

## КОНДЕНСАЦИЯ ДНК, ВЫЗВАННАЯ АДСОРБЦИЕЙ ЛИГАНДОВ

В. Б. Тейф, Д. Ю. Ландо

*Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси,*

### 1. ВВЕДЕНИЕ

Молекулы ДНК находятся *in vivo* в плотно упакованном, конденсированном состоянии. В таком виде генетическая информация хранится внутри хромосом, сперматозоидов и вирусов. В то же время, для взаимодействия с регуляторными белками, ДНК должна перейти в менее конденсированное состояние. Конденсация и деконденсация ДНК регулируют активность гена и клетки в целом. *In vitro* образование компактных упорядоченных структур ДНК можно вызвать добавлением к водно-солевому раствору ДНК нейтральных полимеров, или многовалентных катионов. Особый интерес к изучению конденсации ДНК *in vitro* в последние годы, вызван бурным развитием генной терапии и биоэлектроники. Кроме этого, эксперименты, выполненные в последние годы, показали, что конденсация в десятки тысяч раз ускоряет биохимические реакции, в которых участвует ДНК, и предохраняет ДНК от воздействия радиации.

Молекула ДНК характеризуется высокой линейной плотностью отрицательного заряда, поскольку каждая пара оснований несет на себе две полностью депротонированные фосфатные группы. Среднее расстояние между проекциями фосфатных групп на ось двойной спирали составляет 1.7 нм. Возникающее электростатическое отталкивание обуславливает большую жесткость ДНК в растворе, которая при физиологической ионной силе образует рыхлый клубок большого объема. В то же время, *in vivo* молекула ДНК локализована внутри объема, который в тысячи раз меньше (таблица 1).

Таблица 1. Характерные размеры молекул ДНК

организм	Длина ДНК	Диаметр упаковки	Характер упаковки
Бактериофаг T4	54 мкм	0.1 мкм	капсула
<i>E. coli</i>	1.4 мм	1 мкм	нуклеоид
Человек (диплоидное ядро)	1.3 м	10 мкм	набор хромосом

Такой плотной упаковки, формирование которой называют конденсацией ДНК, можно достичь и *in vitro*, например, добавив к водно-солевому раствору ДНК многовалентные катионы [1, 2] или какой-либо нейтральный полимер типа полиэтиленгликоля [3, 4]. В последние годы интерес к этому процессу резко возрос, что обусловлено возможностью использования конденсации ДНК в генной терапии и бионаноэлектронике.

С развитием генной терапии во многих лабораториях начались исследования конденсации ДНК катионными полипептидами, липидами и неорганическими катионами с целью ее последующей трансфекции внутрь клетки [5-11]. Для того, чтобы антисенсовый олигонуклеотид или плазида, содержащая встраиваемый ген, попали внутрь клетки, они должны быть защищены от действия нуклеаз, и скомпактизированы так, чтобы пройти сквозь малые поры в клеточной мембране [1, 9]. Ранее для такой доставки ДНК использовались капсулы ретро- или аденовирусов. В отличие от вирусов, лиганды, например, липидные молекулы, инкапсулирующие ДНК внутри липосом, не вызывают иммунный отклик и не несут потенциальной опасности инфицирования. Один из возможных механизмов действия заключается в том, что после нейтрализации заряда и последующей конденсации ДНК внутри липосомы, молекула ДНК переносится в ходе эндоцитоза в цитоплазму, а затем попадает внутрь ядра [9].

Другой областью применения конденсации ДНК является создание сенсоров на базе жидкокристаллической ДНК [12, 116]. В качестве примера можно привести биодатчики на основе жидкокристаллической ДНК, чувствительный элемент которых вводится в состав полимерной цепочки, "сшивающей" соседние молекулы ДНК, специфическим образом расположенные в пространстве. Этот прием, получивший название "молекулярного конструирования", позволяет создавать полифункциональные жидкокристаллические датчики, содержащие чувствительные элементы разной химической природы. Такие биодатчики способны определять группы соединений, нарушающие свойства "чувствительных" элементов, находящихся между молекулами ДНК [184].

Исследования показали, что конденсация в десятки тысяч раз ускоряет рекомбинацию [13, 14] и циклизацию ДНК [15]. Такое ускорение биохимических реакций позволило сделать предположение о роли конденсированного состояния ДНК в процессе добиологической эволюции [185]. Показано так же, что конденсация участвует в вирусной трансфекции [16-19], регуляции активности генов [20, 21, 114, 115], апоптозе [22, 23] и сохранении бактериального генома при неблагоприятных условиях внешней среды [24, 25], защищает бактериальную ДНК от воздействия радиации [26]. Конденсация ДНК *in vitro* является очень удобной модельной системой, которая позволяет изучать функционирование ДНК *in vivo*.

## 2. КОНДЕНСАЦИЯ ДНК *IN VIVO* В СОСТАВЕ ВИРУСОВ, БАКТЕРИЙ, СПЕРМАТОЗОИДОВ И ХРОМОСОМ.

### Конденсация ДНК внутри вирусов.

Вирус представляет собой молекулу ДНК или РНК, упакованную внутри белковой оболочки - капсулы. Как видно из таблицы, диаметр капсулы бактериофага Т4 почти в тысячу раз меньше длины вытянутой молекулы ДНК [1]. Упаковка ДНК внутри капсулы вируса настолько плотная, что транскрипция с нее в таком состоянии невозможна.

При мягком лизисе фагов образуются тороидальные частицы, состоящие из большого числа витков ДНК [27]. При помощи криоэлектронной микроскопии интактных фагов можно увидеть локально упорядоченные, уложенные параллельно, сегменты ДНК [28]. Было предложено несколько моделей упаковки ДНК внутри фага: 1) ДНК намотана в виде клубка, 2) ДНК уложена параллельно при помощи резких изломов, или 3) ДНК сложена в деформированный тороид, который полностью заполняет все предоставленное ему пространство [29]. Рентгеноструктурный анализ дает расстояние между соседними двойными спиралями ДНК внутри вирусной капсулы порядка 1-2 диаметров молекулы воды [30]. *In vitro* при таком расстоянии между молекулами при физиологической ионной силе ДНК образует жидкокристаллическую фазу [31]. Это позволяет сделать предположение о возможности жидкокристаллической упаковки ДНК *in vivo*.

Упаковка ДНК внутри фага осуществляется за счет работы, совершаемой мощным молекулярным мотором. Это белковый комплекс, который, вращая нить ДНК вокруг своей оси, вталкивает ее внутрь капсулы через отверстие, сравнимое с диаметром двойной спирали. Слово сжатая пружина, ДНК внутри фага обладает энергией упругости, и поэтому оказывает сильное давление на стенки капсулы [18]. В заполненном бактериофаге  $\Phi 29$ , например, внутреннее давление обуславливает силу порядка 50 pN [16], которой достаточно для инициации самостоятельного выхода ДНК из фага внутрь клетки-хозяина при инфицировании. Таким образом, первая стадия инфицирования может проходить без участия белков, и контролироваться осмотическим давлением, а так же соотношением концентраций противоионов внутри и вне капсулы [19]. Запасенной внутри фага  $\Phi 29$  энергии, однако, хватает лишь для выхода части нити ДНК [16, 18]. Таким образом, процесс вирусного инфицирования нельзя полностью свести к неспецифической электростатике. Важную роль играет и специфическое взаимодействие с белками [17].

### Конденсация ДНК внутри бактерий.

Внутри бактерий двуспиральная кольцевая ДНК, т.н. бактериальная хромосома, конденсирована в компактном образовании, нуклеоиде, где ее концентрация достигает 50-100 мг/мл. Это, однако, не означает плотную упаковку ДНК, поскольку занимаемый ею объем составляет меньше 10% от всего объема нуклеоида. Таким образом, физическое состояние нуклеоида близко к жидкому, существенно отличаясь от ДНК вирусов и эукариотических ядер [36]. Нуклеоид не имеет мембраны, и находится в непосредственном контакте с бактериальной цитоплазмой, которая представляет собой высоко концентрированный раствор макромолекул, в котором концентрация белков и РНК составляет примерно 300 мг/мл [32]. Почему нуклеоид, который не ограничен мембраной, не распределен по всей клетке? Это может быть обусловлено несколькими факторами. 1) Замкнутая кольцевая ДНК суперспирализована, и топология накладывает дополнительные ограничения на ее свободу [33]. 2) Окружающие ДНК макромолекулы оказывают осмотическое давление и уменьшают доступный ей объем [32]. 3) ДНК компактизуется при связывании с бактериальными белками [33], а так же полиаминами, алифатическими молекулами, которые присутствуют в клетках в миллимолярных концентрациях, и при физиологических рН положительно заряжены [35].

