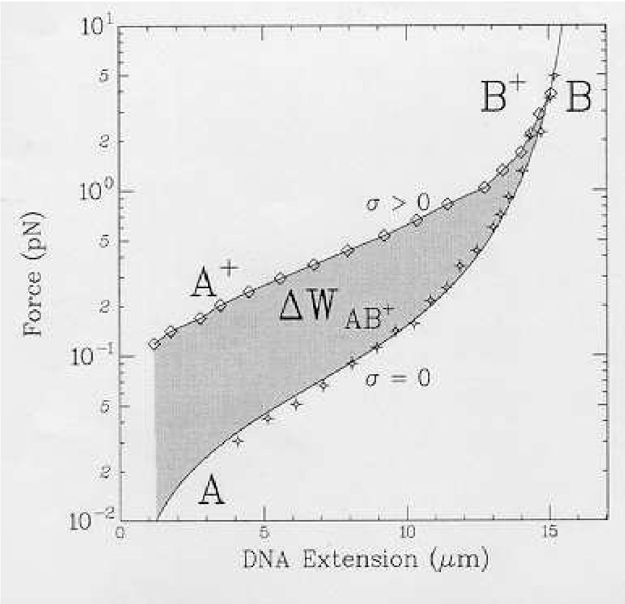

Figura 3.5: Lavoro addizionale fatto quando si tira una molecola di DNA superavvolta. Da [Str 99d].

per $F < F_{c-}$. Si ottengono degli andamenti differenti da quelli normali, questo prova che è stata introdotta una irreversibilità, dovuta appunto all'appaiamento del filamento omologo che è potuto avvenire solo grazie all'apertura della bolla di denaturazione. Le bolle stabili si formano su regioni definite, infatti è stato anche visto che l'ibridizzazione di una seconda regione, meno ricca di AT della precedente, avviene solo per valori del superavvolgimento superiori al valore per cui è stata ibridizzata la prima regione.

3.2.4 Modulo di torsione, energia libera di denaturazione, e valore della coppia critica

Comparando le curve di forza estensione per un superavvolgimento positivo e negativo dello stesso numero di giri, il gruppo di Bensimon e Croquette ha fornito una stima del modulo di torsione, dell'energia libera di denaturazione nelle zone ricche in AT e del valore della coppia critica [Str 99d] [Str 98a]. Descriviamo di seguito il metodo utilizzato. Il DNA di lunghezza cristallografica $l = 50\ Kbp$ ed estensione pari ad $l_a^+ < l$ viene superavvolto, a estensione costante e $F < 0.2\,pN$, di $n = 150$ ($\sigma = 0.031$) giri (con energia torsionale T_{AA+}), la molecola raggiunge quindi lo stato A^+, (vedi fig 3.5); quindi la si estende (compiendo un lavoro W_{A+B+}), a superavvolgimento costante ($\sigma = 0.031$), si eliminano così i plectonemi, e la molecola raggiunge lo stato B^+ ($F = 4pN$). Alternativamente, lo stato B^+ può essere raggiunto tirando prima la molecola (compiendo un lavoro W_{AB}) a superavvolgimento nullo; la molecola raggiunge così lo stato B, e poi girando la molecola fino allo stato B^+

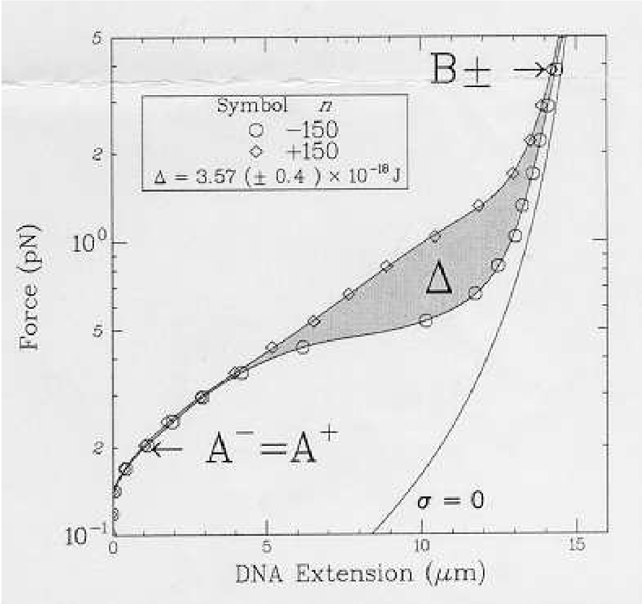

Figura 3.6: Differenza dei lavori fatti quando si tira una molecola di DNA superavvolta positivamente o negativamente. Da [Str 99d].

($\sigma = 0.031$) (a costo energetico T_{BB}). Per la conservazione dell'energia si ha

$$T_{AA+} + W_{A+B+} = W_{AB} + T_{BB^+} \tag{3.6}$$

L'energia torsionale $T_{BB^+} = \frac{C}{2l}(2\pi n)^2$ perchè a forza di tensione ($F = 4pN$) e superavvolgimento ($\sigma = 0.031 < \sigma_{c+}$) tutta l'energia torsionale viene accumulata nel twist della molecola. L'equazione (3.6) si riscrive

$$T_{AA+} = \frac{C}{2l}(2\pi n)^2 - \Delta W_{AB+} \tag{3.7}$$

dove $\Delta W_{AB+} = W_{A+B+} - W_{AB}$ è l'area mostrata in figura 3.5. Rifacendo lo stesso esperimento per un superavvolgimento di $n = -150$ giri si ottiene analogamente

$$T_{AA-} = T_{BB-} - \Delta W_{AB-} \tag{3.8}$$

Però questa volta a forza ($F = 4pN$) e ($\sigma = -0.031$) siamo in regime critico di coesistenza tra il DNA B ed il DNA d, quindi un'energia torsionale pari a $E_d = 2\pi(n - n_c)\Gamma_c$ sarà utilizzata nell'apertura delle bolle di denaturazione. (Vedi espressione dell' energia di torsione (3.11), nella fase di coesistenza la coppia rimane costante $\Gamma = \Gamma_c$: vedi figura 3.4). Quindi

$$T_{BB-} = \frac{C}{2l}(2\pi n_c)^2 + 2\pi(n - n_c)\Gamma_c \tag{3.9}$$

Ma ipotizzando la validità della risposta lineare, che discuteremo in modo più approfondito nel paragrafo (3.5.3), $\Gamma_c = \frac{C}{l}\,2\pi\, n_c$. Si ottiene dunque $T_{BB-} = \frac{C}{2l}(2\pi)^2\,(2n\, n_c - n_c^2)$. Poiché a $F < 0.2pN$ le curve di estensione superavvolgimento sono simmetriche per superavvolgimenti positivi o negativi si ha inoltre $T_{AA-} = T_{AA+}$, uguagliando l' espressione 3.8 (avendo sostituito T_{BB-} con l'espressione 3.9) con 3.7 si ottiene

$$\Delta = \frac{C}{2l}(2\pi)^2(n - n_c)^2 \tag{3.10}$$

dove $\Delta = \Delta W_{AB+} - \Delta W_{AB-}$ è l'area mostrata in figura fig 3.6.

Il grafico della radice quadrata di Δ in funzione di n è fittato da una retta la cui pendenza fornisce il valore di $C/k_bT = 86 \pm 10nm$, dall'intercetta con l'asse n si ottiene $n_c = 66$ da cui il valore del superavvolgimento critico $\sigma_c = -0.0142 \pm 5\,10^{-4}$ (la lunghezza non è conosciuta precisamente $l = 15.8 \pm 0.5\mu m$) e della coppia di torsione critica è $\Gamma_c \simeq -2.3 \pm 0.4\ k_BT$, mentre quella dell'energia libera per coppia di basi è $e_d = E_d/10.4(n - n_c) = 2\pi\,\Gamma_c/10.4 \simeq 1.3 \pm 0.2 k_BT$. [Str 99d]

3.3 Energia libera e proprietà termodinamiche del modello

In questa terza sezione del capitolo verrà effettuato, tramite il metodo dell'integrale di trasferimento, il calcolo dell'energia libera e delle proprietà termodinamiche del modello. I due parametri esterni di controllo sono la temperatura e la coppia di torsione, che verrà introdotta tramite un termine aggiuntivo all'energia potenziale del sistema. I risultati a coppia nulla sono in relazione con gli esperimenti della prima sezione sulle proprietà di equilibrio e la denaturazione termica del DNA, mentre i risultati a coppia non nulla sono in relazione con l'esperimento descritto nella seconda sezione sulla denaturazione meccanica del DNA. Anche se nell' esperimento il parametro di controllo diretto del sistema è il superavvolgimento mentre nel nostro calcolo esso è la coppia di torsione, i due parametri, come vedremo, sono termodinamicamente coniugati e la regione di coesistenza DNA B-DNA d sarà naturalmente descritta dal grado superavvlgimento.

Per introdurre una coppia di torsione esterna, basta aggiungere all'energia potenziale del sistema, introdotta in (2.0.1), il termine

$$V_\Gamma(\theta_n) = -\Gamma\,\theta_n \tag{3.11}$$

per ciascuna coppia di basi. Tale potenziale tende ad aumentare l'angolo di twist tra due coppie di basi se Γ è positivo e a diminuirlo se Γ è negativo; esso è equivalente ad una coppia applicata sull'ultima estremità, se la prima estremità è tenuta fissa: nel sistema di riferimento con l'asse x lungo il raggio della prima coppia di basi $\varphi_1 = 0$ e $\sum_n \theta_n = \varphi_N$.

3.3.1 Calcolo della funzione di partizione con il metodo dell'integrale di trasferimento

Dall'energia potenziale

$$\sum_n V_n(r_n, r_{n-1}, \theta_n) = \sum_{n=2}^{N} ((V_m(r_n) + V_m(r_{n-1}))/2 + V_s(r_n, r_{n-1}) + V_b(r_n, r_{n-1}, \theta_n) + V_\Gamma(\theta_n)) \tag{3.12}$$

La funzione di partizione del sistema si scrive:

$$\begin{aligned} Z_\Gamma &= \int d\Omega \, e^{-\beta(\sum_n V_n(r_n, r_{n-1}, \varphi_n - \varphi_{n-1}))} \int_{-\infty}^{\infty} dP_1 \ldots dP_N \, d\tilde{P}_1 \ldots d\tilde{P}_N e^{-\beta \sum_n \left(\frac{P_n^2}{4m} + \frac{\tilde{P}_n^2}{4mr_n^2}\right)} \\ &= (4\pi m k_B T)^N \int d\Omega \prod_n r_n \, e^{-\beta(\sum_n V_n(r_n, r_{n-1}, \varphi_n - \varphi_{n-1}))}. \end{aligned} \tag{3.13}$$

Le variabili $\{P_i\}$ sono i momenti radiali della quantità di moto, mentre le $\{\tilde{P}_i\}$ sono i momenti angolari della quantità di moto. Il prefattore moltiplicativo che risulta dall'integrazione su queste variabili è una costante addittiva all'energia libera e verrà d'ora in poi tralasciato. $d\Omega$ è il volume di integrazione:

$$\int d\Omega = \int_0^\infty dr_1 \ldots dr_N \int_{-\infty}^{\infty} d\varphi_1 \ldots d\varphi_N \, \delta(r_1 - R) \, \delta(r_N - R) \, \delta(\varphi_1) \prod_n (\chi(\varphi_n - \varphi_{n-1})) \tag{3.14}$$

In tale volume di integrazione si impone la condizione che l' angolo di *twist* sia positivo, in modo da ottenere un'elica destrogira: $\chi(\varphi_n - \varphi_{n-1})$ è una funzione non nulla e pari ad uno solo se l'argomento è compreso tra 0 e π. Le condizioni ai bordi sono inoltre fissate in modo tale che la prima estremità, che corrisponde all'estremità attaccata alla superficie di vetro dell'esperimento, sia fissa $r_1 = R$,$\varphi_1 = 0$, mentre l'ultima estremità, che corrisponde a quella attaccata alla biglia che si fa ruotare, sia fissa nel raggio $r_N = R$ ma libera di ruotare per potergli imporre una coppia di torsione. Dunque la funzione di partizione si legge:

$$\begin{aligned} Z_\Gamma &= \int_0^\infty dr_1 \ldots dr_N \int_{-\infty}^{\infty} d\varphi_1 \ldots d\varphi_N \, \delta(r_1 - R) \, \delta(r_N - R) \, \delta(\varphi_1) \times \\ & \prod_n (\chi(\varphi_n - \varphi_{n-1}) \, r_n \, \exp\{-\beta(V_n(r_n, r_{n-1}, \varphi_n - \varphi_{n-1}))\}) \end{aligned} \tag{3.15}$$

Ovvero, usando il formalismo dell'integrale di trasferimento (vedi Appendice B1),

$$Z_\Gamma = \int_{-\infty}^{\infty} d\varphi_N \, \langle R, \varphi_N | T^N | R, 0 \rangle \tag{3.16}$$

Dove gli elementi dell'operatore di trasferimento sono:

$$< r, \varphi | T | r', \varphi' > \equiv X(r, r') \, \exp\{-\beta(V_b(r, r', \theta) + V_\Gamma(\theta))\} \, \chi(\theta) \tag{3.17}$$

con

$$X(r,r') = \sqrt{rr'}\exp\{-\beta(V_m(r)/2 + V_m(r')/2 + V_s(r,r'))\} \tag{3.18}$$

Poiché la matrice di trasferimento dipende, nelle variabili angolari, solo dalla differenza $\theta = \varphi - \varphi'$ gli autovalori della matrice di trasferimento, ad r, r' fissi, sono i modi di Fourier $e^{-ik\varphi}$ infatti

$$\begin{aligned} &\textstyle\int_{-\infty}^{\infty} d\varphi'\, e^{-\beta(V_b(r,r',\varphi-\varphi')+V_\Gamma(\varphi-\varphi'))}\, \chi(\varphi-\varphi')\, e^{-iK\varphi'} \\ &\qquad = e^{-iK\varphi}\, Y_k(r,r') \end{aligned} \tag{3.19}$$

i cui autovalori sono dunque semplicemente gli integrali

$$Y_k(r,r') = \int_0^{\pi} d\theta\, e^{-\beta(V_b(r,r',\theta)+V_\Gamma(\theta))}\, e^{ik\theta} \quad . \tag{3.20}$$