### Конденсация ДНК в хроматине.

Эукариотическая хромосома содержит одну очень длинную молекулу двуспиральной ДНК, которая упакована при помощи белков. Средняя длина ДНК одной хромосомы человека составляет около 2 сантиметров, таким образом все 46 хромосом дают суммарную длину ДНК около метра, что намного превышает линейные размеры клетки, и, тем более, клеточного ядра (см. таблицу). Упаковка ДНК реализуется на нескольких уровнях. Первым уровнем укладки является нуклеосома, которая включает 1.75 витка ДНК (147 пар оснований), намотанных на внешнюю поверхность белкового ядра, состоящего из восьми гистоновых белков. Миллионы "бусинок"-нуклеосом расположены вдоль всей хромосомной ДНК. "Нить с бусинками" затем многократно складывается и в результате достигается уменьшение линейных размеров ДНК по

сравнению с длиной хромосом в десятки тысяч раз [37]. Конденсированный хроматин недоступен для большинства регуляторных белков [38], поэтому для начала транскрипции участок ДНК должен перейти в деконденсированную, свободную от гистонов форму.

Нуклеотидная последовательность ДНК не только кодирует аминокислотный состав белков, но и несет сигнал, управляющий расположением нуклеосом [39, 40]. Таким образом, существуют генетически предопределенные участки генома с предпочтительными местами размещения нуклеосом. Такие участки могут кодировать, например, опухолевые белки. В нормальном состоянии эти участки генома "молчат" (gene silencing [20, 21]), но под действием окружающей среды (радиация, химические агенты) нуклеосомы могут сдвигаться, в результате чего ген "просыпается" и с него начинается транскрипция [42]. Такой механизм может быть вовлечен в процессы канцерогенеза и апоптоза (программируемой гибели клетки). То, что нуклеосома может передвигаться вдоль ДНК, показано экспериментально *in vitro* [41]; предложены модели для объяснения этого движения [42].

Аналогичная перестройка хроматина могла бы объяснять действие ряда антибиотиков и противоопухолевых медицинских препаратов, ковалентно связывающихся с ДНК. В этом случае препарат блокирует скольжение нуклеосомы, или, напротив, вызывает ее передвижение вдоль ДНК, и затем закрепляет на новой позиции, препятствуя транскрипции определенного гена [43].

### 3. КОНДЕНСАЦИЯ ДНК *IN VITRO*.

Эффект конденсации ДНК *in vitro* известен уже почти на протяжении 30 лет [44-46]. Если к водно-солевому раствору ДНК добавить многовалентные лиганды, например, природный полиамин спермидин, то в результате образуются компактные тороидальные частицы, которые напоминают ДНК, освобожденную из вирусных капсул мягким лизисом. При помощи рентгеноструктурного анализа показано, что двойные спирали ДНК в конденсированной фазе локально упорядочены и разделены всего одним-двумя слоями молекул воды [30].

Переход ДНК в конденсированное состояние изучался различными методами: седиментация [15], светорассеяние [47-49], вискозиметрия [50, 51], измерение осмотического давления [52], ИК-спектров [53, 54], УФ- и КД- спектров [55], комбинационное рассеяние [56, 57], дифференциальная сканирующая микрокалориметрия [58-60], криоэлектронная [61] и атомная силовая микроскопия [62-64]. Подробный обзор состояния данного вопроса на момент 1996 года дан в работах В. Блумфильда [1, 2]. Однако, эта область настолько стремительно развивается, что за прошедшие 6 лет был получен ряд принципиально новых результатов. Перечислим коротко основные факты, описанные в работах [1, 2] и последующих оригинальных сообщениях.

Конденсацию ДНК можно получить *in vitro* двумя способами. Первый способ - фазовое исключение молекул ДНК из водно-солевых растворов при добавлении нейтральных полимеров, например, полиэтилен гликоля [3, 4]. Второй способ - добавление в водно-солевой раствор ДНК многовалентных катионов, например, полиаминов или ионов металлов [1, 2].

Конденсация и агрегация. Конденсация ДНК высокой молекулярной массы в сильно разбавленных растворах представляет собой "сжатие" одной отдельной молекулы [45, 65], тогда как при конденсации ДНК низкой молекулярной массы каждая компактная частица включает в себя большое число молекул. Конденсация ДНК высокой молекулярной массы в растворах с высокой концентрацией ДНК может быть как мономолекулярным, так и межмолекулярным процессом. Термин "конденсация" обычно применяют в тех случаях, когда образуются агрегаты минимальных размеров, характеризующиеся упорядоченной структурой (см. ниже). Кроме этого, в некоторых работах термин "конденсация" употребляют в более узком смысле, в приложении лишь к процессу мономолекулярной компактизации, как противопоставление термину "агрегация", применяющемуся для описания структур, состоящих из нескольких молекул ДНК. В разбавленных растворах ДНК в определенных условиях можно наблюдать мономолекулярное сжатие и последующую межмолекулярную агрегацию [120].

$\psi$ -конденсация. Нейтральные полимеры, например, полиэтилен гликоль в большой концентрации в присутствии достаточно большого количества соли вызывают конденсацию ДНК по механизму исключенного объема. Как правило, ДНК при этом переходит в так называемую  $\psi$ -форму. (Аббревиатура  $\psi$  (*psi*) связана со способом получения: polymer-and-salt-induced.)  $\psi$ -ДНК характеризуется очень сильным возрастанием кругового дихроизма, характеризующим анизотропную упаковку спиралей в закрученные агрегаты [1, 2, 4].

Конденсация многовалентными катионами. В водном растворе при комнатной температуре конденсация ДНК вызывается катионами с валентностью +3 и больше. К ним относятся природные полиамины спермин<sup>4+</sup> и спермидин<sup>3+</sup> [13-15, 49, 64, 66], полилизин [62, 63, 67], синтетические полипептиды [6, 11, 68], белки хроматина (HMG1 [69, 70], HIF [71], BAF [72] и другие), а так же неорганические катионы, например Со(НН<sub>3</sub>)<sub>6</sub><sup>3+</sup> [73-75], и ионы трехвалентных металлов (La, Eu, Tb) [53, 54]. Синтезируются специальные конденсирующие агенты, например, металло-органические цилиндры, диаметр которых соответствует диаметру большой бороздки двойной спирали ДНК [166].

Ионы двухвалентных металлов конденсацию линейной двуспиральной ДНК в водных растворах вызывают. У этого правила есть, однако, ряд исключений. Во-первых, замкнутая суперспиральная ДНК конденсируется ионами  $Mn^{2+}$  в правильные тороидальные структуры. Суперспиральность при этом действует синергически с  $Mn^{2+}$ , образуя искривления двойной спирали, способствующие сближению сегментов ДНК, которые затем взаимодействуют друг с другом [1]. Во-вторых, в присутствии небольших количеств этанола ионы  $Ca^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  и  $Mn^{2+}$  вызывают агрегацию ДНК [76, 77]. В третьих, конденсация ДНК ионами  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  и  $Mn^{2+}$  возможна в двухмерной структуре, где слои ДНК чередуются со слоями катионного липида [78]. Именно двухмерность системы помогает в этом случае двухвалентным катионам конденсировать ДНК. Недавно конденсация poly(dG-dC)-(dG-dC) (но не poly(dA-dT)-(dA-dT)) наблюдалась в присутствии ионов  $Ni^{2+}$  [164]. В этом случае  $Ni^{2+}$  индуцирует переход ДНК в Z-конформацию, где плотность заряда двойной спирали меньше. В остальных ситуациях заряда, равного +2, для конденсации ДНК недостаточно.

ДНК-липидные комплексы. Комплексы ДНК с липидами представляют непосредственный интерес для генной терапии [10, 79-82]. При малых концентрациях липиды связываются с ДНК. Затем, при больших концентрациях липида происходит плавление липосом, индуцированное ДНК, в результате чего ДНК оказывается полностью или частично [62] инкапсулированной внутри липидной оболочки [1, 9]. Во многих случаях комплекс ДНК с липидами представляет собой жидкокристаллическую фазу.

Морфология конденсированных частиц. Конденсированные частицы часто имеют правильную тороидальную форму [64, 73, 83, 84, 9, 62]. Один виток ДНК, намотанной вокруг тороида с внешним радиусом 50 нм, составляет около 930 пар оснований. Электронная микроскопия указывает на то, что ДНК из молок лосося, упакованная с помощью протаминов, представляет собой тороидальную структуру с внутренним и внешним радиусами 7.5 и 45 нм соответственно, которая включает более 60 000 пар оснований [1]. Различные наблюдения свидетельствуют о том, что тороиды *in vitro* могут состоять как из одной длинной молекулы ДНК, так и из нескольких более коротких.

Тороиды - наиболее распространенная форма конденсированной ДНК. Существуют и другие формы. Однако, в присутствии в воде небольшого количества этанола, в результате конденсации, вызванной ионами  $Co(NH_3)_6^{3+}$ , образуются структуры, более похожие на палочки [64]. Спирт и многовалентные катионы действуют синергически, и вызывают локальную дестабилизацию двойной спирали. Эта дестабилизация позволяет спирали "складываться" и образовывать палочкообразные конденсаты. Добавление еще больших количеств спирта приводит к образованию разветвленных волокнистых агрегатов [64]. Вообще говоря, и в отсутствие спирта, ДНК, конденсированная при помощи многовалентных лигандов, образует как тороидальные, так и палочкообразные частицы, но равновесие сильно смещено в сторону тороидальной морфологии [162]. Кроме этого, наблюдали также промежуточные метастабильные конденсаты в форме теннисных ракеток [162-164].