Dunque per ogni modo di Fourier k bisogna diagonalizzare una matrice di trasferimento effettiva i cui indici sono solo le variabili radiali:

$$T_k(r,r') = X(r,r')\, Y_k(r,r') \tag{3.21}$$

Trovati gli autovalori e autostati di essa, tali che

$$\hat{T}_k\, |\psi_{k,q}\rangle = \lambda_{k,q}\, |\psi_{k,q}\rangle \tag{3.22}$$

le autofunzioni complessive della matrice di trasferimento si scrivono $\Psi_{k,q}(r) = e^{-ik\varphi}\,\psi_{k,q}(r)$, e i corrispondenti autovalori sono $\lambda_{k,q}$. La condizione di estremo libero sull'angolo φ_N fa sí che solo il modo $k=0$ contribuisca nella funzione di partizione. Infatti inserendo l'operatore identità espresso nella base degli autostati di T nella funzione di partizione si ottiene

$$Z_\Gamma = \int_{-\infty}^{\infty} d\varphi_N\, \langle R, \varphi_N | T^N | \int dk\, dq\, |\Psi_{k,q}\rangle\, \langle \Psi_{k,q} | R, 0\rangle \tag{3.23}$$

poichè $\langle R, \varphi_N | \Psi_{k,q}\rangle = e^{-ik\varphi_N}\psi_{k,q}(R)$ e analogamente $\langle \Psi_{k,q} | R, 0\rangle = \psi^*_{k,q}(R)$ si ottiene

$$\int dk\, dq\, |\psi_{k,q}(R)|^2\, \lambda^N_{k,q} \int d\varphi_N\, e^{-ik\varphi_N} = \int dq\, |\psi_{k=0,q}(R)|^2\, \lambda^N_{k=0,q} \tag{3.24}$$

Poichè, come vedremo meglio in seguito, ci sono autostati legati e autostati non legati, q è un indice che può essere discreto o continuo. D'ora in avanti porremo $\psi_{k=0,q} = \psi^{\Gamma,T}_q$ e gli autovalori della matrice T_0 saranno indicati con $\lambda_{k=0,q} = \lambda^{\Gamma,T}_q$, con $\lambda^{\Gamma,T}_q$ funzione decrescente di q ($\lambda_0 > \lambda_1 > \lambda_2 \ldots$).

Energia libera

L'energia libera del sistema nel limite $N \to \infty$ è dominata dall'autovalore più grande λ_0 (vedi Appendice B.1) inoltre non dipende dalle condizioni al contorno su r_1 ed r_N infatti il termine $|\psi_{k=0,q}(R)|^2$ non esponenziale in N è trascurabile. Dunque

$$f^{\Gamma,T} = -k_B T\, \ln \lambda_0^{\Gamma,T} \tag{3.25}$$

Valore medio del raggio di una coppia di basi

Per ricavare il valore medio del raggio di una coppia di basi basta conoscere $\psi_0^{\Gamma,T}$ infatti

$$\langle r\rangle^{\Gamma,T} = \frac{1}{\lambda_0^N}\int dr\ \langle r|T_0^N|r\rangle\ r = \\ \frac{1}{\lambda_0^N}\int dr\ r\ \langle r|T_0^N|\int dq\ |\psi_q\rangle\ \langle\psi_q|r\rangle =_{N\to\infty}\ \int dr\ r\ |\psi_0^{\Gamma,T}(r)|^2 \tag{3.26}$$

Percentuale di basi aperte

Analogamente la percentuale di basi aperte è semplicemente

$$P^{\Gamma,T} = \int_{r_d}^{\infty} dr\ |\psi_0^{(\Gamma,T)}(r)|^2 \tag{3.27}$$

Tutte le coppie di basi con $r > r_d = r + 6/a$ sono considerate aperte.

Valore medio dell'angolo di twist

L'espressione per l'angolo medio di twist (vedi Appendice B.2) è la seguente:

$$\langle\theta\rangle^{\Gamma,T} = \frac{1}{\lambda_0^{\Gamma,T}}\ \int drdr'\psi_0^{\Gamma,T}(r)\psi_0^{\Gamma,T}(r')\ X(r,r')\ Y'(r,r') \tag{3.28}$$

dove

$$Y'(r,r') = \int_0^{\pi} d\theta\ e^{-\beta(V_b\,(r,r',\theta)+V_\Gamma(\theta))}\ \theta \quad . \tag{3.29}$$

Valore medio della distanza assiale

Analogamente all'angolo medio di twist il valor medio della distanza assiale si esprime:

$$\langle h\rangle^{\Gamma,T} = \frac{1}{\lambda_0^{\Gamma,T}}\ \int drdr'\psi_0^{\Gamma,T}(r)\psi_0^{\Gamma,T}(r')\ X(r,r')\ Y_h(r,r') \tag{3.30}$$

dove

$$Y_h(r,r') = \int_0^{\pi} d\theta\ e^{-\beta(V_b\,(r,r',\theta)+V_\Gamma(\theta))}\ h\,(r,r',\theta) \quad . \tag{3.31}$$

La distanza assiale $h(r,r',\theta)$ è stato definita in (2.2).

3.3.2 Energia libera a superavvolgimento fisso

La funzione di partizione di un sistema in cui si fissa il numero di giri della doppia elica a Nl è differente dalla (3.16) perché dall'esterno è controllato il superavvolgimento e non più la coppia di torsione. Per imporre il superavvolgimento basta fissare l'ultimo angolo a $\varphi_N = 2\pi N\,l$ e la funzione di partizione si scrive:

$$Z_l = \langle R, 2\pi\,N\,l|\tilde{T}^N|R,0\rangle \tag{3.32}$$

dove $\tilde{T} = T^{\Gamma=0}$ quindi

$$\tilde{Y}_k(r,r') = \int_0^\pi d\theta \; e^{-\beta(V_b\,(r,r',\theta))} \; e^{ik\theta} \quad . \tag{3.33}$$

A differenza della (3.24) il modo di Fourier dominante non è quello a $k = 0$ perché l'ultimo angolo è fisso:

$$Z_l = \int dk\, dq \; |\Psi_{k,q}(R)|^2 \; e^{-ik2\pi\, l\, N} \; \lambda_{k,q}^N \tag{3.34}$$

Dunque per ogni valore di k la funzione di partizione è dominata dall'autovalore più grande sui modi q, $\lambda_{k,0}$ e l'integrale

$$\int dk \; |\Psi_{k,0}(R)|^2 \; e^{N\left(-ik2\pi\, l + \ln \lambda_{k,0}\right)} \tag{3.35}$$

è dominato dal punto di sella della funzione ad esponente [Sve 84]. L'integrazione è su tutto il piano complesso. Si puó dimostrare (vedi Appendice B.3) che il punto di sella

$$\frac{1}{\lambda_{k,0}} \frac{\partial}{\partial k} \lambda_{k,0} - i\, 2\pi\, l = 0 \tag{3.36}$$

è per un valore di $k = k_0$ immaginario puro ed è un massimo della funzione lungo l'asse reale ed un minimo della funzione lungo l'asse immaginario. Per trovare il punto di sella si possono calcolare numericamente i valori della funzione lungo l'asse immaginario e trovare il suo minimo ad esempio con il metodo delle dicotomie. L'energia libera è dunque

$$f^{l,T} = -k_B T (\ln \lambda_{k_0 0} - i\, k_0\, 2\pi l) \tag{3.37}$$

Significato dell'equazione di punto di sella

L'equazione di punto di sella (3.36) fissa l'angolo medio di twist a

$$\langle\theta\rangle = 2\pi l \tag{3.38}$$

infatti

$$\lambda_{k0} = \langle \psi_{k0} | T_k | \psi_{k0} \rangle \tag{3.39}$$

ed, essendo T_k simmetrico,

$$\begin{aligned} \frac{\partial \lambda_{k0}}{\partial k} &= \langle \psi_{k0} | \frac{\partial T_k}{\partial k} | \psi_{k0} \rangle \\ &= \langle \psi_{k0} | X(r,r') \frac{\partial \tilde{Y}_k}{\partial k} | \psi_{k0} \rangle = i\, \lambda_{k0}\, \langle\theta\rangle \end{aligned} \tag{3.40}$$

Come si ottiene derivando la (3.33) e considerando che la formula per $\langle\theta\rangle$ ànaloga alla (3.28).

L'energia libera a twist fisso è la trasformata di legendre di quella a coppia fissa

Dall'equazione di punto di sella (3.36,3.38) e dal confronto tra Y_0 vedi (3.20) e $\tilde{Y}_{k_0}$ (3.33) si ricava la corrispondenza tra coppia di torsione ed angolo medio di twist

$$\Gamma(\langle\theta\rangle = 2\pi l) = i\, k_B T\; k_0 \tag{3.41}$$

Inoltre, analogamente a quanto mostrato nella (3.40) si trova, utilizzando la (3.20), che il parametro termodinamico coniugato alla coppia di torsione Γ è il valore medio dell'angolo di twist,

$$\frac{\partial f^{\Gamma,T}}{\partial \Gamma} = -\langle\theta\rangle \tag{3.42}$$

La trasformata di Legendre dell'energia libera $f^{\Gamma,T}$ rispetto a Γ è quindi $f^{l,T}$

$$f^{\Gamma,T}\left(\Gamma\left(2\pi l\right)\right) - \frac{\partial f^{\Gamma,T}}{\partial \Gamma}\,\Gamma\left(2\pi l\right) \;=\; f\left(\Gamma = i\, k_B T\, k_0\right) + 2i\,\pi l\, k_B T\; k_0 \;\equiv f^{l,T} \tag{3.43}$$

3.3.3 Metodi numerici

Gli autovettori $\psi_0^{\Gamma,T}$,$\psi_1^{\Gamma,T}$ $\psi_2^{\Gamma,T}$della matrice di trasferimento T_0 (3.21) con autovalori $\lambda_0 > \lambda_1 > \lambda_2$ si ricavano numericamente tramite il metodo di Kellog (vedi Appendice B.4). Per l'integrazione numerica è stato utilizzato il metodo di quadratura di Gauss Legendre [Pre 86], per un intervallo di integrazione tipico: 9.7Å $<\ r\ <$ 150Å , si prendono 800 punti sulle due variabili. La precisione sulla determinazione degli autovettori é 10^{-7}. Il numero di punti necessario perché l'integrale sia corretto è piuttosto elevato a causa della divergenza del potenziale V_b definito in 2.6. Il potenziale di Morse cresce esponenzialmente con la decrescita di $r < R$, per cui puó essere considerato infinito per $r < 9.7$ (fig 2.2). Le autofunzioni e gli autovalori, di conseguenza, non variano se si sceglie un limite inferiore più piccolo. Le scelta del limite superiore r_{max} è invece più delicata e dipende dalla coppia di torsione; la procedura di estrapolazione del $\lim r_{max} \to \infty$ verrà discussa nei casi particolari.

3.3.4 Processi di Markov e descrizione della fase denaturata

Per valori dei raggi superiori a 20Å l'operatore di trasferimento

$$T_0(r,r') \equiv T^d(r,r') \simeq\; \sqrt{rr'}\, e^{-\beta D}\, Y_0(r,r') \tag{3.44}$$

descrive correttamente un singolo filamento che si diffonde per un processo puramente entropico.

Un singolo filamento può essere descritto da un processo di Markov doppio

Immaginiamo di descrivere un singolo filamento come una serie di bastoncini rigidi legati tra loro, ciascuno di lunghezza L e con un orientamento qualsiasi, nello spazio tridimensionale, rispetto al precedente. La probabilità che la base numero n lungo il filamento sia a distanza

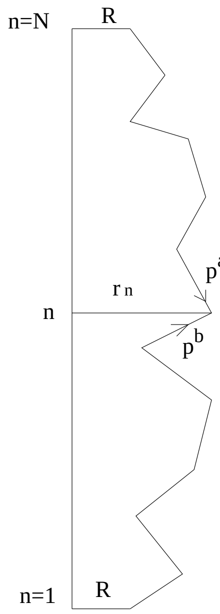

Figura 3.7: Rappresentazione schematica del processo di Markov doppio che descrive un singolo filamento.

r rispetto ad un asse di riferimento può essere descritta come un processo di Markov doppio :

$$\mathcal{P}(r,n) = \frac{1}{P^b(R,N)}\ P^b(r,n)\ \times\ P^a(r,N-n). \tag{3.45}$$

Dove $P^b(r,n)$ è la probabilità che un cammino di n passi a partire dalla prima base abbia portato ad una distanza assiale r (vedi figura 3.7). La normalizzazione è data dalla probabilità che un cammino in N passi dalla prima base porti all'ultima base a raggio $r_N = R$.

$P^b(r,n)$ soddisfa l'equazione di ricorrenza

$$P^b(r,n) = \int dr' \rho(r|r')\ P^b(r', n-1). \tag{3.46}$$

$\rho(r|r')$è la probabilità di andare da r' in r in un passo cioè di mettere, nello spazio tridimensionale, la seconda estremità di un bastoncino rigido di lunghezza L in r se la prima è in r' . $P^a(r, N-n)$ è la probabilità che un cammino di $N-n$ passi a partire dall'ultima base abbia portato alla stessa distanza assiale r, l'equazione di ricorrenza per essa è la stessa della (3.46) con $P^a(r', N-n+1)$ al posto di $P^b(r', n-1)$. Nel limite asintotico $n \to \infty, N-n \to \infty$ le densità di probabilità tendono alla distribuzione stazionaria $\lim_{n\to\infty,\, N-n\to\infty}\ P^b(r,n) \equiv P^a(r,N-n) = P(r)$ che soddisfa l'equazione

$$P(r) = \int \rho(r|r')\ P(r')dr' \tag{3.47}$$

Con il formalismo della matrice di trasferimento si ottiene in modo del tutto equivalente

$$P(r_n) = \frac{1}{\langle R|\tilde{T}_k^N|R\rangle} \langle R|\tilde{T}_k^{N-n}|r_n\rangle \times \langle r_n|\tilde{T}_k^n|R\rangle \tag{3.48}$$

e

$$\lim_{n\to\infty,\, N-n\to\infty} P(r_n) = \frac{1}{\lambda_0^N\, |\psi_0(R)|^2}\, \psi_0(R)\, \lambda_0^{N-n}\, \psi_0^*(r_n)\, \psi_0(r_n)\, \lambda_0^n\, \psi_0(R) = |\psi_0(r_n)|^2 \tag{3.49}$$

dunque $P(r)$ e $\psi(r)$ hanno lo stesso significato e $\psi_d(r)$ diventa equivalenti a $P(r)$ se, come si vede comparando l'equazione agli autovalori (3.22) alla (3.47), si verifica l' uguaglianza $T^d(r, r')/\lambda^d = \rho(r|r')$.

Similarità di $\rho(r|r')$ e $T_d(r, r')$

In questa sottosezione dimostreremo l'equivalenza tra la probabilitá condizionata di essere in r dato r' : $\rho(r|r')$ che si ottiene in un processo Markoviano doppio in tre dimensioni e l'operatore di trasferimento del nostro modello per valori radiali sufficientemente grandi: $T_d(r, r')$.

La probabilità $\rho(r|r')$ si scrive (vedi la figura 3.8)

$$\rho(r|r') = \frac{1}{4\pi} \int_0^{2\pi} d\theta \int_0^{\pi} d\varphi\ \delta(r - g(\theta, \varphi, r')) \tag{3.50}$$

dove

$$g(\theta, \varphi, r') = \sqrt{r'^2 + L^2 \sin^2\varphi + 2\, L\, r' \sin\theta \sin\varphi} \tag{3.51}$$

integrando su θ e facendo il cambiamento di variabili $x = \cos\varphi$ l'integrale si riscrive

$$\rho(r|r') = \frac{2}{\pi} \int_0^1 \frac{dx}{\sqrt{h(x)}}\, \chi(h(x)) \tag{3.52}$$

dove

$$h(x) = \frac{4r'^2\, L^2}{r^2}\,(1 - x^2) - \left(r - \frac{r'^2}{r} - \frac{L^2}{r}(1 - x^2)\right)^2 \tag{3.53}$$

$\chi(h(x)) = 1$ se $h(x) \geq 0$ altrimenti è nullo.

Si puó verificare analiticamente che

$$\lim_{r'\to\infty} \rho(r' + \Delta|r') = \frac{1}{\pi L} \int_0^{\sqrt{1-(\Delta/L)^2}} \frac{dx}{\sqrt{1 - x^2 - (\Delta/L)^2}} = \begin{cases} \frac{1}{2L} \text{ se } -L < \Delta < L \\ 0 \text{ altrimenti} \end{cases} \tag{3.54}$$

In figura 3.9 l'andamento di $\ln\rho(r|r')$, ottenuto numericamente, è paragonato al $\ln T^d(r, r')$. Si ottiene

$$-\ln\rho(r|r') \simeq -lnT^d(r, r') - f_d/k_B T \tag{3.55}$$

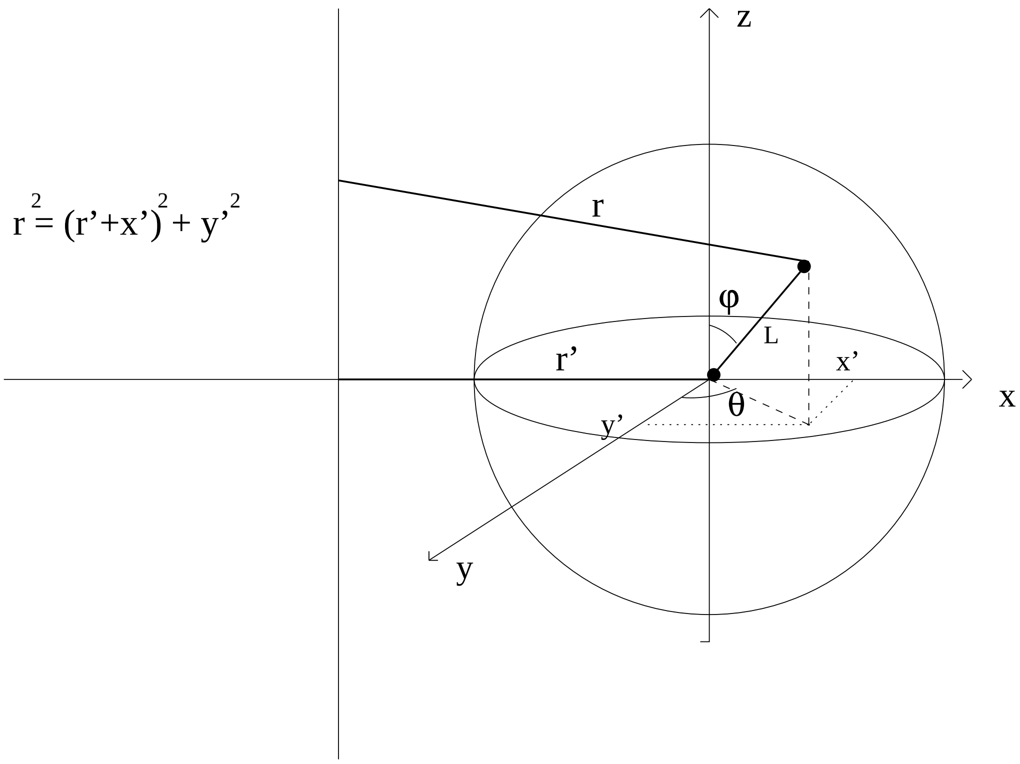

Figura 3.8: Dato r', l'estremità del bastoncino si trova, con probabilità uniforme, sulla sfera di raggio L con centro in r'. Per ogni punto sulla sfera, la distanza r dall'asse di riferimento è data dalla distanza dall'asse della proiezione del punto sulla sfera nel piano x, y. In coordinate sferiche $x' = L \sin\varphi \sin\theta$, $y' = L \sin\varphi \cos\theta$.

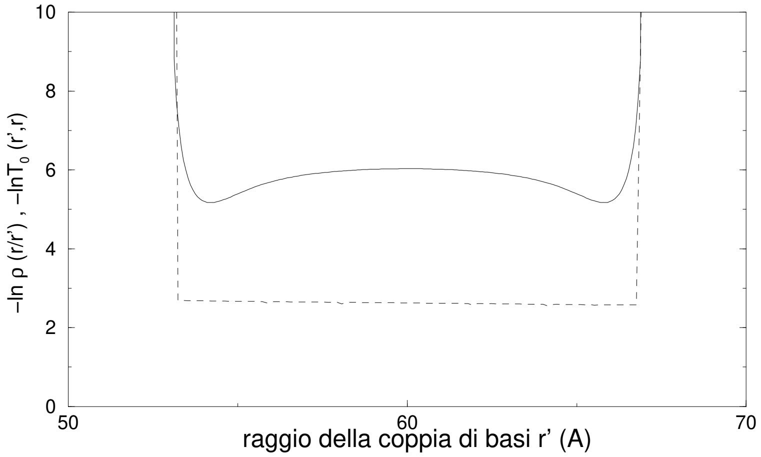

Figura 3.9: $-\ln T^d(r,r')$(linea piena) mostra un andamento simile a quanto si ottiene per un processo markoviano doppio in tre dimensioni: $-\ln \rho(r|r')$ (linea tratteggiata) (la differenza in altezza è pari a $f_d = 3.1k_BT$). Esso puó quindi descrivere correttamente la fase denaturata. Si ottengono curve similari per ogni valore di $r > r_d$.

Dalla somiglianza tra i due andamenti, indipendente dal valore del raggio r', si deduce dunque che il potenziale effettivo, per valori radiali sufficientemente grandi, descrive correttamente la fase denaturata come un processo markoviano doppio. La piattezza di $T^d(r,r')$ deriva dall'espressione di $V_b(r,r',\theta)$ (vedi le curve piene di figura 2.5) : se il vincolo rigido di lunghezza L è rispettato, esiste sempre un angolo di twist $\theta^*(\to 0)$, per il quale $V_b(r,r',\theta^*) = 0$, che fornisce il contributo principale all'integrale in $Y_0(r,r')$ (3.21).

3.3.5 Le autofunzioni dell'operatore di trasferimento corrispondono a funzioni d'onda in meccanica quantistica

L'integrale di trasferimento corrisponde ad un integrale di cammino discretizzato. Infatti l'indice della coppia di basi n ha la funzione del tempo lungo il quale il sistema evolve; però a differenza di quest' ultimo esso varia in modo discreto. Come mostriamo nel prossimo paragrafo l'operatore di trasferimento può essere riscritto mediante un' approssimazione nel limite continuo in cui la distanza assiale tende a zero. Questo permette di riportare la diagonalizzazione dell'operatore di trasferimento ad un problema di Schrödinger in meccanica quantistica:

$$\left(-\frac{(k_BT)^2}{4(E(r)+C(r))}\frac{\partial^2}{\partial r^2} + V(r)\right)\psi(r) = f\psi(r) \tag{3.56}$$

le autofunzioni di T_0, $\psi_q(r)$ corrispondono dunque alle funzioni d'onda $\psi(r)$ che rappresentano gli autostati della densità di probabilità per una particella quantistica (dove la costante di Planck h é sostituita da k_BT), di massa variabile e pari a $2(E(r)+C(r))$, che si muove nel tempo n sotto il potenziale unidimensionale $V(r) = V_m(r) + \frac{k_BT}{2}\ln(E(r)+C(r))$

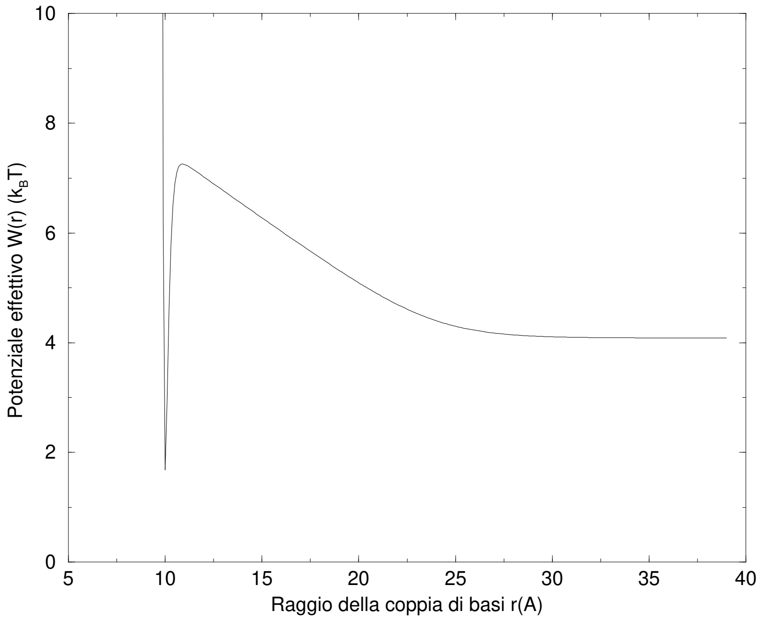

Figura 3.10: Potenziale effettivo per l'equazione di Schrödinger ottenuta nel limite continuo $C = 0.03 k_B T/\text{Å}^2$, $E = 0.75 eV/\text{Å}^2$, $D = 0.15 eV$.

rappresentato per coppia nulla in figura 3.10 (linea piena). Nell'espressione per il valor medio del raggio 3.26 o della probabilità di avere una coppia di basi aperta 3.27, l' autofunzione $\psi_0(r)$ rappresenta infatti chiaramente la densità di probabilità di avere un valore r per il raggio di una coppia di basi. Gli autovalori dell'operatore di trasferimento λ_q corrispondono ad i livelli di energia f attraverso $f = -k_B T \log(\lambda_q)$.

3.3.6 Dall'integrale di trasferimento all'equazione di Schrödinger

In questo paragrafo mostreremo come si deriva l'equazione di Schrödinger (3.56) a partire dall'integrale di trasferimento. L'operatore di trasferimento (3.21) si scirve

$$T_0 = \exp -\beta \left(E(r)(r - r')^2 + V_m(r) - \frac{1}{\beta} \ln(r\, Y(r, r')) \right) \tag{3.57}$$

Dove $E(r) = E e^{-b(r-R)}$. $Y(r, r')$ è il potenziale che caratterizza la fase denaturata, infatti per valori grandi del raggio r il termine in $E(r)$ è nullo ed il potenziale di Morse $V_m(r)$ è costante e pari a D. Il potenziale di scheletro limita i valori di $|r - r'| < 7$ Å, dunque possiamo sviluppare $\ln(r\, Y(r, r'))$ intorno ad $r = r'$:

$$-\ln(r\, Y(r, r')) \simeq -\ln(r\, Y(r, r)) + \beta\, C(r)\, (r - r')^2. \tag{3.58}$$

Il primo termine dà il potenziale di sito della fase denaturata, mentre il secondo lega la posizione di una base con quella della vicina. Ci aspettiamo che $C(r) = C \ll E$ riproduca la condizione di vincolo rigido, cioé la lunghezza di persistenza sperimentale di 7 Å di un singolo filamento. La valore di C verrà stabilito alla fine del paragrafo. Per il primo termine della 3.58 si ha

$$Y(r,r) = \int_0^\pi d\theta \, \exp\beta \left[\Gamma\theta - K(\sqrt{L^2 - 2\,r^2(1-\cos\theta)} - H)^2\right] \tag{3.59}$$

$$= \int_0^\pi d\theta \, \exp\beta \left[\Gamma\theta - K(\sqrt{L^2 - (r\,\theta)^2} - H)^2\right] = \tag{3.60}$$

$$\tag{3.61}$$

$$= \int_0^L \frac{dx}{r} \exp\beta \left[\Gamma x/r - K(\sqrt{L^2 - x^2} - H)^2\right] \tag{3.62}$$

da cui si ottiene

$$-\ln(r\,Y(r,r)) \simeq -\frac{\beta\Gamma}{r} C_2 + C_1 \tag{3.63}$$

La forma delle funzioni d'onda dello stato denaturato fig 3.17 rispecchia l'andamento della (3.63). L'assenza di un potenziale di sito a coppia di torsione nulla porta ad una semplice diffusione nello spazio per il singolo filamento. Il termine di sito indotto dalla coppia di torsione sposta viceversa il massimo della funzione d'onda dello stato denaturato su valori maggiori o miniro della metà dell'intervallo nel raggio, per coppie rispettivamente negetive e positive. Restringiamoci al caso di coppia nulla, in cui la costante C_1 dà un termine additivo all'energia libera che può essere dunque trascurato.