Жидкие кристаллы. Короткие молекулы ДНК не образуют тороидальные агрегаты: их длина недостаточна для такой структуры. При очень больших концентрациях (около 200 мг/мл) молекулы ДНК длиной 200 пар оснований образуют жидкокристаллическую фазу [1, 31]. Этот переход обычно происходит в присутствии одновалентной соли и объясняется эффектом исключения объема. Жидкокристаллическая фаза может быть так же получена при добавлении к разбавленному раствору мононуклеосомной ДНК спермидина [46, 85, 185]. В этом случае образование упорядоченной фазы объясняется притяжением между параллельными спиралями. В сильно разбавленных растворах высокополимерная ДНК в присутствии четырехвалентного катиона спермина имеет КД-спектр, характерный для холестерической укладки  $\psi$ -ДНК (см. выше).

Показано, что морфология и структурные свойства жидкокристаллической укладки замкнутой двуспиральной ДНК во многом определяются ее топологией [33, 86, 87], что объясняет возможный механизм регуляции укладки ДНК в живых системах. *In vivo* ДНК существует в жидкокристаллической фазе внутри вирусов [27-29], митохондрий [33] и головок сперматозоидов [58]. Домены ДНК, находящейся в жидкокристаллической (холестерической) фазе, видны на электронных микрофотографиях хромосом [1]. *In vitro* локальная упорядоченность, соответствующая жидкокристаллической фазе, наблюдается практически во всех конденсированных формах ДНК [1-4].

Обратимость конденсации. Обратимость конденсации наблюдалась в большинстве экспериментов, описанных выше, вне зависимости от природы конденсирующих лигандов. Конденсированную ДНК можно деконденсировать простым растворением (уменьшается концентрация лигандов) или добавлением одновалентной соли [2]. Ионы  $Na^+$  конкурируют за связывание с многовалентными лигандами и при достаточно больших концентрациях вытесняют их с ДНК. Такого же эффекта можно добиться, если к раствору ДНК конденсированной при помощи лигандов, добавить вещество, связывающее лиганды сильнее, чем ДНК. Например, добавление РНК, которая имеет большую константу связывания с конденсирующими лигандами, приводит к деконденсации ДНК [160].

Зависимость от первичной структуры. Конденсация ДНК - общий механизм, который регулирует ее упаковку и не должен зависеть от первичной структуры. Действительно, на первых этапах исследований было показано, что вариации в последовательности нуклеотидов практически не оказывают влияния на структуру и размер конденсированных частиц [1, 2, 66]. Однако позднее было обнаружено, что конденсация синтетических дуплексов с разным GC-составом, например, poly(dG-dC)-(dG-dC) и poly(dA-dT)-(dA-dT) существенно

различается [164]. Теломерные участки геномной ДНК, включающие большое количество гуаниновых нуклеотидов, также имеют существенно отличную структуру конденсатов [165].

Регуляция биохимических реакций. Конденсация необходима для эффективной упаковки и защиты генома *in vivo*. Например, конденсация защищает бактериальную ДНК от воздействия радиации [26] и помогает сохраниться при неблагоприятных условиях внешней среды [24, 25]. В то же время, для транскрипции ДНК должна быть деконденсирована (по крайней мере, частично). Поэтому переходы между различными степенями компактизации вовлечены во многие биологические процессы. Конденсация ДНК *in vitro*, вызванная связыванием лигандов, является идеальной моделью для изучения роли конденсации *in vivo*.

Так, в 1982 году было показано, что конденсация *in vitro* ускоряет реакцию катенации (зацепления) замкнутых кольцевых ДНК [177]. Катенация - важная биохимическая реакция, необходима на различных этапах транскрипции. Она катализируется специальными ферментами, топоизомеразами.

В 1991 году было установлено, что конденсация ДНК резко ускоряет ренатурацию ДНК, т.е. ассоциацию комплиментарных нитей [13-14]. Эта химическая реакция имеет место *in vivo*, например, в ходе рекомбинации - одной из стадий митоза, на которой между цепями ДНК происходит обмен гомологичными однонитевыми участками. Большая стабильность двойной спирали в растворе определяет очень медленную кинетику такой реакции, несопоставимую со скоростью рекомбинации *in vivo*. Ускорение реакции за счет конденсации ДНК позволило объяснить это несоответствие.

Недавно было показано, что конденсация ДНК в десятки тысяч раз ускоряет реакцию циклизации [15]. ДНК фага  $\lambda$  представляет собой линейную двуспиральную молекулу, оканчивающуюся так называемыми "липкими хвостами" - комплиментарными однонитевыми участками, состоящими из 12 пар оснований. Липкие концы могут "склеиваться", и тогда образуется замкнутая, кольцевая форма молекулы. Циклизация наблюдается *in vivo*: внутрь головки бактериофага  $\lambda$  включена линейная ДНК, которая при внедрении в клетку в течении нескольких минут замыкается в кольцо. В конденсированном состоянии скорость циклизации возрастает на 6 порядков по сравнению с ДНК в растворе [15].

Эффект конденсации-деконденсации. В 1996 году было обнаружено, что ДНК агрегирует при достижении в растворе критической концентрации лигандов (спермин<sup>4+</sup> или спермидин<sup>3+</sup>), но при дальнейшем увеличении концентрации существует вторая критическая точка, где происходит обратный переход - агрегаты полностью растворяются [185]. При достижении первой критической концентрации лигандов индивидуальные молекулы ДНК образуют конденсированные частицы, которые затем агрегируют. При дальнейшем увеличении концентрации лигандов в растворе существует вторая критическая концентрация, где агрегаты растворяются, а индивидуальные молекулы ДНК деконденсируются. Аналогичный эффект наблюдался так же для однонитевых олигонуклеотидов [155] в присутствии полиаминов; раствора нуклеосомальных частиц [161], хроматинового волокна [162] и филаментарных вирусов [159] в присутствии ионов двухвалентных металлов. Описанные выше эксперименты осуществлялись при помощи светорассеяния или метода радиоактивных меток, когда детектировать можно не конденсацию отдельных макромолекул, а обусловленную ею агрегацию многих молекул ДНК. В 2003 году при помощи экспериментов по растяжению одной молекулы ДНК, погруженной в раствор с меняющейся концентрацией лигандов, было показано, что эффект конденсации-деконденсации проявляется именно на уровне одиночных молекул [164]. Предложено несколько возможных объяснений этого эффекта (см. след. параграф), но в целом природа эффекта конденсации-деконденсации остается непонятной и требует дополнительного изучения.

#### 4. ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ОПИСАНИЮ КОНДЕНСАЦИИ ДНК.

Конденсация ДНК напоминает формирование белковой глобулы (фолдинг). Однако, в отличие от белков, размеры и форма глобулы ДНК практически не зависит от первичной структуры [2]. Таким образом, расчет компактизации ДНК и белков - различные задачи. Если фолдинг белка в настоящее время рассчитывается на суперкомпьютерах, то задачу о конденсации ДНК можно попытаться решить аналитически.

Статистическая физика полимеров. С точки зрения физики полимеров, конденсация ДНК представляет собой частный случай перехода от разупорядоченного клубка, средний размер которого  $r \sim \sqrt{l}$ , где  $l$  - длина цепи, к упорядоченной глобуле [118].

Первые работы, использующие подходы статистической физики полимеров для описания конденсации ДНК, появились в конце 70-х - начале 80-х годов. Так, Пост и Зимм впервые рассмотрели коллапс (сжатие) одиночной молекулы ДНК [119], а затем конкуренцию внутримолекулярного коллапса и межмолекулярной агрегации [120]. Они использовали формализм Флори [112]. Этот подход заключается в вычислении свободной энергии системы из  $n_1$  молекул растворителя и  $n_2$  молекул ДНК. По аналогии с уравнением газа Ван-дер-Ваальса вводятся вириальные коэффициенты, отражающие существование объемных взаимодействий. Флори рассматривал два первых коэффициента; Пост и Зимм включили третий коэффициент для того, чтобы учесть высокую локальную концентрацию полимерных сегментов в конденсированной фазе. Вириальные коэффициенты выражаются через феноменологический параметр  $\chi$ , который учитывает разницу в энергиях взаимодействия ДНК-ДНК, растворитель-растворитель и ДНК-растворитель. Минимизируя свободную энергию

по  $n_1$  и  $n_2$ , можно получить выражение для химических потенциалов  $\mu_1$  и  $\mu_2$ , растворителя и ДНК. Если  $\chi > 1/2$ , зависимость химического потенциала от концентрации ДНК принимает немонотонный вид, что указывает на сосуществование фаз. Можно выделить три фазы: разупорядоченный клубок, глобула и агрегат. Пост и Зимм показали [120], что равновесным состоянием для ДНК является агрегат, состоящий из многих глобул.