L'operatore di trasferimento può essere riscritto introducendo il parametro $\delta \to 0$ nel limite continuo in cui la distanza assiale H tende a zero. L'equazione integrale agli autovalori per T_0 si scrive in questo limite:

$$\exp\, -\beta\frac{\delta}{H}\left(V_m(r) + \frac{k_B\,T}{2}\ln\frac{2\,H\,\beta(E(r)+C)}{2\delta\,\pi}\right)\sqrt{\frac{\beta H(E(r)+C)}{\pi\delta}} \times$$
$$\int \exp\left(-\frac{\beta(E(r)+C)H}{\delta}\,(r-r')^2\right)\,\psi(r')\,dr' = \exp\left(-\beta\frac{\delta}{H}f\right)\psi(r) \tag{3.64}$$

poichè la gaussiana all'esponenziale concentra i valori di r' che contribuiscono all'integrale attorno ad r possiamo sviluppare la funzione d'onda $\psi(r + z\sqrt{\delta})$ intorno ad r $(z = (r-r')/\sqrt{\delta})$ e riscrivere l'equazione (3.64) tralasciando nuovamente le costanti additive all'energia libera

$$\left(1 - \beta\frac{\delta}{H}\left(V_m(r) + \frac{k_B\,T}{2}\ln\frac{H\,\beta(E(r)+C)}{\delta\,\pi}\right)\right) \times$$
$$\sqrt{\frac{2\beta H(E(r)+C)}{2\pi}}\int dz\,\exp\left(-\beta\,H(E(r)+C)\,z^2\right)\left[\psi(r) + \frac{\delta z^2}{2}\frac{\partial^2}{\partial r^2}\psi(r) + O(\delta^2)\right] =$$
$$(1 - \beta\frac{\delta}{H}f)\psi(r) \tag{3.65}$$

Da cui l'equazione di Schrödinger che ponendo $H = \delta$ si scrive

$$\left(V_m(r) + \frac{k_B T}{2} \ln \frac{\beta(E(r)+C)}{\pi} - \frac{(k_B T)^2}{4(E(r)+C)} \frac{\partial^2}{\partial r^2}\right) \psi(r) = f \psi(r) \tag{3.66}$$

Discutiamo ora come determinare il valore della costante C nel nostro sistema di riferimento dove la posizione delle basi è definita dalla distanza da un asse verticale. Consideriamo il processo Markoviano introdotto in (3.3.4) per descrivere un singolo filamento. Nel limite di grandi valori del raggio l'operatore di trasferimento $\rho(r|r')$ è uniforme e pari ad $1/2L$ se $r - r'$ é compreso tra 0 ed L, ed é nullo altrimenti. Esso può essere dunque diagonalizzato per trasformata di Fourier:

$$\tilde{\rho}(k) = \int dr\, \rho(r)\, e^{ikr} = \int_{-L}^{L} dr\, e^{ikr} = \sin(k\,L)/k\,L \tag{3.67}$$

$$= 1 - \frac{L^2}{6} k^2 + O(k^4) \simeq e^{-\frac{L^2}{6}k^2} \equiv e^{-\beta\mathcal{H}} \tag{3.68}$$

ci interessa il limite di piccoli numeri d'onda infatti k deve essere piccolo davanti ad $1/L$ perché il passaggio al continuo sia sensato. L'operatore $\mathcal{H}$ nella base k è diagonale e definito da

$$\langle v_k' | \mathcal{H} | v_k \rangle = \frac{L^2}{6\beta}\, \delta(k - k')\, k^2. \tag{3.69}$$

Ritornando nella base r i suoi elementi di matrice sono

$$\langle r' | \mathcal{H} | r \rangle = -\frac{L^2}{6\beta} \frac{\partial^2}{\partial r^2} \delta(r - r') = -\frac{(k_B T)^2}{4C} \frac{\partial^2}{\partial r^2} \delta(r - r'). \tag{3.70}$$

Si ricava dunque $C = 3 k_B T/(2L^2) \simeq 0.03\, k_B T/\text{Å}^2$.

In figura 3.10 è mostrato il potenziale effettivo $V_m(r) + \frac{k_B T}{2} \ln(\beta(E(r) + C))$. Come si può vedere tale potenziale è caratterizzato da una una buca molto stretta di larghezza dell'ordine di $1/a$ ed una barriera di larghezza dell'ordine di $1/b$. Il valore di C determina il punto lungo la retta $\ln E(r) = b(r - R)$ in cui l'andamento del potenziale inizia ad essere costante e dunque fissa la differenza di energia libera tra lo stato legato e quello denaturato.

3.4 Risultati a coppia di torsione nulla

3.4.1 Le funzioni d'onda rappresentano una molecola chiusa o una molecola aperta

In figura 3.11 sono rappresentate le autofunzioni $\psi_0^{\Gamma=0,T=298}$, $\psi_1^{\Gamma=0,T=298}$ $\psi_2^{\Gamma=0,T=298}$, lo stato fondamentale del sistema è localizzato nella buca del potenziale di Morse, fig 3.10 (vedi anchefig 3.12, linea piena) esso è dunque uno stato legato e rappresenta una molecola chiusa (DNA B), l'energia libera corrispondente è $f_0^{\Gamma=0,T=298} = 2.28\ k_B\ T$. Al contrario

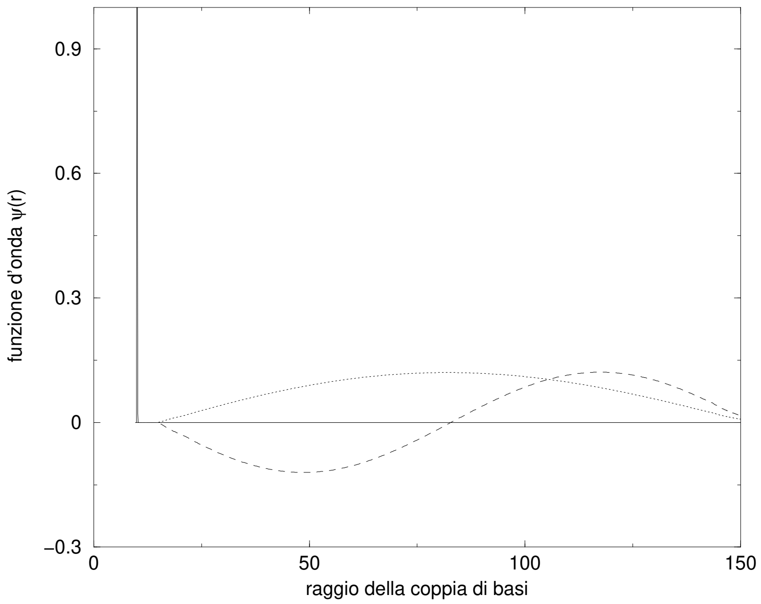

Figura 3.11: $\psi_0^{\Gamma=0,T=298}$ (linea piena) è uno stato legato nel potenziale di Morse , mentre $\psi_1^{\Gamma=0,T=298}$ (linea punteggiata) e $\psi_2^{\Gamma=0,T=298}$ (linea tratteggiata) sono stati non legati, estesi su tutto l'intervallo a disposizione e sono analoghi alle funzioni d'onda di un processo di diffusione. Le energie libere associate alle tre autofunzioni sono rispettivamente $f_0^{\Gamma=0,T=298} = 2.28 k_B T$, $f_1^{\Gamma=0,T=298} = 3.11 k_B T$, $f_2^{\Gamma=0,T=298} = 3.12 k_B T$

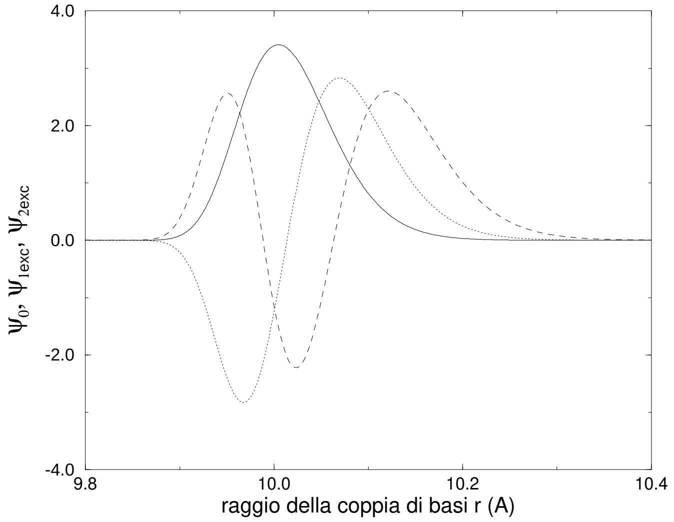

Figura 3.12: Funzione d'onda dello stato fondamentale $\psi_0^{\Gamma=0,T=298}$ (linea piena), e dei primi stati eccitati quasi legati $\psi_{1ex}^{\Gamma=0,T=298}$ (linea tratteggiata) e $\psi_{2ex}^{\Gamma=0,T=298}$ (linea punteggiata). Le energie libere associate alle tre autofunzioni sono rispettivamente $f_0^{\Gamma=0,T=298} = 2.28\ k_B\ T$, $f_{1ex}^{\Gamma=0,T=298} = 3.35\ k_B\ T$, $f_{2ex}^{\Gamma=0,T=298} = 4.33\ k_B\ T$.

i primi stati eccitati sono delocalizzati su tutto l'intervallo radiale al di là della buca di potenziale $(r > r_d)$, essi sono dunque stati non legati della diffusione, con energie libere appartenenti ad un insieme continuo quando $r_{max} \to \infty$, e rappresentano una molecola aperta (DNA d). Le energie libere sull'intervallo finito $0 < r < 150$Å sono $f_1^{\Gamma=0,T=298} = 3.11\ k_B\ T$, $f_2^{\Gamma=0,T=298} = 3.12\ k_B\ T$. A causa della barriera di potenziale di figura 3.10 lo stato fondamentale non si sovrappone numericamente con gli stati eccitati non legati.

3.4.2 Transizione di denaturazione

Temperatura di denaturazione

Lo stato legato rimane lo stato fondamentale $f_B = f_0^{\Gamma=0,T<T_m} < f_d = f_1^{\Gamma=0,T<T_m}$ fino alla temperatura di denaturazione $T_m = 77^oC$ (vedi figura 3.13). Per tale temperatura le due energie libere si incrociano, in completa analogia a quanto avviene in una transizione di fase del primo ordine. Ritorneremo, nella conclusione del capitolo, sulla discussione della presenza o meno di una transizione di fase del primo ordine in senso matematico stretto. Al di sopra di T_m lo stato legato scompare e lo stato fondamentale diventa $\psi_d \equiv \psi_1^{\Gamma=0,T<T_m}$ (rappresentato in figura 3.11 con la linea punteggiata). Alla temperatura di denaturazione T_m il valore medio dell'angolo di twist e la percentuale di basi aperte subiscono una discontinuità : il valore medio dell'angolo di twist diventa nullo, il DNA perde di conseguenza

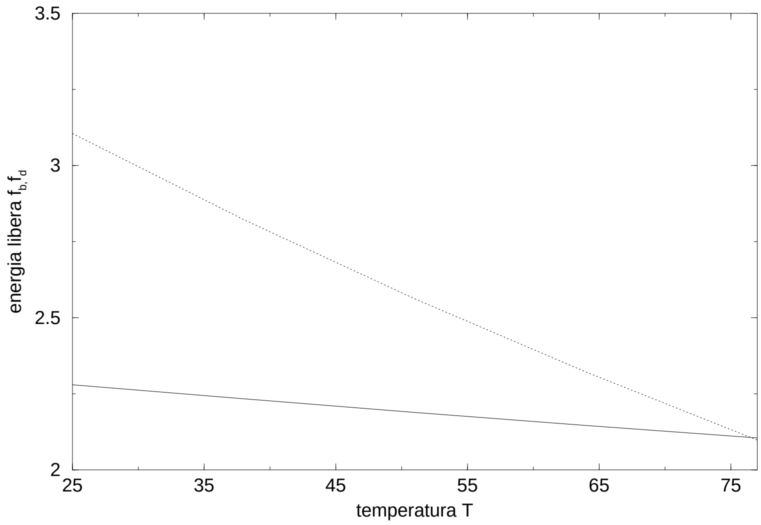

Figura 3.13: Andamento con la temperatura dell'energia libera associata allo stato legato $f_B^{\Gamma=0,T}$ (linea piena) e allo stato non legato $f_d^{\Gamma=0,T}$ (linea tratteggiata). A $T_m = 77^oC$ le due curve si incrociano e per temperature superiori lo stato legato scompare. La differenza di energia libera a temperatura ambiente fornisce l'energia libera di denaturazione: $\Delta G = 0.83k_BT$.

la sua struttura elicoidale, e la percentuale di basi aperte passa da 0 ad 1, riproducendo l'andamento delle curve sperimentali dell'assorbimento di radiazione UV in funzione della temperatura (vedi paragrafo 1.2 e figura 1.6).