Другой формализм разработан И. М. Лифшицем и его учениками А. Ю. Гроссбергом и А. Р. Хохловым. Для работ этой школы характерно использование оператора линейной памяти  $g$ , при помощи которого удается аналитически рассчитать конфигурационную энтропию цепи  $S$  [118]. Затем вычисляется энергия системы  $E$  как функция свойств ДНК, растворителя и геометрических (статистических) размеров глобулы. После чего авторы минимизируют свободную энергию  $\Delta F = E - TS$  и находят равновесные характеристики системы. Следует заметить, что вычисление  $E$  является нетривиальной задачей, и зависит от выбора энергетических составляющих, которыми нельзя пренебречь. Так, в работе [121]  $E$  идентифицируется с поверхностной энергией глобулы. Конкуренция  $S$  и  $E$  в этом случае вызывает поверхностное натяжение, которое определяет геометрию системы: тороид (с дыркой внутри) в случае относительно коротких цепей и сферическая глобула для очень длинных цепей ДНК. В случае замкнутой кольцевой ДНК [122] существенную роль играет энергия эластической деформации, определяемая ее топологией. Учет торсионной жесткости уменьшает радиус тороида, образованного конденсированной кольцевой ДНК. В более общем случае Гроссберг и Жестков [123] вводят три составляющие свободной энергии:  $F = F_{\text{comp}} + F_{\text{rep}} + F_{\text{elas}}$ , где  $F_{\text{rep}}$  - энергия объемных взаимодействий ДНК (расталкивание), рассчитываемая при помощи подходов физики жидких кристаллов;  $F_{\text{elas}}$  - энергия упругости цепи;  $F_{\text{comp}}$  - энергия сжатия, обусловленного (а) непроницаемыми стенками микрополости, (б) плохим низкомолекулярным растворителем или (в) нейтральным полимером. Во всех трех случаях, оставаясь в рамках теорий среднего поля, авторы вводят соответствующий эффективный потенциал взаимодействия.

Наиболее значимый результат, полученный в рамках подходов Флори-Поста-Зимма и Лифшица-Гроссберга-Хохлова заключается в том, что для жестких полимеров, каковым является двуспиральная ДНК, переход клубок-глобула является фазовым переходом первого рода. Этот вывод теории был подтвержден экспериментально при помощи флуоресцентной микроскопии одиночных молекул ДНК, конденсированных катионным поверхностно-активным веществом ЦТАБ [102, 105].

Подходы, описанные выше, имеют, однако, ряд ограничений. Во-первых, рассматривается система всего из двух элементов, ДНК и растворитель. Поэтому, фазовый переход может быть вызван либо изменением температуры (что не интересно с биологической точки зрения), либо изменением "качества" растворителя  $\chi$  (что не отражает реальную природу взаимодействий), либо изменением концентрации ДНК (что может быть достигнуто в экспериментах *in vitro*, но вряд ли имеет отношение к процессам *in vivo*). Напротив, наиболее часто возникает ситуация, когда конденсацию вызывает изменение концентрации лигандов, то есть третьего элемента по отношению к ДНК и растворителю.

Более того, существует и четвертый элемент в системе - одновалентные ионы, которые сами по себе вызвать конденсацию двуспиральной ДНК не могут, но сильно влияют на конденсацию, вызванную многовалентными катионами. Вообще говоря, конденсация ДНК - процесс существенно электростатический, и корректно описать его, рассматривая взаимодействие нейтрального полимера с растворителем, как это сделано выше, затруднительно.

Электростатические подходы. ДНК является одним из наиболее сильно заряженных полиэлектролитов. При физиологических условиях остатки фосфорной кислоты полностью депротонированы, так что на каждую пару оснований (3.4 А) приходится по 2 отрицательных заряда. Электростатика играет существенную роль в функционировании ДНК *in vivo*. В составе живых систем она находится в окружении заряженных белков, полиаминов, ионов двухвалентных и щелочных металлов.

В целом эта смесь ионов электронейтральна, что позволило Аррениусу в 1887 году предположить, что ее электростатическая энергия равна нулю [124]. Сегодня мы знаем, что это не так, поскольку заряд не распределен равномерно внутри всего объема, а пространственно скоррелирован.

Первыми попытались учесть корреляцию зарядов Дебай и Хюккель в 1923 году [125]. Они рассмотрели сферический ион в окружении сферических же противоионов, и показали, что электростатический потенциал центрального заряда экспоненциально экранируется окружающим ионным облаком.

В 1949 году Скэтчард [88] рассмотрел простейшую, но весьма эффективную модель электростатического связывания малых противоионов с заряженной макромолекулой (белком). Он предположил, что электростатическая энергия этой системы не зависит от распределения противоионов вдоль макромолекулы. Это позволило ввести эффективный потенциал взаимодействия между противоионами, связанными с макромолекулой, который зависит только от количества связавшихся противоионов. В 70-х годах этот метод успешно применялся для описания связывания ионов двухвалентных металлов с ДНК [89-91, 97-100]. При этом предполагалось, что изначально имеется "голая" ДНК, которая затем связывает противоионы. Однако, такая ДНК без противоионов обладала бы настолько сильным зарядом, что водородные связи не смогли бы удержать одинаково заряженные комплиментарные нити ДНК.

В конце 70-х годов Маннинг, рассмотрев простую модель бесконечно тонкого заряженного стержня, пришел к выводу, что ДНК составляет единое целое с оболочкой из связанных, "конденсированных" противоионов [126], которая уменьшает плотность заряда ДНК. Это уменьшение зависит от валентности

противоионов и изначальной плотности заряда. В случае В-ДНК нейтрализовано 76, 88, 92 и 94% первоначального заряда ДНК соответственно моно-, ди-, три- и тетравалентными катионами.

Итак, в растворе противоионов линейная плотность заряда В-ДНК составляет не 1 отрицательный заряд на 1.7 А, а меньше. Тем не менее, она остается отрицательно заряженной. Каким же образом можно объяснить притяжение между одинаково заряженными участками ДНК в конденсированной фазе?

В 1968 году Оосава [127] показал, что если флуктуации плотности заряда вдоль двух параллельных участков полимера скоррелированы, то в результате одинаково заряженные макромолекулы могут притягиваться друг к другу. Оосава предположил, что тепловые флуктуации могут вызывать разделение зарядов, скоррелированное между обеими макромолекулами - механизм, напоминающий Ван-дер-Ваальсовское взаимодействие. На данный момент предложены и другие механизмы, объясняющие возникновение пространственных корреляций заряда [128]:

1) Квазикристаллическое расположение ионов вдоль ДНК [129-132]. Эта концепция пришла из квантовой физики, где при низких температурах известен эффект организации заряженных частиц в т.н. вигнеровский кристалл. Если противоионы расположены периодически вдоль каждой из двух соседних двойных спиралей ДНК, то в результате электростатических взаимодействий они могут перераспределиться таким образом, чтобы напротив положительного иона, связанного с одной молекулой ДНК, на другой молекуле ДНК была отрицательная "дырка" (отсутствие противоиона). Пары ион-"дырка" порождают локальное притяжение. Если противоионов достаточно много, то между двумя параллельными молекулами ДНК преобладают силы притяжения [131].

2) Специфическое связывание противоионов, определяемое геометрией двойной спирали [133]. Двойная спираль ДНК имеет так называемые "большую" и "малую" бороздки, которые тянутся вдоль оси спирали. Плотность заряда вдоль каждой из бороздок и вне их различается. Таким образом, существует спирально симметричное распределение плотности зарядов, которое определяет симметрию связывания противоионов. Для двух параллельных молекул ДНК распределение противоионов вдоль каждой из них имеет одинаковый периодический характер. Например, напротив бороздки одной спирали ДНК (с большей электронной плотностью, и, соответственно, большим числом связанных противоионов) всегда идет гребень другой спирали (где количество связанных противоионов меньше). Это определяет суммарное притяжение макромолекул.

3) Связывающиеся противоионы могут перезаряжать ДНК, то есть менять знак ее заряда на положительный [130]. В этом случае две соседние макромолекулы в растворе противоионов могут заряжаться по-разному из-за скоррелированного распределения противоионов: одна положительно, другая отрицательно, и они притягиваются друг к другу. Этот механизм напоминает ковалентное связывание в атомных системах, где макромолекулы обобществляют между собой связанные противоионы [128].

Построение электростатической теории конденсации ДНК на базе скоррелированных флуктуаций противоионов началось в 1995-96 гг. в независимых работах М. Олвера де ла Круз [132, 134-137] и Ю. Роузиной [129, 130]. Разработка этих подходов продолжается и в настоящий момент [140, 141]. В рамках этих подходов ДНК рассматривается в виде заряженного стержня или цилиндра, а лиганды - в виде точечных или сферических ионов. Обзоры данного вопроса даны в работах [138, 139].

Следующим шагом на пути к построению электростатической теории является учет геометрии двойной спирали при описании взаимодействия ДНК-противоион-ДНК. Такой анализ, проводится в работах А. А. Корнищева, С. Лейкина и их соавторов [133, 142-144]. Они исследовали, как поверхность макромолекулы структурирует окружающее ее ионное облако и молекулы воды. При использовании методики измерения осмотического давления, разработанной А. В. Парсегином и его сотрудниками [52, 145-148], теоретические расчеты можно сравнить с экспериментом, и сделать вывод о вкладе такого структурирования в общий потенциал взаимодействия между двумя двойными спиральями [149-151].