Energia libera di denaturazione

Poichè il primo stato eccitato al di sotto della temperatura di fusione $T < T_m$ diventa lo stato fondamentale al di sopra di essa $T > T_m$ ($\psi_d = \psi_1^{\Gamma=0,T<T_m}$), l'energia libera di denaturazione (3.1.5 3.2.4), a temperatura ambiente, può essere semplicemente calcolata come

$$\Delta G(T = 298) = f_1^{\Gamma=0,T=298} - f_0^{\Gamma=0,T=298} = 0.83k_BT \tag{3.71}$$

vedi figura 3.13.

3.4.3 Valori di equilibrio a temperatura ambiente e variazioni di essi per $T < T_m$

Variazione dell'angolo di twist con la temperatura

Come mostrato in figura 3.4.3 a temperatura ambiente si ritrova il valore conosciuto sperimentalmente di 10.4 ± 0.1 coppie di basi per ogni giro di doppia elica (3.1.2) :

$$\langle\theta\rangle_{T=298} = 0.6049 \tag{3.72}$$

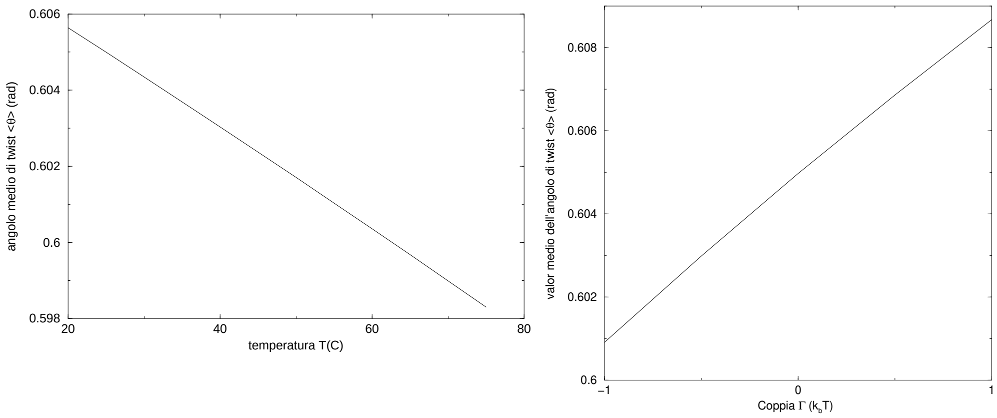

Figura 3.14: Figura a sinistra: a $T = 25^0C$ $\langle\theta\rangle = 0.6049$. L'angolo medio varia monotonamente con la temperatura ($T < T_m$), la pendenza della retta è $\frac{\Delta\langle\theta\rangle}{\Delta T} = -1.4\,10^{-4} rad/C$. Figura a destra: varaizione dell'angolo con una coppia di torsione, $T = 25^oC$, la pendenza della retta è $\frac{\Delta\langle\theta\rangle}{\Delta\Gamma} = 3.6\,10^{-3} rad/k_BT$.

Inoltre l'angolo di twist, diminuisce monotonamente con la temperatura ($T < T_m$) e la pendenza della retta fornisce, in ottimo accordo con i risultati sperimentali, (3.1.2):

$$\frac{\Delta\langle\theta\rangle}{\Delta T} = -1.4\,10^{-4} rad/C \tag{3.73}$$

Variazione della distanza assiale con la temperatura

Il valore medio della distanza assiale a temperatura ambiente è

$$\langle h\rangle_{T=298} = 3.39\ \text{Å} \tag{3.74}$$

e coincide con quello osservato sperimentalemente con la diffusione di neutroni [Gri 87]. La varianza attorno a questo valore è:

$$\sqrt{\langle h^2\rangle - \langle h\rangle^2} = 0.95\text{Å} \tag{3.75}$$

mentre il valore che si osserva sperimentalmente [Gri 87] è pari a 0.2Å. Il valore medio della distanza assiale aumenta monotonamente con la temperatura ($T < T_m$) di

$$\frac{\Delta\langle h\rangle}{\Delta T} = 1.410^{-3}\text{Å}/^oC. \tag{3.76}$$

Valor medio del raggio a temperatura ambiente

Il valor medio del raggio a temperatura ambiente è

$$\langle r\rangle_{T=298} = 10.01\ \text{Å} \tag{3.77}$$

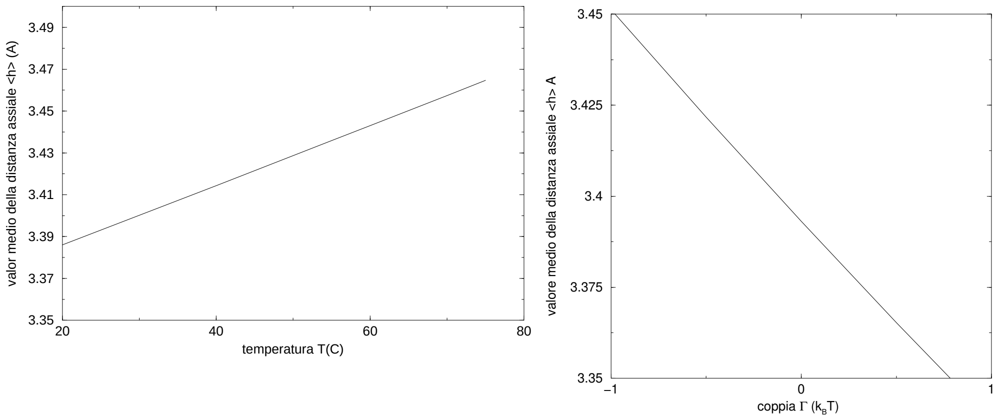

Figura 3.15: Figura a sinistra: a $T = 25^oC$ $\langle h \rangle = 3.39$Å. Il valore medio della distanza assiale varia monotonamente con la temperatura, la pendenza della retta è $\frac{\Delta\langle h\rangle}{\Delta T} = 1.4\,10^{-3}$Å$/C$
Figura a destra: varaizione della distanza assiale con una coppia di torsione, $T = 25^oC$, la pendenza della retta è $\frac{\Delta\langle h\rangle}{\Delta\Gamma} = -0.054$Å$/k_BT$.

La variazione del raggio con la temperatura è data da una retta di pendenza

$$\frac{\Delta\langle r\rangle}{\Delta T} = 5\ 10^{-5}\text{Å}/^oC \tag{3.78}$$

Funzioni di correlazione

Esistono degli stati eccitati che numericamente appaiono come stati legati (cioè con una componente per $r > r_d$ trascurabile) e si trovano facilmente restringendo l'intervallo di integrazione ad $r < r_d$. Le funzioni d'onda $\psi_{1ex}^{\Gamma=0,T=298}$, $\psi_{2ex}^{\Gamma=0,T=298}$ sono rappresentate in figura 3.12, ad esse corrispondono energie libere piú alte rispetto a quelle dei primi stati della diffusione: $f_{1ex} = 3.35k_BT$, $f_{2ex} = 4.33k_BT$. In meccanica quantistica questi stati sono chiamati stati risonanti, corrispondono agli stati legati che si avrebbero nella buca di potenziale se la barriera di potenziale tra la buca e la regione piatta fosse infinita, vedi fig 3.10. Poiché la barriera è finita questi stati corrispondono a pacchetti d'onda degli stati della diffusione ed hanno un tempo di vita finito. Due grandezze interessanti, che si calcolano a partire dalla conoscenza degli autovalori associati a questi stati eccitati confinati, sono la distanza di autocorrelazione di un'apertura radiale nel DNA B e quella di una torsione angolare. Essa sono definite attraverso:

$$\langle r_j r_{j+d}\rangle - \langle r\rangle^2 = \sum_{q=1}^{\infty}\left(\frac{\lambda_{qex}}{\lambda_0}\right)^d \langle\psi_0^{\Gamma=0,T=298}\ |r|\ \psi_{qex}^{\Gamma=0,T=298}\rangle^2. \tag{3.79}$$

Infatti l'elemento di matrice a destra della (3.79) è numericamente nullo per tutti gli stati non legati che si estendono ad $r > r_d$ e quindi non si sovrappongono allo stato fondamentale.

D (eV)	E $(eV/\text{Å}^2)$	ΔG (k_BT)
0.15	0.74	0.762
0.16	4	0.825
0.17	12	0.691

Tabella 1

$$\langle\theta_j\theta_{j+d}\rangle - \langle\theta\rangle^2 = \sum_{q=1}^{\infty}\left(\frac{\lambda_{qex}}{\lambda_0}\right)^d \frac{\langle\psi_0^{\Gamma=0,T=298}\;|X(r,r')\,Y'(r,r')|\;\psi_{qex}^{\Gamma=0,T=298}\rangle^2}{\lambda^2}. \quad (3.80)$$

(vedi 3.29). A grandi distanze ($d \to \infty$) gli andamenti delle espressioni di sopra sono governati dal valore dall'autovalore λ_{1ex} più grande:

$$\langle(r_j - \langle r\rangle)(r_{j+d} - \langle r\rangle)\rangle \propto e^{-d/\zeta} \qquad (d \to \infty) \qquad . \quad (3.81)$$

$\zeta = \frac{1}{\ln(\lambda_0/\lambda_{1ex})} = 0.93$ è la distanza di correlazione a grandi distanze in unità di numero di coppie di basi. Il valore dell'elemento di matrice della (3.79) risulta pari a $1.2\,10^{-3}\,\text{Å}^2$ per ψ_{1ex} e per 10^{-5}Å^2 per ψ_{2ex} mentre il valore dell'elemento di matrice della (3.80) risulta pari a $2\,10^{-6} rad^2$ per ψ_{1ex} e $10^{-8} rad^2$ per ψ_{1ex}.

3.4.4 Scelta dei parametri D,E,L,H

Il valore della temperatura di denaturazione T_m e dell' energia libera di denaturazione ΔG e la scelta di E e D

La temperatura di denaturazione, $T_m = 77^oC$, è stata fissata al valore conosciuto sperimentalmente per la sequenza poli(dG-dT)poli(dA-dC) a una concentrazione di 19.5 mM Na^+ attraverso la scelta dei parametri D ed E. Tale scelta non è univoca, altre coppie di parametri con la stessa T_m sono ad esempio $D = 0.15\,eV, E = 0.74\,eV/\text{Å}^2$ e ($D = 0.17 E = 12\,eV/\text{Å}^2$) (Vedi tabella 1). Dalla tabella si deduce che una piccola variazione percentuale di D (6%) deve essere compensata da una grande variazione percentuale di E (80%) per ottenere la stessa T_m. Il valore di D è comunque del giusto ordine di grandezza $D \simeq 0.1 eV$. La scelta della coppia viene ristretta dalla considerazione che valori verosimili di E/a^2 devono essere dello stesso ordine di grandezza di D, dunque il valore di $E = 12\,eV/\text{Å}^2$ è già da escludere per questo motivo, inoltre valori troppo piccoli di $E \simeq 0.2$ che si otterrebbero fissando $D = 0.146$ possono cambiare il carattere del primo ordine della transizione di fase, non essendo più sufficienti ad assicurare alla transizione un carattere cooperativo [Cul 97]. In figura 3.16 è mostrato come la scelta $D = 0.16 eV$, $E = 4\,eV/\text{Å}^2$, oltre a fornire il giusto ordine di grandezza $E/a^2 = 0.1 eV$, è quella che ottimizza il valore dell'energia libera di denaturazione a temperatura ambiente, rispetto ai risultati conosciuti sperimentalmente.

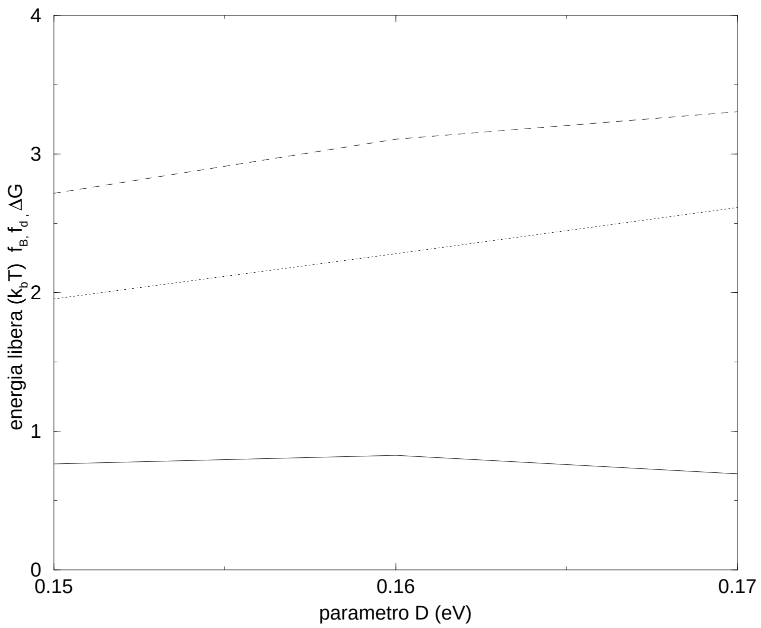

Figura 3.16: Andamento dell'energia libera di denaturazione (linea piena) a temperatura $T = 25^0C$ in funzione del parametro D, ricavato su tre scelte differenti ($D = 0.15\,eV, E = 0.74\,eV/\mathring{A}^2$ $D = 0.16, E = 4\,eV/\mathring{A}^2$ $D = 0.17E = 12\,eV/\mathring{A}^2$) che forniscono la stessa temperatura di denaturazione $T_m = 77^oC$. Mentre il valore dell'energia libera dello stato non legato f_d (curva punteggiata) cresce monotonamente all'aumentare di D, l'andamento di f_B (curva tratteggiata) ha un massimo intorno a $D = 0.16$. Di conseguenza ΔG non è monotono ma ha un massimo intorno a $D = 0.16$.