Практически все современные электростатические подходы объясняют конденсацию ДНК при достижении критической концентрации лигандов в растворе преобладанием сил притяжения, обусловленных скоррелированными флуктуациями противоионов над электростатическим отталкиванием.

Деконденсация при высоких концентрациях лигандов объясняется в рамках электростатических подходов экранированием заряда макромолекулы ДНК. Экранирование при высоких концентрациях лигандов уничтожает корреляционный эффект и тогда результирующие силы между соседними молекулами ДНК становятся силами отталкивания. В результате ДНК деконденсируется [137]. Другое объяснение деконденсации базируется на предположении о возможности перезарядки ДНК при связывании лигандов. ДНК находится в неконденсированном состоянии в отсутствие лигандов, поскольку отрицательно заряженные двойные спиральи отталкиваются. В конденсированной фазе заряд ДНК почти полностью компенсируется связавшимися лигандами. При связывании дополнительных лигандов заряд ДНК меняет знак, теперь уже положительно заряженные макромолекулы расталкиваются, и происходит деконденсация [130].

Наиболее значимый результат, полученный в рамках электростатических подходов - объяснение природы притяжения между отрицательно заряженными молекулами ДНК в конденсированной фазе. С другой стороны, эти подходы не позволяют учитывать сайт-специфическое связывание, реальные размеры лигандов, возможность изменения стехиометрии связывания при переходе ДНК в конденсированную фазу. Такой учет возможен в рамках т.н. "лигандных" подходов.

Лигандные подходы. "Лигандный" формализм был разработан для описания связывания малых молекул и ионов с белками и ДНК [92-95, 169], а так же для описания перехода спираль-клубок ДНК в составе комплексов [101, 167, 168].

Переходы "спираль-клубок", то есть денатурация двойной спирали и "клубок-глобула", то есть конденсация ДНК, представляют собой совершенно разные физические процессы. Однако, оба они могут быть описаны в рамках модели Изинга. В случае конденсации ДНК, каждая молекула может быть либо конденсированной, либо нет, а каждый лиганд может быть либо связан с ДНК либо нет. Такой подход применяет, например, в своих недавних работах Д. Поланд [153] для описания конформационных переходов в макромолекулах, вызванных связыванием лигандов. Поланд рассматривает изменение конформации белка, при котором исходное и конечное состояния макромолекулы имеют различные константы связывания и различное число мест связывания лигандов. Увеличение концентрации лигандов в растворе, приводит к конформационному переходу белка при критической концентрации. Обратного перехода при дальнейшем увеличении концентрации лигандов Поланд не рассматривал.

В 1991 году Д. Поршке исследовал связывание протамина с ДНК при помощи формализма Мак Ги и фон Хиппеля [95]. Он рассмотрел образование шивок молекулами протамина между двумя соседними двойными спиральями. При больших концентрациях протамина сайтов связывания на конденсированной ДНК уже не остается, и поэтому белок связывается с неконденсированной формой ДНК - происходит деконденсация. Поршке, однако, делает в своей статье утверждение, что данная модель неприменима к конденсации ДНК, поскольку нет соответствия с экспериментальными данными [154]. Действительно, в 1991 году эффект конденсации-деконденсации не был еще экспериментально обнаружен. Лишь в 1996 году в статье Ж.-Л. Сикорава и соавторов [155] было экспериментально показано, что первая критическая концентрация лигандов вызывает конденсацию ДНК, а при дальнейшем увеличении концентрации происходит деконденсация. К этому моменту уже были сформированы основные представления об электростатике конденсации, и поэтому дальнейшая интерпретация экспериментальных результатов пошла по электростатическому пути [156-158].

Попытки объединить электростатический и лигандный подход в применении к конденсации ДНК предпринимались в работах [136, 137, 140, 141, 152]. Так, М. Олвера де ла Круз и Ф. Солис рассмотрели связывание противоионов с двумя различными состояниями ДНК [136, 137]. Каждое состояние ДНК характеризуется своей энергией, которая зависит от степени заполнения многовалентными противоионами и ионами  $\text{Na}^+$ . Деконденсация, как и в других электростатических подходах, объясняется экранированием заряда ДНК при больших концентрациях многовалентных противоионов. Ионы в этих работах моделируются сферами малого радиуса (соизмеримого с расстоянием между парами оснований ДНК). Этот радиус предполагается неизменным.

Неизменность ионного радиуса лигандов, однако, ставит под сомнение работа [159], где экспериментально рассмотрена компактизация филаментарного вируса под действием ионов двухвалентных металлов - система, с точки зрения электростатики, идентичная конденсации ДНК. Авторы экспериментально наблюдают эффект конденсации и последующей деконденсации, затем они строят электростатическую модель и пытаются получить такой же эффект при помощи компьютерного моделирования методом Монте-Карло. Однако, компьютерное моделирование в случае неизменного ионного радиуса лигандов дает лишь один переход - конденсацию. Для того же, чтобы получить второй переход - деконденсацию - авторам приходится предположить, что ионный радиус с увеличением концентрации лигандов изменяется (уменьшается). Это означает изменение стехиометрии связывания. Корректно учесть этот эффект в рамках электростатики затруднительно. Такой учет может быть осуществлен лишь в рамках лигандного подхода.

В наших работах были предложены два подхода к описанию конденсации ДНК. В обоих подходах конденсация вызывается обратимым связыванием с ДНК малых молекул или ионов (лигандов). Первый подход основан на модели "одного состояния", где константа связывания является зависимой от степени заполнения ДНК лигандами [178, 179]. В рамках этой модели возникают запрещенные степени заполнения ДНК лигандами, и в результате при критической концентрации лигандов происходит скачок степени заполнения ДНК лигандами, который представляет собой адсорбционный фазовый переход первого рода. Результаты компьютерного моделирования показывают, что такой переход возможен только в том случае, если *все* лиганды, адсорбированные на макромолекуле ДНК, взаимодействуют друг с другом. Ни контактное взаимодействие между соседними лигандами, ни взаимодействие между лигандами, разделенными несколькими парами оснований, такой эффект сами по себе вызвать не могут, хотя могут резко уменьшать критическую величину взаимодействия между всеми лигандами, необходимую для возникновения фазового перехода.

Пример взаимодействия, охватывающего все лиганды, связанные с макромолекулой ДНК - адсорбция на двуспиральной ДНК ионов двухвалентных металлов. При связывании катионов с отрицательно заряженной ДНК плотность заряда двойной спирали уменьшается. В результате связывание следующего катиона (вне зависимости от его положения вдоль ДНК) менее выгодно, и константа связывания линейно уменьшается с увеличением степени заполнения ДНК лигандами, т.е. связывание является антикооперативным [89-91]. Однако, для возникновения фазового перехода необходимо наоборот увеличение константы связывания с возрастанием степени заполнения. Хотя *антикооперативное* взаимодействие ионов двухвалентных металлов с двойной спиралью ДНК не может вызвать фазовый переход, абсолютное значение энергии этого



взаимодействия достигает критического значения, необходимого для возникновения фазового перехода в рамках модели одного состояния [178, 179]. Это означает, что при смене знака взаимодействия между адсорбированными лигандами могут реально существовать системы [164, 176-178], в которых взаимодействие между ионами обладает достаточной энергией для возникновения фазовых конденсационных переходов.

Любопытно, что в случае однонитевой ДНК связывание ионов двухвалентных металлов с азотистыми основаниями характеризуется положительной кооперативностью [96-99]. Анализ экспериментальных зависимостей эффективной константы связывания от степени заполнения ДНК лигандами в рамках предложенного нами метода [179] показывает, что эта кооперативность эквивалентна контактному взаимодействию между соседними лигандами. Контактная кооперативность объясняется образованием ионами металлов сшивок между удаленными участками однонитевых ДНК, которым выгоднее образовываться блоками, чтобы не уменьшать энтропию нитей ДНК за счет образования большого числа петель [180]. В результате при достаточно больших концентрациях ионов металлов ДНК может агрегировать. Этот переход происходит плавно, в отличие от скачкообразной конденсации двуспиральной ДНК [179].

В другом подходе, предложенном нами для описания конденсации ДНК, используется модель "двух состояний" [181]. В этой модели предполагается, что молекулы ДНК могут находиться в двух состояниях, конденсированном и неконденсированном. Связывание лигандов с каждым из состояний ДНК характеризуется своей константой связывания и стехиометрическими параметрами. Расчеты показали, что если энергии двух форм ДНК (на пару оснований) различаются более чем на 1% энергии теплового движения, то в отсутствие лигандов ДНК находится в устойчивом линейном состоянии, а при добавлении их критической или более высокой концентрации происходит переход в устойчивое конденсированное состояние. Для того, чтобы лиганды вызвали конденсацию, константа связывания с конденсированной формой должна быть больше чем для линейной ДНК.

С помощью данной модели удалось объяснить экспериментально наблюдаемый эффект конденсации-деконденсации: конденсацию ДНК при умеренных концентрациях лигандов, и последующее растворение конденсированной ДНК при больших концентрациях. Этот эффект возникает в том случае, если стехиометрические характеристики комплекса лигандов с ДНК таковы, что неконденсированная молекула ДНК может связать больше лигандов, чем конденсированная [182]. Это является принципиально новым механизмом, который дополняет подходы, изложенные выше.

Рассчитанные в рамках модели двух состояний кривые конденсации (зависимость степени конденсации ДНК от концентрации лигандов) хорошо описывают экспериментальные кривые для конденсации двухнитевой и однонитевой ДНК спермином<sup>4+</sup> в присутствии различных концентраций Na<sup>+</sup> [183]. Результаты расчетов объясняют экспериментальные зависимости конденсации от длины ДНК и концентрации Na<sup>+</sup> в растворе. Данный метод расчета конденсации ДНК может использоваться для поиска новых, более эффективных, конденсирующих агентов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Bloomfield, V. A., (1996), *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **6**, 334-341.
2. Bloomfield, V. A., (1997), *Biopolymers*, **44**, 269-284.
3. de Vries, R., (2001), *Biophys. J.*, **80**, 1186-1194.
4. Скуридин, С. Г., Дембо, А. Т., Ефимов, В. С., Евдокимов, Ю. М., (1999), *ДАН СССР*, **365**, 400-402.
5. Montigny, W. J., Houchens, C. R., Illenye, S., Gilbert, J., Coonrod, E., Chang, Y.-C., Heintz, N. H., (2001), *Nucl. Acid. Res.*, **29**, 1982-1988.
6. Kakizawa, Y., Harada, A., Kataoka, K., (2001), *Biomacromolecules*, **2**, 491-497.
7. Junghans, M., Kreuter, J., Zimmer, A., (2001), *Nucl. Acid. Res.*, **28**, 2-8.
8. Duguid, J. G., Li, C., Shi, M., Logan, M. J., Alila, H., Rolland, A., Tomlinson, E., Sparrow, J. T., Smith, L. C., (1998), *Biophys. J.*, **74**, 2802-2814.
9. Dunlap, D. P. Maggi, A., Soria, M. R., Monaco, L., (1997), *Nucl. Acid. Res.*, **25**, 3095-3101.
10. Schmutz, M., Durand, D., Debin, A., Palvadeau, Y., Etienne, A., Thierry, A. R., (1999), *Proc. Natl. Acad. USA*, **96**, 12293-12298.
11. Vijayanathan, V., Thomas, T., Thomas, T. J. (2002), *Biochemistry*, **41**, 14087-14094.
12. Yevdokimov, Yu. M., Salyanov, V. I., Lortkipanigze, G. B., Gedig, E., Spener, F., Palumbo, M., (1998), *Biosensors and Bioelectronics*, **13**, 279-291.
13. Sikorav, J.-L., Church, G. M. J., (1991), *J. Mol. Biol.*, **222**, 1085-1108.
14. Chaperon, I., Sikorav, J.-L. (1998), *Biopolymers*, **46**, 195-200.
15. Jary, D., Sikorav, J.-L., (1999), *Biochemistry*, **38**, 3223-3227.
16. Kindt, J., Tzllil, S., Ben-Shaul, A., Gelbart, W. M., (2001), *Proc. Natl. Acad. USA*, **98**, 13671-13674.
17. Pesavento, J. B., Lawton, J. A., Estes, M. K., Prasad, B. V. V., (2001), *Proc. Natl. Acad. USA*, **98**, 1381-1386.
18. Smith, D. E., Tans, S. J., Smith, S. B., Grimes, S., Anderson, D. L., Bustamante, C., (2001), *Nature*, **413**, P. 748-752.
19. Mrevlishvili, G. M., Mdzinarashvili, T., Al-Zaza, M., Tsinadze, L., Tushishvili, D., Razmadze, G., (1999), *Pure Appl. Chem.*, **71**, 1291-1299.
20. Cockell, M., Gasser, S. M., (1999), *Curr. Opin. Genet. Develop.*, **9**, 199-205.
21. Ansari, A., Gartenberg, M. R., (1999), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 343-348.
22. Dobrucki, J., Darzynkiewicz, Z., (2001), *Micron.*, **32**, 645-652.
23. Liu, X., Li, P., Widlak, P., Zou, H., Luo, X., Garrard, W. T., Wang, X., (1998), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 8461-8466.
24. Minsky, A., Shimoni, E., Frenkiel-Krispin, D., (2002), *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **3**, 50-60.
25. Wolf, S. G., Frenkiel, D., Arad, T., Finkel, S. E., Kolter, R., Minsky, A., (1999), *Nature*, **400**, 83-85.
26. Levin-Zaidman, S., Englander, J., Shimoni, E., Sharma, A. K., Minton, K. W., Minsky, A., (2003), *Science*, **299**, 254-256.
27. Klimentko, S. M., Tikchonenko, T. I., Andreev, V. M., (1967), *J. Mol. Biol.*, **23**, 523-533.
28. Lepault, J., Dubochet, J., Baschong, W., Kellenberger, E., (1987), *EMBO J.*, **6**, 1507-1512.
29. Hud, N. V., (1995), *Biophys. J.*, **69**, 1355-1362.
30. Schellman, J. A., Parthasarathy, N. J., (1984), *J. Mol. Biol.*, **175**, 313-329.
31. Strzelecka, T.E., Davidson, M.W., Rill, R.L., (1988), *Nature*, **331**, 457-465.
32. Zimmerman, S. B., Murphy, L. D., (1996), *FEBS Lett.*, **390**, 245-248.
33. Reich, Z., Levin-Zaidman, S., Gutman, S. B., Arad, T., Minsky, A., (1994), *Biochemistry*, **33**, 14177-14184.
34. Pettijohu, D. E., (1988), *J. Biol. Chem.*, **268**, 12793-12796.
35. Thomas, T., Thomas, T. J., (2001), *Cell. Mol. Life Sci.*, **58**, 244-258.
36. Odijk, T., (2002), "DNA and Chromosomes: Physical and Biological Approaches". Second International Summer School. Cargese, France, August 12-24, 2002.
37. Widom, J., (2002), "DNA and Chromosomes: Physical and Biological Approaches. Second International Summer School". Cargese, France, August 12-24, 2002.
38. Beato, M., Eisfeld, K., (1997), *Nucleic. Acids Res.*, **25**, 3559-3563.
39. Davey, C., Pennings, S., Meersseman, G., Wess, T. J., Allan, J., (1995), *Proc. Natl. Acad. USA*, **95**, 11210-11214
40. Trifonov, E. N., (1998), *Physica A*, **249**, 511-516.
41. Meersseman, G., Pennings, S., Bradbury, E. M., (1992), *EMBO J.*, **11**, 2951-2959.
42. Becker, P. B., (2002), *EMBO J.*, **21**, 4749-4753.
43. Teif, V. B., Vorob'ev, V. I., Lando, D. Y., (2002), *Europ. J. Human Genet.*, **10**(1), 104.
44. Gosule, L. C., Schellman, J. A., (1976), *Nature*, **259**, 333-335.
45. Lerman, L. S., (1971), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **68**, 1886-1890.
46. Laemmli, U. K., (1975), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 4288-4292.
47. Wilson, R., Bloomfield, V. A., (1978), *Biochemistry*, **18**, 2192-2196.
48. Bloomfield, V. A., He, S., Li, A.-Z., Arscott, P. B., (1990), *Biochem. Soc. Trans.*, **19**, 496.
49. Vijayanathan, V., Thomas, T., Shirahata, A., Thomas, T. J., (2001), *Biochemistry*, **40**, 13644-13651.
50. Kasyanenko, N., Arikainen, N., Frisman, E., (1998), *Biophys. Chem.*, **70**, 93-100.