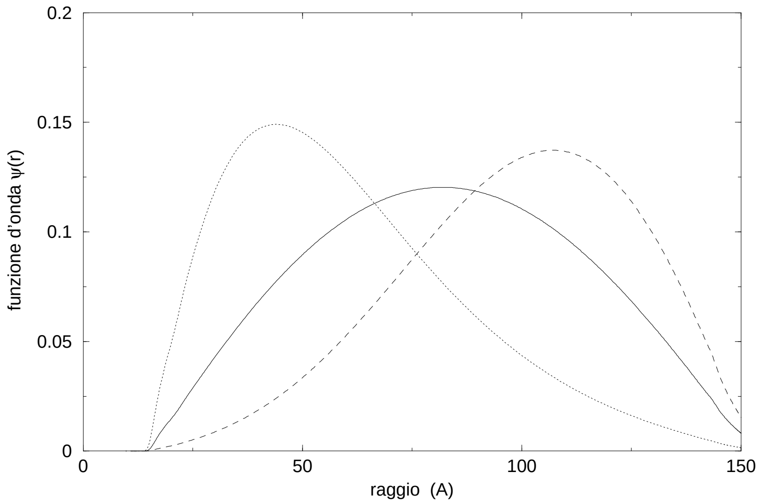

Figura 3.17: La funzione d'onda dello stato aperto a coppia di torsione nulla è centrata in $r = r_{max}/2$ (linea piena: $\psi_d^{\Gamma=0}$), quelle a coppia positiva sono centrate in $r < r_{max}/2$ (linea punteggiata :$\psi_d^{\Gamma=0.13}$) e quelle a coppia negativa in $r > r_{max}/2$ (linea tratteggiata :$\psi_d^{\Gamma=-0.16}$).

Il valor medio dell'angolo di Twist e della distanza assiale a temperatura ambiente e la scelta di L ed H

La scelta dei parametri L ed H è avvenuta nel seguente modo: All'inizio essi sono stati fissati ad i valori conosciuti sperimentalmente a temperatura ambiente $H' = 3.4$ ed $L'^2 = H^2 + 2R^2\ (1 - \cos(2\pi/10.4))$. Una volta fissata la coppia di parametri $D = 0.16eV$ ed E' che portava a $T_m = 350K$ i valori di L' ed H' sono stati aggiustati ad L ed H per ottenere $\langle\theta\rangle^{T=298} = \frac{2\pi}{10.4}$ e $\langle h\rangle^{T=298} = 3.4$Å. In seguito il valore di E' è stato aggiustato al valore di E per riottenere il valore di T_m.

3.5 Risultati in presenza di una coppia di torsione

3.5.1 Temperatura di denaturazione a coppie di torsione positive o negative

Funzioni d'onda per coppie di arrotolamento/srotolamento

Per coppie di torsione non nulle ($\Gamma \neq 0$) la denaturazione si può descrivere, analogamente al caso ($\Gamma = 0$), come il passaggio da uno stato fondamentale legato ad uno non legato. Le funzioni d'onda dello stato non legato risentono però della coppia di torsione. Come mostrato in figura 3.17 per coppie di arrotolamento la funzione d'onda dello stato aperto è infatti centrata in $r < r_{max}/2$, e per coppie di srotolamento essa è centrata in $r > r_{max}/2$.

Problemi di taglia finita nella determinazione della temperatura di denaturazione per coppie di srotolamento

La temperatura di denaturazione, analogamente a quanto mostrato, per $\Gamma = 0$ in figura 3.13, viene calcolata dall'intersezione dell' energia libera $f_B^{\Gamma,T}$ con l'energia libera $f_d^{\Gamma,T}$. La forma della funzione d'onda dà un'indicazione degli effetti di taglia finita nella temperatura di denaturazione, infatti si verifica numericamente che se la funzione d'onda per grandi valori di r ha raggiunto il suo punto di flesso, allora la temperatura di transizione è stabile rispetto ad un allargamento dell'intervallo. Come si vede in figura 3.17 per coppie positive l'intervallo $r_{max} = 150$ è largamente sufficiente. Per coppie nulle esso é l'intervallo minimo per un risultato stabile, allargando l'intervallo si ottiene infatti una diminuzione della temperatura di denaturazione $\Delta T_m \simeq -0.2^o$ trascurabile. Al contrario per coppie negative ci sono effetti di taglia finita. Allargando l'intervallo a $r_{max} = 200$ (con $nr = 1000$ e $nfi = 800$ punti di integrazione) e $r_{max} = 250$ (con $nr = 1200$ e $nfi = 800$ punti di integrazione) si ottiene una relazione lineare tra la temperatura di denaturazione e l'inverso dell'intervallo da cui si estrapola la retta:

$$T_m(r_{max}, \Gamma) = T_m(\Gamma) + \alpha(\Gamma)\,\frac{1}{r_{max}} \tag{3.82}$$

il parametro $\alpha(\Gamma)$ è in relazione con la variazione dell'energia libera dello stato non legato dovuta all'allargamento dell'intervallo cioè con la pressione esercitata dalle pareti $P(\Gamma) = \frac{\partial f_d^\Gamma}{\partial r_{max}}$. I valori che si sono ottenuti per $\alpha(\Gamma)$ sono i seguenti

$\Gamma(eV)$	$\alpha(K\,\text{Å})$	$T_m(K)$
-0.04	645	293
-0.03	559	303
-0.0155	337	326

Diagramma di fase nel piano coppia esterna temperatura

In figura 3.18 è mostrato il diagramma di fase nel piano temperatura T, coppia di torsione Γ. In particolare a temperatura ambiente $T_c = 25^oC$ si ottiene $\Gamma_c = -0.035eV$, mentre $\Gamma_c = 0$ a $T_c = 77^oC$.

3.5.2 Parametrizzazione della transizione di fase con il grado di superavvolgimento

Definizione del grado di superavvolgimento σ

Il grado di superavvolgimento introdotto da una coppia di torsione ad una temperatura $T < T_m$ si definisce come il cambiamento relativo dell'angolo medio di twist rispetto al suo valore in assenza della coppia:

$$\sigma(\Gamma) = \frac{\langle\theta\rangle_\Gamma - \langle\theta\rangle_{\Gamma=0}}{\langle\theta\rangle_{\Gamma=0}}. \tag{3.83}$$

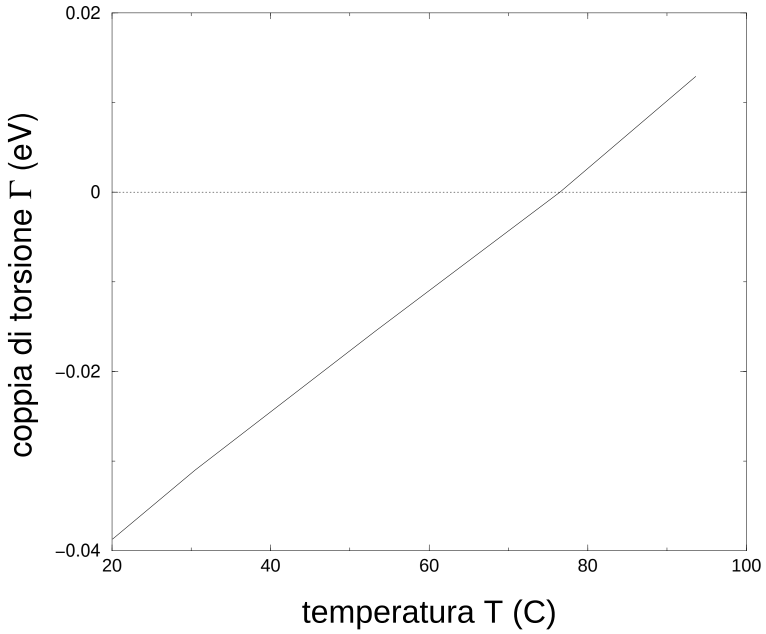

Figura 3.18: Diagramma di fase nel piano T, Γ. A $\Gamma_c = 0$ $T_m = 77^oC$; a $\Gamma_c = -0.035eV$ $T_m = 25^oC$.

3.5.3 Isoterme nel piano superavvolgimento, coppia di torsione

Calcolando (a partire dalla 3.28) il superavvolgimento al variare della coppia di torsione ed a temperatura fissa, si ottengono le isoterme mostrate in figura 3.19. La linea orizzontale mostra la coesistenza critica tra il DNA B (linea verticale di sinistra) ed il DNA d (linea verticale di destra). Lungo di essa il valore della coppia di torsione rimane fisso a Γ_c, mentre il grado di superavvolgimento varia dal valore $\sigma_B\left(\Gamma_c\right)$ al valore $\sigma_d\left(\Gamma\right) = -1$. A temperatura ambiente il valore del superavvolgimento critico risulta

$$\sigma_B(\Gamma_c = -0.035eV) = -0.01. \tag{3.84}$$

Variazione dei valori medi con la coppia di torsione a temperatura ambiente

A temperatura ambiente, nella fase B: $\Gamma < \Gamma_c$, la variazione del valor medio del raggio $< r >$, del valor medio dell'angolo di twist $< \theta >$ e della distanza assiale $< h >$, sono costanti (vedi le figure 3.4.33.15):

$$\frac{\Delta\langle r\rangle}{\Delta\Gamma} = 16\,10^{-4}\ \text{Å}/k_BT \tag{3.85}$$

$$\frac{\Delta\langle\theta\rangle}{\Delta\Gamma} = 3.6\,10^{-3}\ rad/k_BT \tag{3.86}$$

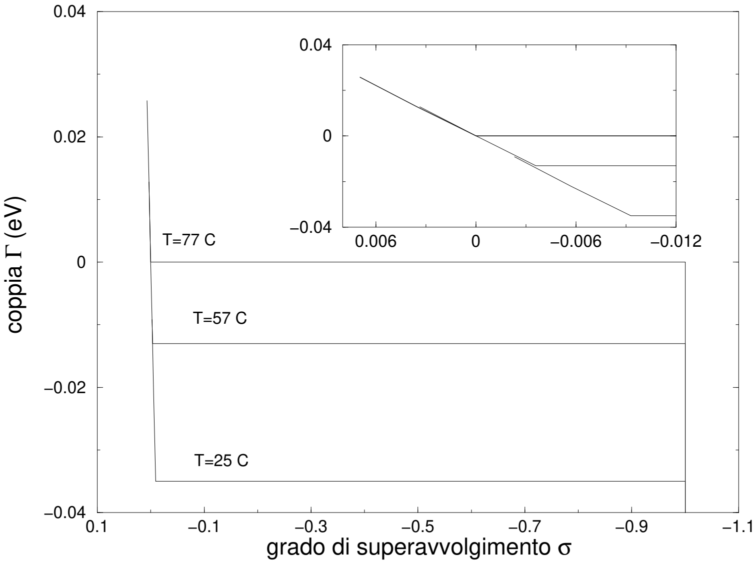

Figura 3.19: Le isoterme nel piano σ,Γ mostrano la coesistenza tra la fase DNA B (linea verticale a sinistra) e il DNA d (linea verticale a destra). Inserto: la linea verticale a sinistra definisce una relazione lineare tra Γ e σ. il valore del superavvolgimento critico a temperatura ambiente è $\sigma_c = -0.01$

$$\frac{\Delta\langle h\rangle}{\Delta\Gamma} = -0.054 \text{ Å}/k_BT \tag{3.87}$$

La validità della risposta lineare e la determinazione della costante K

Come mostrato nell'inserto della figura 3.19 la linea verticale di sinistra definisce una relazione lineare tra Γ e σ indipendente dalla temperatura nell'intervallo considerato $25^oC < T < 77^0C$:

$$\Gamma = K_\theta \ (\ \langle\theta\rangle_\Gamma - \langle\theta\rangle_{\Gamma=0}). \tag{3.88}$$

Questa relazione assicura la validità del teorema della risposta lineare e permette di legare la costante K_θ al modulo di torsione C del DNA B. Il teorema della risposta lineare si scrive, infatti, in questo caso :

$$\frac{\langle\theta\rangle_\Gamma - \langle\theta\rangle_{\Gamma=0}}{\Gamma} = \frac{1}{k_BT}(\langle\theta\rangle^2_{\Gamma=0} - \langle\theta^2\rangle_{\Gamma=0}). \tag{3.89}$$

Ovvero la risposta del sistema alla perturbazione data dalla coppia di torsione esterna 3.11,è proporzionale alle fluttuazioni del sistema in assenza della coppia . Calcolando le fluttuazioni quadratiche di θ a partire dall'energia torsionale elastica (quest'ultima corrisponde alla versione discreta dell'energia torsionale nella WLC (1.18))

$$\mathcal{E} = \frac{C \ k_BT}{2\langle h\rangle} \sum_n (\ \theta_n - \langle\theta\rangle \ )^2 \tag{3.90}$$

e la (3.89) si ottiene la relazione tra K_θ ed il modulo di torsione C

$$C = \frac{K_\theta \langle h \rangle}{K_B T} \tag{3.91}$$

Per determinare Il valore della costante K del potenziale V_b si è proceduto nel modo seguente. Sviluppando quadraticamente V_b nella variabile angolare, attorno alla posizione di equilibrio a temperatura nulla $r_n = r_{n-1} = R, \theta_n = \Theta$, si è determinato il valore di K a partire dalla relazione : $K\,R^4 \sin^2\theta/H^2 = C\,k_b\,T/2H$: ponendo $C = 86nm$ si ottiene $K = 0.01eV$ e si fissa in questo modo il suo ordine di grandezza . In seguito si è variato il valore di K fino al valore $K = 0.0137$ che porta al valore di $C = 84nm$ dalla pendenza K_θ della retta (3.88) in figura 3.19.

3.6 Prospetto dei risultati ottenuti

La meccanica statistica del modello ha dunque permesso di unificare nella stessa teoria la transizione di denaturazione guidata dalla temperatura, e quella indotta meccanicamente da una coppia di torsione. Si è trovato che la transizione di denaturazione corrisponde ad una transizione di fase del primo ordine che spiega la coesistenza di fasi del DNA B e del DNA d osservata sperimentalmente da Strick, Allemand, Bensimon, Croquette [Str 99c].

Risultati ottenuti aggiustando i parametri

	Valori sperimentali	Risultati del modello	Parametri aggiustati
Temperatura di denaturazione T_m	350 K	350 K	D , E
Angolo medio di twist $\langle\theta\rangle^{T=298}$	$0.604 \pm 6\ 10^{-3}$ rad	0.605 rad	L, H
Distanza assiale $\langle h\rangle^{T=298}$	3.4 Å	3.4Å	L, H
Modulo di torsione C	86 ± 10 nm	84 nm	K
Energia libera di denaturazione $\Delta G(T = 298)$	$\simeq 1.4\ k_B T$	$0.8\ k_B T$	D,E

Osservazioni: la T_m si riferisce alla sequenza poli(dG-dT)poli(dA-dC), 19 mM ([Sae 84]). Il passo dell'elica è calcolato con una precisione 10.4 ± 0.1 su una sequenza generica (3.1.2). Il modulo di torsione $86\pm10nm$ è quello ricavato dall'esperimento di Allemand, Bensimon, Croquette, Strick (3.2.4). L'energia libera di denaturazione è una stima fatta su valori tabulati a partire da misure calorimetriche sulla sequenza poli(dG-dT)poli(dA-dC) a 1M Na^+ (3.1.5).

I parametri a e b non sono stati aggiustati, ma sono stati presi dai valori fissati in letteratura sul modello PB.

Risultati ottenuti una volta fissati i parametri

	Risultati sperimentali	Risultati del modello
Coppia di torsione critica $\Gamma_c(T = 298)$	$-2.3 \pm 0.4 k_b T$	$-1.4 k_b T$
Grado di superavvolgimento critico $\sigma_c(T = 298)$	-0.01	$-0.0142 \pm 5 10^{-4}$
Variazione dell'angolo di twist con la temperatura $\frac{\Delta\langle\theta\rangle}{\Delta T}$	$-1.7\,10^{-4}$	$-1.4\,10^{-4}$

Osservazioni:

I risultati sul grado di superavvolgimento critico, sulla coppia critica, sono ottenuti sul λ fago ad una concentrazione di 10 mM PB (esperimento di Allemand, Bensimon, Croquette e Strick) c'e' un'incertezza sperimentale sia sulla lunghezza della molecola che sul valore di C quindi su σ ma maggiormente su Γ (3.2.4). La variazione dell'angolo di twist con la temperatura è da elettroforesi su gel su un DNA generico (3.1.2).

I risultati teorici differiscono da quelli sperimentali, ottenuti non sempre sulla stessa sequenza e nelle stesse condizioni e naturalmente con delle incertezze sperimentali, per un fattore $\simeq 1.5$.

Inoltre è stata fatta una predizione teorica del diagramma di fase su tutto il piano Γ, T.

3.7 Il problema matematico della transizione di fase

La transizione di denaturazione si mostra, sperimentalmente e teoricamente, come una transizione di fase del primo ordine. Ci si può chiedere se questo è rigorosamente vero. Una transizione di fase è definita in senso matematico da una singolarità dell'energia libera con una discontinuità delle derivate prime (o seconde) per una transizione del primo ordine (o secondo ordine) rispetto ai parametri termodinamici, nel caso abituale, temperatura e pressione [Hua 63]. La sua definizione rigorosa non è sempre immediata, ad esempio essa non può avvenire in un sistema di volume finito, per quanto grande, perchè, in questo caso, la funzione di partizione è una funzione analitica nei suoi parametri termodinamici.

Si dimostra che non c'è transizione di fase in sistemi unidimensionali a variabili discrete ed ad interazioni a primi vicini, ad esempio nel modello di Ising unidimensionale (vedi appendice B.1). Infatti, secondo il teorema di Perron Frobenius, l'autovalore massimo di una matrice di trasferimento simmetrica ed ad elementi positivi ha il corrispondente autovettore con tutte le componenti positive e quindi non può essere degenere perchè gli autovettori sono tra loro ortogonali. L'autovalore massimo ha dunque un andamento regolare con la temperatura perchè non si può verificare, ad una data temperatura, un contatto tra esso e l'autovalore successivo.

Van Hove ha dimostrato, inoltre, [Lie 66] che una transizione di fase non può avvenire per un sistema unidimensionale di particelle situate lungo un asse, le cui ascisse sono descritte da variabili continue x_i e sono sottoposte ad un potenziale $U(|x_i - x_j|) = U(\xi)$

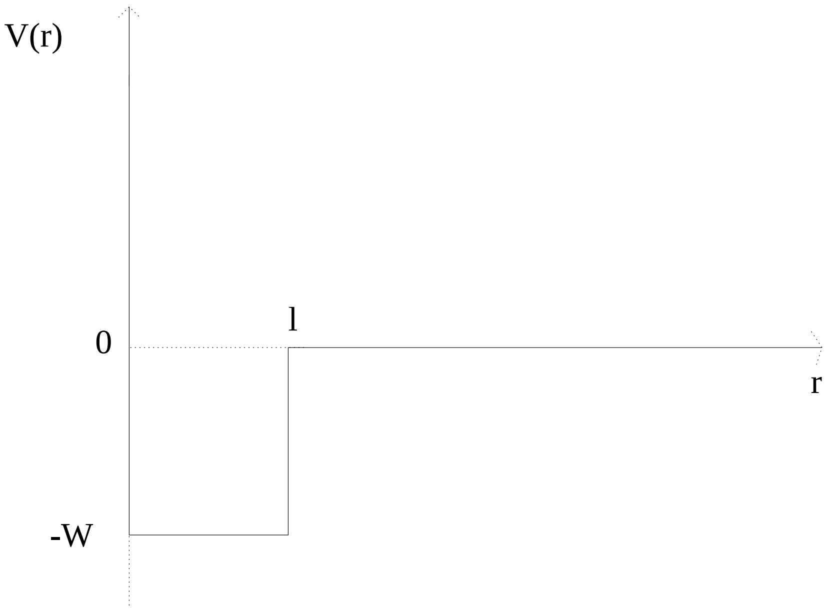

Figura 3.20: Potenziale del problema di Schrödinger unidimensionale con una barriere infinita nell'origine, una buca di profondità W e larghezza $l = 1/a$ ed un valore costante e pari a 0 all'infinito.

con una parte repulsiva a sfere dure ed a corta portata:

$$\begin{aligned} U(\xi) &= \infty \text{ per } 0 < \xi < d_0 \\ U(\xi) &= \text{continuo e limitato inferiormente per } d_0 < \xi < d_1 \\ U(\xi) &= 0 \text{ per } \xi > d_1 \end{aligned} \quad (3.92)$$

dove d_0, d_1 rappresentano rispettivamente il diametro di incompressibilità e la portata dell'interazione.

Il nostro caso differisce da quest'ultimo perchè è più propriamente un sistema a 1+2 dimensioni, in cui la dimensione verticale ordina i gradi di libertà r_i, φ_i lungo un' ascissa costituita dall'asse della molecola, ma questi occupano le due dimensioni trasverse. I gradi di libertà, oltre che ad un interazioni di coppia $V_s(r_i, r_{i_1}) + V_b(r_i, r_{i_1}, \varphi_i - \varphi_{i-1})$, sono sottoposti ad un potenziale di sito a portata finita $V_m(r_i)$, per cui essi non sono necessariamente legati. Problemi come l'associazione-dissociazione di una catena polimerica da una superficie assorbente e la denaturazione-rinaturazione del DNA sono trattati da De Gennes in [Deg 69] attraverso l'analogia tra una catena polimerica e la traiettoria di una particella in meccanica quantistica. In effetti, come già evidenziato nel modello PB da Cule e Hwa [Cul 97], per capire il carattere della transizione di fase è utile un paragone con un problema di meccanica quantistica:

Consideriamo il seguente problema di Schrödinger unidimensionale :

$$H = -\frac{\partial^2}{\partial r^2} + V(r) \qquad . \quad (3.93)$$

con un potenziale del tipo (vedi figura 3.20)

$$\begin{aligned} V(r) &= \infty \qquad (r=0) \\ V(r) &= -W \qquad (0<r<l) \\ &= 0 \qquad (r>l) \qquad , \end{aligned} \tag{3.94}$$

Per questo problema si trova infatti [Coh 77] (vedi Vol 1 Complementi H1 pag. 74-78 ed esercizio 7, Complementi k1 pag.89) un valore critico della profondità della buca di potenziale

$$W_c = \frac{\pi^2}{4\,l^2} \qquad , \tag{3.95}$$

che separa il regime localizzato da quello delocalizzato. Per $W > W_c$, lo stato fondamentale di H è uno stato legato e decresce esponenzialmente a grandi distanze r, mentre quando $W < W_c$ è delocalizzato esso si estende su tutto l'asse positivo. La funzione d'onda inizia da $\psi = 0$ in $r = 0$ a causa della barriera di potenziale infinita e svanisce ugualmente all'infinito se lo stato è legato. L'esistenza della transizione deriva dal fatto che, per guadagnare energia potenziale W, ψ deve essere concentrata sulla larghezza l della buca ad un costo di energia elastica dell'ordine di $\sim 1/l^2$. W_c dà il valore minimo preciso di W al di sotto del quale costruire questo stato legato cessa di essere energeticamente favorevole.

La soluzione dell' equazione agli autovalori per la matrice di trasferimento può essere riportata nel limite continuo, come mostrato nel paragrafo 3.3.5, alla soluzione di un problema di Schrödinger unidimensionale. Il potenziale 3.20 sopra illustrato schematizza il potenziale vero di figura in assenza di barriera di potenziale, cioé nel caso $b = 0$ in cui il potenziale di impilamento (V_s) è quadratico; l' Hamiltoniana del problema di Schrödinger corrispondente si legge:

$$H = -\frac{(k_B T)^2}{4E}\frac{\partial^2}{\partial r^2} + V_m(r) \tag{3.96}$$

La barriera infinita di (3.94) corrisponde alla parte repulsiva del potenziale di Morse che numericamente è stato posto ad infinito per $r < 9.7$Å, mentre la profondità della buca è data da $W = D = 0.16\,eV$ e la larghezza da $l \simeq 1/a = 0.16$Å. Il valore critico della larghezza della buca che separa stati legati e non legati si riscrive allora:

$$W_c \simeq \frac{\pi^2 (k_B T)^2}{16 l^2 E} \simeq \left(\frac{T}{2800}\right)^2 \ \mathrm{eV} \quad . \tag{3.97}$$

A temperatura ambiente, la larghezza della buca $W = D$ è più larga del valore critico $W_c(T = 300K) \simeq 0.025$ eV. Quindi lo stato fondamentale è legato come ci si aspetta. Quando la temperatura cresce, l'equazione (3.97) mostra che W_c cresce fino a raggiungere una temperatura critica $T_m \simeq 760$ K alla quale lo stato fondamentale diventa non legato. Si può dimostrare inoltre che, tendendo alla temperatura critica dal basso $T < T_m$ cioè $W_c < W$, l'energia f (che corrisponde all'energia libera del nostro problema) ha il seguente andamento (vedi figura 3.21)

$$f = -\frac{1}{4a^2}(W - W_c)^2 \propto -(T_m - T)^2 \tag{3.98}$$

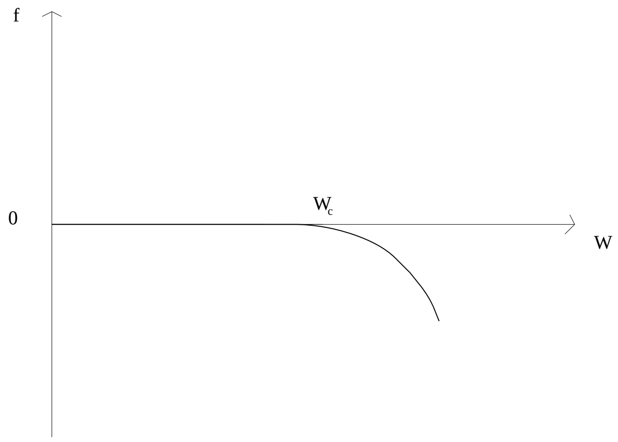

Figura 3.21: L'energia del problema di Schrödinger unidimensionale si annulla quadraticamente al valore critico della barriera di potenziale W_C al di sotto della quale non ci sono più stati legati, la transizione di fase è dunque del secondo ordine.

l'uguaglianza tra il secondo ed il terzo membro si ricava scrivendo $W = T^2 = (T_m - \delta T)^2$ con $\delta T = T_m - T$. Al contrario per $T > T_m$, nel limite di $r_{max} \to \infty$, $E = 0$. (vedi figura 3.21). Quindi l'energia libera mostra una discontinuità nella derivata seconda rispetto alla temperatura alla quale corrisponde una transizione del secondo ordine. Come mostrato in [Dom91, Cul 97, The 00] si ha infatti una discontinuità del calore specifico ed una divergenza algebrica del raggio medio delle coppie di basi $r \sim (T_m - T)^{-1}$ [Cul 97]. In effetti, come risulta anche dalla diagonalizzazione numerica della matrice di trasferimento [Dau 93a] del modello PB originario, cioè con un potenziale di impilamento quadratico, T_m risulta molto più alta della vera temperatura di denaturazione e la transizione si svolge su un intervallo molto esteso in temperatura ($\simeq 200K$), perdendo il carattere cooperativo che la caratterizza sperimentalmente[Dau 93a] . Questo ha indotto T. Dauxois e M. Peyrard all 'introduzione del termine di impilamento anarmonico ([Dau 95].