51. Слонитский, С. В., Купцов, В. Ю., (1989), *Молекулярная биология*, **23**, 507-517.
52. Parsegian, V. A., Rand, R. P., Rau, D. C., (2000), *Proc. Natl. Acad. USA*, **97**, 3987-3992.
53. Tajmur-Riahi, H.-A., Ahmad, R., Naoui, M. J., (1993), *J. Biomol. Struct. Dynam.* **10**, 865-877.
54. Ahmad, R., Naoui, M., Neault, J. F., Dimantoglou, S., Tajmur-Riahi, H. A., (1996), *J. Biomol. Struct. Dynam.*, **13**, 795-802.
55. Votavova, H., Kucerova, D., Felsberg, J., Sponar, J., (1986), *J. Biomol. Struct. Dynam.*, **4**, 477-489.
56. Duguid, J., Bloomfield, V. A., Benevides, J. M., Thomas, G. J. Jr., (1993), *Biophys. J.*, **65**, 1916-1928.
57. Duguid, J., Bloomfield, V. A., Benevides, J. M., Thomas, G. J. Jr., (1995), *Biophys. J.*, **69**, 2623-2641.
58. Grasso, D., Gabriele-Campisi, R., (1993), *Liquid Crystals.*, **15**, 701-708.
59. Kagemoto, A., Nakazaki, M., Kimura, S., Momohara, Y., Ueno, K.-I., Baba, Y., (1996), *Thermochim. Acta.*, **286**, 309-324.
60. Esposito, D., Vecchio, P. D., Barone, G. J., (1997), *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 2606-2613.
61. Hud, N. V., Downing, K. H., (2001), *Proc. Natl. Acad. USA*, **98**, 4925-4930.
62. Golan, R., Pietrasanta, L. I., Hsieh, W., Hansma, H. G., (1999), *Biochemistry*, **38**, 14069-14076.
63. Hansma, H. G., Golan, R., Hsieh, W., Lollo, C. P., Mullen-Ley, P., Kwoh, D., (1998), *Nucl. Acid. Res.*, **26**, 2481-2487.
64. Lin, Z., Wang, C., Feng, X., Liu, M., Li, J., Bai, C., (1998), *Nucleic Acids Research*, **26**, 3228-3234.
65. Widom, J., Baldwin, R. L., (1983), *Biopolymers*, **22**, 1595-1620.
66. Deng, H., Bloomfield, V. A., Benevides, J. M., Thomas, G. J. Jr., (2000), *Nucl. Acid. Res.*, **28**, 3379-3385.
67. Lai, E., van Zanten, J. H., (2001), *Biophys. J.*, **80**, 864-873.
68. Smith, L. C., Duguid, J., Wadhwa, M. S., Logan, M. J., Tung, C. H., Edwards, V., Sparrow, J. T., (1998), *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **30**, 115-131.
69. Polyanichko, A. M., Chikhirzhina, E. V., Skvortsov, A. N., Kostyleva, E. I., Colson, P., Houssier, C., Vorob'ev, V. I., (2002), *J. Biomol. Struct. Dynam.*, **19**, 1053-1062.
70. Slama-Schwok, A., Zakrzewska, K., Leger, G., Leroux, Y., Takahashi, M., Kas, E., Debey, P., (2000), *Biophys. J.*, **78**, 2543-2559.
71. Ali, B. M. J., Amit, R., Braslavsky, I., Oppenheim, Gileadi, O., Stavans, J., (2001), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 10658-10663.
72. Zheng, R., Ghirlando, R., Lee, M. S., Mizuuchi, K., Krause, M., Craigie, R., (2000), *Proc. Natl. Acad. USA*, **97**, 8997-9002.
73. Deng, H., Bloomfield, V. A., (1999), *Biophys. J.*, **77**, 1556-1561.
74. Matulis, D., Rouzina, I., Bloomfield, V. A., (2000), *J. Mol. Biol.*, **296**, 1053-1063.
75. Kankia, B. I., Buckin, V., Bloomfield, V. A., (2001), *Nucl. Acid. Res.*, **29**, 2795-2801.
76. Duguid, J. G., Bloomfield, V. A., (1995), *Biophys. J.*, **69**, 2642-2648.
77. Kornilova, S., Hackl, E., Kapinos, L., Andrushchenko, V. Blagoi, Yu., (1998), *Acta. Biochim. Pol.*, **45**, 107-117.
78. Koltover, I., Wagner, K., Safinya, C. R., (2000), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 14046-14051.
79. Kennedy, M. T., Pozharski, E. V., Rakhmanova, V. A., MacDonald, R. C., (2000), *Biophys. J.*, **78**, 1620-1633.
80. Simberg, D., Danino, D., Talmon, Y., Minsky, A., Ferrari, M. E., Wheeler, C. J., Barenholz, Y., (2001), *J. Biol. Chem.*, **276**, 47453-47459.
81. Dias, R. S., Lindman, B., Miguel, M. G., (2002), *J. Phys. Chem. B.*, **106**, 12608-12612.
82. May, S., Harries, D., Ben-Shaul, A., (2000), *Biophys. J.*, **78**, 1681-1697.
83. Arscott, P. G., Li, A.-Z., Bloomfield, V. A., (1990), *Biopolymers*, **30**, 619-630.
84. Plum, G. E., Arscott, P. G., Bloomfield, V. A., (1990), *Biopolymers*, **30**, 631-643.
85. Sikorav, J.-L., Pelta, J., Livolant, F., (1994), *Biophys. J.*, **67**, 1387-1392.
86. Reich, Z., Schramm, O., Brumfeld, V., Minsky, A., (1996), *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 6345-6349.
87. Levin-Zaidman, S., Reich, Z., Wachtel, E. J., Minsky, A., (1996), *Biochemistry*, **35**, 2985-2991.
88. Scatchard, G., (1949), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **51**, 660-672.
89. Daune, M., (1970), *Studia Biophysica*, **24/25**, 287-297.
90. Clement, R. M., Sturm, J., Daune, M. P., (1973), *Biopolymers*, **12**, 405-421.
91. Reulen, J., Gabbay, E. J., (1975), *Biochemistry*, **14**, 1230-1235.
92. Заседателев, А.С., Гурский, Г. В., Волькенштейн, М. В., (1971), *Молек. Биол.*, **5**, 245-251.
93. Ненчипуренко, Ю. Д., Крылов, А. С., Заседателев, А. С., Гурский, Г. В., (1984), *Молек. Аѐйѐ.*, **18**, 332-342.
94. Latt, S. A., Sober, H. A., (1967), *Biochemistry*, **6**, 3293-3306.
95. McGhee, J. D., Von Hippel, P. H., (1974), *J. Mol. Biol.*, **86**, 469-489.
96. Rifkind, J., Shin, Y. A., Heim, J. M., Eighorn, G. L., (1976), *Biopolymers*, **15**, 1879-1902.
97. Сорокин, В. А., Благой, Ю. П., Валеев, В. А., (1983), *ДАН БССР*, **27**, 942-945.
98. Благой, Ю. П., Галкин, В. Л., Гладченко, Г. О., Корнилова, С. В., Сорокин, В. А., Шкорбанов, А. Г., (1991), "Металлокомплексы нуклеиновых кислот в растворах", Киев: "Наукова думка", 270 с.
99. Danchin, A., Gueron, M., (1970), *Eur. J. Biochem.*, **16**, 532-536.
100. Благой, Ю. П., Сорокин, В. А., Валеев, В. А., (1980), *Мол. Биол.*, **14**, 595-605.
101. Франк-Каменецкий, М. Д., Карапетян, А. Т., (1972), *Мол. Биол.*, **6**, 621-627.
102. Yoshikawa, K., Takahashi, M., Vasilevskaya, V. V., Khokhlov, A. R., (1996), *Phys. Rev. Lett.*, **76**, 3029-3031.

103. Yamasaki, Y., Teramoto, Y., Yoshikawa, K., (2001), *Biophys. J.*, **80**, 2823-2832.
104. Mel'nikov, S. M., Sergeev, V. G., Yoshikawa, K., Takahashi, H., Hatta, I., (1997), *J. Chem. Phys.*, **107**, 6917-6924.
105. Mel'nikov, S. M., Sergeev, V. G., Yoshikawa, K., (1995), *J. Amer. Chem. Soc.*, **117**, 2401-2408.
106. Eighorn, G. L., (1971), In *Metal Ions Genet. Inf. Transfer.*, New York, 1-46.
107. Misra, V. K., Draper, D. E., (1999), *J. Mol. Biol.*, **294**, 1135-1147.
108. Korolev, N., Lyubartsev, A. P., Rupprecht, A., Nordenskiöld, L., (1999), *Biophys. J.* **77**, 2736-2749.
109. Li, A. Z., Huang, H., Re, X., Qi, L. J., Marx, K. A., (1998), *Biophys. J.*, **74**, 964-973.
110. Li, A. Z., Marx, K. A., (1999), *Biophys. J.*, **77**, 114-122.
111. McFail-Isom, L., Shui, X., Williams, L. D., (1998), *Biochemistry*, **37**, 17105-17111.
112. Флори, П. Статистическая механика цепных молекул, (1971), Москва: "Мир", 440 с.
113. Duguid, J. G., Bloomfield, V. A., (1995), *Biophys. J.*, **69**, 2642-2648.
114. Sekine, K., Hase, T., Sato, N., (2002), *J. Biol. Chem.*, **277**, 24399-24404.
115. Teif, V. B., Lando, D. Y., (2001), *Eur. J. Human Genet.*, **9**(1), 241.
116. Teif, V. B., Lando, D. Y., (2001), In *Sensor Technology 2001*, ed. Elwenspoek M., (Kluwer Academic Publishers, Dordrecht), 155-160.
117. Votavova, H., Kucerova, D., Felsberg, J., Sponar, J., (1986), *J. Biomol. Struct. Dynam.*, **4**, 477-489.
118. Grosberg, A. Y., Khokhlov, A. R., (1994), *Statistical Physics of Macromolecules*, American Institute of Physics, New York, 140 p.
119. Post, C. B., Zimm, B. H., (1979), *Biopolymers*, **18**, 1487-1501.
120. Post, C. B., Zimm, B. H., (1982), *Biopolymers*, **21**, 2123-2137.
121. Гросберг, А. Ю., (1979), *Биофизика*, **26**, 32-37.
122. Grosberg, A. Y., Zhestkov, A. V., (1986), *J. Biomol. Struct. Dynam.*, **3**, 859-872.
123. Grosberg, A. Y., Zhestkov, A. V., (1985), *J. Biomol. Struct. Dynam.*, **3**, 515-520.
124. Arrhenius, S. Z., *Phys. Chem.*, (1887), **1**, 631.
125. Debye, P. W., Huckel, E., (1923), *Phys. Z.*, **24**, 185.
126. Manning, G. S., (1978), *Q. Rev. Biophys.*, **11**, 179-246.
127. Oosawa, F., (1968), *Biopolymers*, **6**, 1633-1647.
128. Golestanian, R., Liverpool, T. B., (2002), *Physical Review E*, **66**, 051802.
129. Rouzina, I., Bloomfield, V. A., (1996), *J. Phys. Chem.*, **100**, 9977-9989.
130. Nguyen, T. T., Rouzina, I., Shklovskii, B. I., (2000), *J. Chem. Phys.*, **112**, 2562-2568.
131. Arenzon, J.J., Stilck, J.F., Levin, Y., (1999), *Eur. Phys. J. B.*, **12**, 79-82.
132. Olvera de la Cruz, M., Belloni, L., Dalbiez, J. P., Spalla, O., Drifford, M., (1995), *J. Chem. Phys.*, **103**, 5781-5791.
133. Kornyshev, A. A., Leikin, S., (1998), *Biophys. J.*, **75**, 2513-2519.
134. Gonzalez-Mozuelos, P., Olvera de la Cruz, M., (1995), *J. Chem. Phys.*, **103**, 3145-3157.
135. Solis, F. J., Olvera de la Cruz, M., (1999), *Physical Review E*, **60**, 4496-4499.
136. Solis, F. J., Olvera de la Cruz, M., (2000), *J. Chem. Phys.*, **112**, 2030-2035.
137. Solis, F. J., Olvera de la Cruz, M., (2000), *Eur. Phys. J.*, **E1** (electronic only), <http://link.springer.de/link/service/journals/10105/index.htm>
1. Levin, Y., (2002), *Rep. Prog. Phys.*, **65**, 1577-1632.
2. Grosberg, A. Y., Nguyen, T. T., Shklovskii, B. I., (2002), *Rev. Mod. Phys.*, **74**, 329-348.
3. Solis, F. J., (2002), *J. Chem. Phys.*, **117**, 9009-9015.
4. Huang, C.-I., Olvera de la Cruz, M., (2002), *Macromolecules*, **35**, 976-986.
5. Kornyshev, A. A., Leikin, S., Malinin, S. V., (2002), *Eur. Phys. J. E.*, **7**, 83-93.
6. Harreis, H. M., Kornyshev, A. A., Likos, C. N., Lowen, H., Sutmman, G., (2002), *Phys. Rev. Lett.*, **89**, 018303.
7. Cherstvy, A. G., Kornyshev, A. A., Leikin, S., (2002), *J. Phys. Chem. B.*, **106**, 13362-13369.
8. Podgornik, R., Strey, H. H., Rau, D. C., Parsegian, V. A., (1995), *Biophysical Chemistry*, **57**, 111-121.
9. Parsegian, V. A., Evanst, E. A., (1996), *Curr. Opin. Coll. Interf. Sci.*, **1**, 53-60.
10. Strey, H. H., Podgornik, R., Rau, D. C., Parsegian, V. A., (1998), *Curr. Opin. Stuct. Biol.*, **8**, 309-313.
11. Podgornik, R., Strey, H. H., Parsegian, V. A., (1998), *Curr. Opin. Coll. Interf. Sci.*, **3**, 534-539.
12. Podgornik, R., Strey, H. H., Gawrisch, K., Rau, D. C., Rupprecht, A., Parsegian, V. A., (1996), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 4261-4266.
13. Rau, D. C., Parsegian, V. A., (1992), *Biophys. J.*, **61**, 246-259.
14. Hansen, P. L., Podgornik, R., Parsegian, V. A., (2001), *Phys. Rev. E.*, **64**, 021907.
15. Wittmer, J., Johner, A., Joanny, J. F., (1995), *J. Phys. II France.*, **5**, 635-654.
16. Poland, D., (2000), *J. Chem. Phys.*, **113**, 4774-4784.
17. Porshke, D., (1991), *J. Mol. Biol.*, **222**, 423-433.
18. Saminathan, M., Antony, T., Shirahata, A., Sigal, L. H., Thomas, T., Thomas, T. J., (1999), *Biochemistry*, **38**, 3821-3830.
19. Raspaud, E., Olvera de la Cruz, M., Sikorav, J.-L., Livolant, F., (1998), *Biophys. J.*, **74**, 381-393.
20. Raspaud, E., Chaperon, I., Leforestier, A., Livolant, F., (1999), *Biophys. J.*, **77**, 1547-1555.
21. Manganot, S., Leforestier, A., Vachette, P., Durand, D., Livolant, F., (2002), *Biophys. J.*, **82**, 345-356.

22. Tang, J. X., Janmey, P. A., Lyubartsev, A., Nordenskiold, L., (2002), *Biophys. J.*, **83**, 566-581.
23. Tsumoto, K., Yoshikawa, K., (1999), *Biophys. Chem.*, **82**, 1-8.
24. de Frutos, M., Raspaud, E., Leforestier, A., Livolant, F., (2001), *Biophys. J.*, **81**, 1127-1132.
25. Poirier, M. G. Thesis for the degree of doctor of philosophy in physics, University of Illinois at Chicago, 2001.
26. Murayama, Y., Sakamaki, Y., Sano, M., (2003), *Phys. Rev. Lett.*, **90**, 0181102.
27. Sitko, J. C., Mateescu, E. M., Hansma, H. G., (2003), *Biophys. J.*, **84**, 419-431.
28. Schnell, J. R., Berman, J., Bloomfield, V. A., (1998), *Biophys. J.*, **74**, 1484-1490.
29. Meistermann, I., Moreno, V., Prieto, M. J., Moldrheim, E., Sletten, E., Khalid, S., Rodger, P. M., Peberdy, J. C., Isaac, C. J., Rodger, A., Hannon, M. J., (2002), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 5069-5074.
30. Ландо, Д. Ю., Крот, В. И., Франк-Каменецкий, М. Д., (1975), *Мол. Биол.*, **9**, 856-860.
31. Нечипуренко, Ю. Д., Стрельцов, С. А., Евдокимов, Ю. М., (2001), *Биофизика*, **46**, 428-435.
32. Tsodikov, O. V., Holbrook, J. A., Shkel, I. A., Record, M. T. Jr., (2001), *Biophys. J.*, **81**, 1960-1969.
33. Qu, X., Trent, J. O., Fokt, I., Priebe, W., Chaires, J. B., (2000), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 12032-12037.
34. Yoshimura, S. H., Ohniwa, R. L., Sato, M. H., Matsunaga, F., Kobayashi, G., Uga, H., Wada, C., Takeyasu, K., (2000), *Biochemistry*, **39**, 9139-9145.
35. Matulis, D., Rouzina, I., Bloomfield, V. A., (2002), *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 7331-7342.
36. Bell, C. E., Lewis, M., (2001), *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **11**, 19-25.
37. Rudnick, J., Bruinsma, R., (1999), *Biophys. J.*, **76**, 1725-1733.
38. Ахрем, А. А., Ландо, Д. Ю., Шпаковский, А. Г., Нечипуренко, Ю. Д., Арутюнян, С. Г., (1990), *Мол. Биол.*, **24**, 649-656.
39. Korolev, N., Lyubartsev, A. P., Laaksonen, A., Nordenskiold, L., (2002), *Biophys. J.*, **82**, 2860-2875.
40. Krasnow, M. A., Cozzarelli, N. R., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 2687-2693.
41. Lando, D. Y., Teif, V. B., (2000), *J. Biomol. Struct. Dynam.*, **17**, 903-911.
42. Teif, V. B., Haroutunian, S. H., Vorob'ev, V. I., Lando, D. Y., (2002), *J. Biomol. Struct. Dynam.*, **19**, 1103-1110.
43. Тейф, В. Б., (2002), 5<sup>й</sup> Съезд Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков, Минск, 96.
44. Тейф, В. Б., Ландо, Д. Ю., (2001), *Мол. Биол.*, **35**, 117-119.
45. Teif, V. B., Vorob'ev, V. I., Lando, D. Y., (2001), *J. Biomol. Struct. Dynam.*, **18**, 908-909.
46. Lando, D. Y., Teif, V. B., (2002), *J. Biomol. Struct. Dynam.*, **20**, 215-222.
47. Варфоломеев, С. Д., Евдокимов, Ю. М., Островский, М. А., (2000), *Вестник РАН*, **70**, 99-108.
48. Pelta, J., Livolant, F., Sikorav, J.-L., (1996), *J. Biol. Chem.*, **271**, 5656-5662.