In effetti il potenzaile di figura, essendo $b \neq 0$ è piuttosto schematizzato da quello di figura 3.22. L' Hamiltoniana del problema di Schrödinger corrispondente è data da:

$$H = \frac{K_b T}{2} \ln \left(E\, e^{-b(r-R)} + C\right) - \frac{(k_B T)^2}{4(E\, e^{-b(r-R)} + C)} \frac{\partial^2}{\partial r^2} + V_m(r) \tag{3.99}$$

C è una costante che nel modello PB modificato fa parte del termine di impilamento anarmonico mentre nel nostro caso deriva dal potenziale di scheletro e più precisamente si ricava dalla matrice $Y_0(r, r')$ (3.20), vedi (3.70). Al di là della buca del potenziale di Morse, è adesso presente una barriera che si estende su una distanza dell'ordine di $1/b$. Risolvendo il problema semplificato corrispondente (vedi figura 3.22)

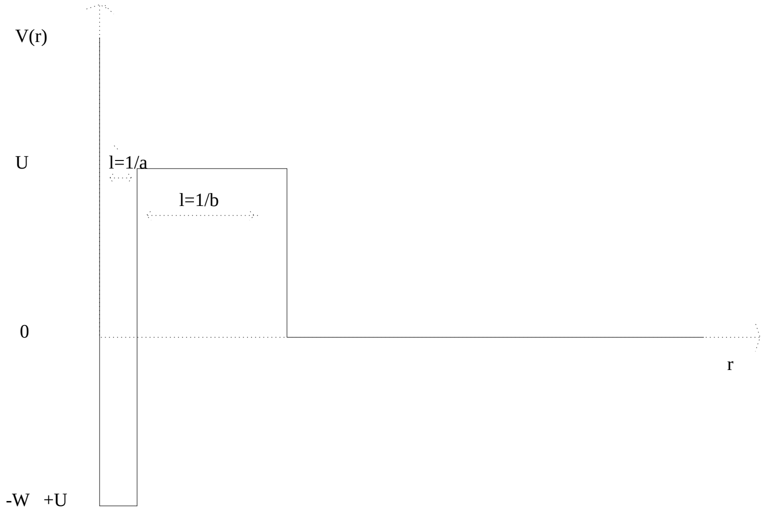

Figura 3.22: Potenziale del problema di Schrödinger unidimensionale con una barriere infinita nell'origine, una buca di profondità W e larghezza $l = 1/a$, una barriera di larghezza $l = 1/b$ ed un valore costante e pari a 0 all'infinito.

$$
\begin{aligned}
V(r) &= \infty \qquad (r = 0) \\
&= -W + U \qquad (0 < r < 1/a) \\
&= U \qquad (1/a < r < 1/b) \\
&= 0 \qquad (r > 1/b)
\end{aligned}
\tag{3.100}
$$

Cule e Hwa [Cul 97] hanno trovato che nel modello PB, per cui $(E - C)/C \sim 1.5$, per valori di a/b sufficientemente grandi $(a/b > 5)$ la transizione è estremamente ripida e diventa simile ad una transizione del primo ordine, infatti la divergenza del raggio medio delle coppie di basi $r \sim \alpha(T - T_M)^{-1}$, è caratterizzata dal parametro α che cresce esponenzialmente al crecere di a/b. Per $(a/b = 5)$ $\alpha = 100$. Dalla soluzione numerica dell' equazione agli autovalori per la matrice di trasferimanto, noi vediamo il valore di λ_0 raggiungere a T_m il continuo degli stati non legati; corrispondentemente l'energia libera diventa quella della fase aperta $f_d = -k_B T \, ln(\lambda_d)$ con un cambiamento di pendenza. Anche l'analisi numerica di Theodorakopoulos, Dauxois, Peyrard sul modello PB [The 00] suggerisce una transizione del primo ordine con una entropia di transizione finita. Non possiamo però dire se il cambiamento di pendenza dell'energia libera con la temperatura avviene effettivamente in modo discontinuo, come in una vera transizione del primo ordine o come, risulta dall'analisi di Cule e Hwa, avviene in modo continuo, ma su un intervallo molto stretto caratterizzato dal rapporto a/b, (vedi figura 3.23) dando luogo cosí ad una brusca transizione del secondo ordine.

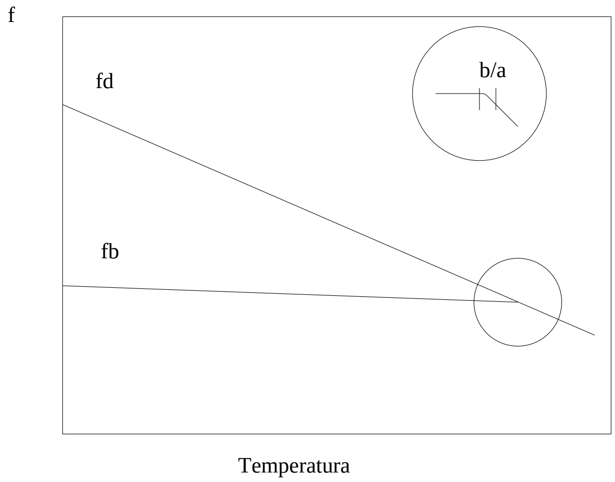

Figura 3.23: Andamento dell'energia libera con la temperatura vedi figura 3.12 e transizione dalla fase legata f_B alla fase non legata f_d, numericamente ci appare con una discontinuità della derivata prima dell'energia libera, ma potrebbe essere un cambiamento continuo ma molto brusco che avviene su un intervallo molto stretto caratterizzato dal rapporto a/b, con una discontinuità della derivata seconda dell'energia libera come in figura 3.20.

3.8 Conclusioni e prospettive

Il nostro modello e le teorie dell'elasticità

La distanza di correlazione di un'apertura radiale o di una torsione angolare indotta termicamente risulta essere minore della distanza assiale tra due basi di 3.4Å (3.79,3.80). Dalla effettiva scorrelazione del twist su coppie di basi differenti:

$$\langle \, (\, \theta_a - \langle \theta \rangle \,) \, (\, \theta_b - \langle \theta \rangle \,) \, \rangle \simeq \delta_{ab} \tag{3.101}$$

risulta adeguata la scelta dell' energia torsionale usata nei modelli di elasticità del DNA che è scritta in versione discreta nella (3.90). Il modulo di torsione C (legato nel nostro modello alla costante K) fissa dunque, analogamente al caso della lunghezza di persistenza A (1.12), la lunghezza di persistenza torsionale, cioè la distanza alla quale si osserveranno deviazioni macroscopiche dalla retta $\varphi_d = \langle \theta \rangle \, d$, al valore di 840Å a temperatura ambiente. Attraverso la teoria della risposta lineare, la costante C determina anche la risposta ad una coppia di torsione.

La lunghezza di persistenza A di curvatura nello spazio è invece dell'ordine di 550Å; sulle scale delle vibrazioni termiche dell' apertura radiale e della torsione angolare la molecola di DNA B appare dunque dritta. Non è necessario considerare l'accoppiamento tra l'apertura e la curvatura in modo diretto per studiare i modi di vibrazione, tale studio sarà affrontato nel capitolo seguente.

È opportuno, però, tenere presente, nello studio delle transizioni strutturali, il doppio accoppiamento torsione-curvatura e torsione-apertura dipendente dalla forza di tensione.

Questo risulta ben chiaro negli esperimenti di forza-allungamento con il controllo del grado di superavvolgimento (vedi figura 3.4) in cui si sono evidenziate due regioni separate dal valore della forza di tensione $F \simeq 0.5pN$. Nel primo regime $F < 0.5pN$, se si impone una coppia di torsione esterna alla molecola, la torsione della molecola aumenta linearmente fino a quando, ad un valore Γ_b, σ_b, avviene l'instabilità di buckling e la torsione viene scaricata sul superavvolgimento nello spazio. La molecola si accorcia dando luogo alle curve a cappello mostrate in figura 3.4; tale instabilità è stata studiata teoricamente tramite da Bouchiat e Mezard [Bou 98, Bou 99a], come descritto nel capitolo 1. Il valore critico della coppia di torsione per forze di tensione di 0.33 pN è $\Gamma_b \simeq 1k_BT$ [Bou 99a], a questo valore il rapporto tra il writhe ed i twist, e la formazione di plectonemi, inizia a crescere linearmente. Secondo il nostro modello per forze $F > 0.5pN$ al valore critico della coppia, $\Gamma_c = 1.4k_BT$, la torsione viene rilasciata attraverso l'apertura di bolle di denaturazione. A questi regimi di forze, la coppia di torsione critica di denaturazione risulta minore di quella della formazione di plectonemi, quest'ultimo fenomeno, dunque, non si verifica.

Le due teorie risultano quindi tra loro perfettamente coerenti e si completano nella descrizione dei risultati sperimentali ottenuti dal gruppo di D. Bensimon e V. Croquette.

3.8.1 Commenti sul modello e possibili miglioramenti

L'energia libera di denaturazione è troppo bassa

Il valore teorico che si ottiene per l'energia libera di denaturazione è più basso di quello che si ottiene sperimentalmente, di conseguenza il valore della coppia di torsione critica e del grado di superavvolgimento critico ottenuti sono minori di quelli che si osservano sperimentalmente. Per avere una energia libera di denaturazione maggiore dovrebbe aumentare la pendenza della curva f_d di figura 3.13 cioè l'entropia della fase denaturata.

I parametri a e b non sono ottimizzati

I parametri a e b sono fissati semplicemente come ordine di grandezza, infatti $3/a \simeq 0.5$Å dà l'ordine delle fluttuazioni nel legame idrogeno, mentre $5/b \simeq 10$Å corrisponde al raggio di un nucleotide. Il potenziale effettivo di figura 3.10 nella rappresentazione di meccanica quantistica è molto utile per capire il ruolo di questi parametri.

a determina la curvatura locale nel minimo della buca di potenziale del legame idrogeno e dunque la larghezza della buca, questo stabilisce il livello energetico dello stato legato. La variazione di questo parametro porta ad una variazione dell'energia libera dello stato chiuso indipendente dalla temperatura, quindi la pendenza della retta di f_B di figura 3.13 non varia, dunque non cambia l'energia libera di denaturazione a temperatura ambiente avendo fissato una energia libera nulla a temperatura $T = 350K$. Cambiando b non variano i valori delle energie libere f_B ed f_d tra lo stato B e lo stato denaturato, ma varia la larghezza della barriera di potenziale tra di loro. Dunque esso non influisce sulla meccanica statistica di equilibrio, ma sui processi dinamici di nucleazione delle bolle di denaturazione. La forma della bolla di denaturazione ed il tempo di nucleazione dipendono infatti dalla barriera, quindi le sue dimensioni precise diventano determinanti. Proprio perché a temperature inferiori alla temperatura critica la larghezza della barriera rispetto alla sua altezza determina in meccanica quantistica la probabilità di passaggio per effetto tunnel, cioè la componente $\psi_0(r)$ al di là della barriera, ci aspettiamo che, come previsto da Cule e Hwa ([Cul 97]) l'ordine di grandezza del rapporto a/b determina il carattere più o meno brusco (primo ordine rispetto a secondo ordine) della transizione di fase cioè quanto la transizione corrisponda al passaggio effettivo tra due stati differenti, o quanto sia lo stesso stato che cambia caratteristiche.

L'elasticità dell' asse molecolare ed il parametro K

Come è stato mostrato nella (3.75), la varianza della distanza assiale, dovuta alle fluttuazioni termiche, risulta a temperatura ambiente pari a $\sqrt{\langle h^2\rangle - \langle h\rangle^2} \simeq 1$Å, mentre il valore che si osserva sperimentalmente con la diffusione di neutroni, pari a 0.2Å, ne differisce significativamente. Nel modello WLC estensibile introdotto da J. Marko ed E. Siggia (1.18) per studiare la risposta del DNA ad una forza di tensione, il potenziale è composto da un termine quadratico nell'allungamento relativo dell'asse dell'elica, simile al nostro, la cui costante di forza definisce il modulo di Young, un termine non quadratico che riproduce un secondo minimo locale di potenziale attorno alla fase S ed un termine quadratico nelle variazioni dell'allungamento dell'asse che tiene conto della cooperatività di esso. Considerando solo il termine quadratico e discretizzando l'integrale come nella nostra Hamiltoniana si ottiene una costante elastica $Y \simeq 4k_BT\text{Å}^{-2}$ molto più grande rispetto al nostro valore $K = 0.56k_BT\text{Å}^{-2}$. Le fluttuazioni medie corrispondenti sono di $\sqrt{\langle h^2\rangle - \langle h\rangle^2} \simeq 0.4$Å contro il nostro valore di 1 Å . Considerando peró gli altri termini non lineari nel potenziale si ottengono delle fluttuazioni medie significativamente maggiori di circa 0.7Å . Le fluttuazioni complessive possono raggiungere 1Å come risulta anche in accordo con le simulazioni di dinamica molecolare su modelli atomici del DNA che includono le interazioni con il solvente [Mar00]. Il nostro modello è più semplice e meno elaborato rispetto al modello di Marko e Siggia perché non eravamo direttamente interessati allo studio della risposta alla forza di tensione, ma piuttosto allo studio della risposta alla torsione. Abbiamo posto dunque il potenziale di scheletro $V_b = K(h_n - H)^2$ quadratico in h_n. Inoltre la presenza del vincolo rigido L lega direttamente l'elasticità di torsione con quella di estensione dell'asse, mentre in realtá il vincolo non è completamente rigido e quindi le due elasticità sono collegate a due parametri differenti : il modulo di Young Y ed il modulo di torsione C. Nel nostro caso appare solo una costante di forza K che noi fissiamo per avere la buona rigidità torsionale a temperatura ambiente. Possibili elaborazioni del modello consistono nel considerare uno scheletro elastico, per introdurre in modo indipendente le due costanti elastiche e nel porre un potenziale non lineare sull'asse, come quello di Marko e Siggia, in modo da diminuire le fluttuazioni quadratiche di esso e di riprodurre la risposta ad una forza di tensione ed in particolare la transizione alla forma S.