

UNIVERZA V LJUBLJANI  
Fakulteta za matematiko in fiziko  
Oddelek za fiziko

# FIZIKA VIRUSOV

Avtor: Miran Dragar  
Mentor: prof. dr. Rudolf Podgornik

Maj 2007

## Povzetek

V seminarju bo predstavljen preprost model, ki opisuje pakiranje virusne DNK v kapsido. Predstavljena in primerjana bosta načina sferične ter cilindrične ureditve virusne DNK, prav tako bo predstavljen tudi vpliv monovalentnih soli  $NaCl$  in divalentnih soli  $MnCl_2$  na pakiranje DNK ter primerjava rezultatov našega modela z že obstoječimi rezultati meritev.

# Kazalo

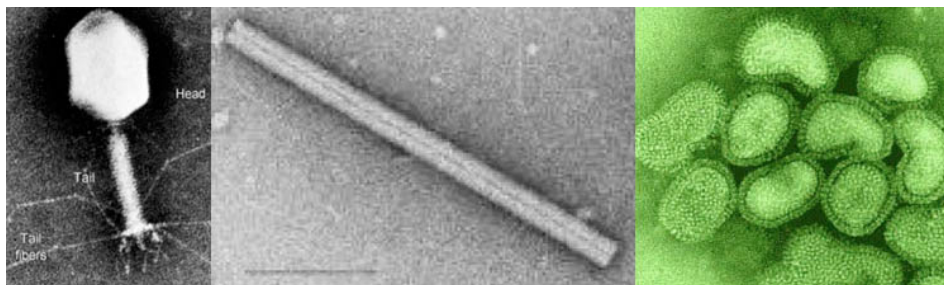
<b>1</b>	<b>Uvod</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>Zgradba virusov</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>Profil direktorskega polja</b>	<b>6</b>
3.1	Sferična simetrija . . . . .	7
3.2	Cilindrična simetrija . . . . .	8
<b>4</b>	<b>Polnjenje kapside</b>	<b>10</b>
<b>5</b>	<b>Zaključek</b>	<b>13</b>
<b>6</b>	<b>Literatura</b>	<b>14</b>

# 1 Uvod

Z virusi se srečujemo vsakodnevno in jih običajno povezujemo z raznoraznimi boleznimi, toda kaj so virusi v resnici? Vemo, da se kar precej razlikujejo od običajnih celic. Celice si lahko v grobem mislimo sestavljene iz nukleinskih kislin, raznih proteinov, lipidov in polisaharidov, medtem ko so virusi sestavljeni zgolj iz nukleinske kisline (lahko je DNK ali RNK) ter proteinske ovojnice, imenovane kapsida (nekateri kompleksnejši virusi imajo poleg kapside še lipidno membrano). Virusi tudi nimajo nobenega metabolizma, ne potrebujejo ATP kot ostala živa bitja ter tudi ne proizvajajo nikakršnih proteinov. Če se želijo razmnoževati, potrebujejo gostitelja in uporabijo njegove zmožnosti proizvodnje proteinov in kopiranja DNK/RNK [1]. Kot takšna oblika mikroorganizmov ponujajo zanimiv, drugačen pogled na življenje na Zemlji, katerega del bomo poskušali zajeti tudi v tem seminarju.

# 2 Zgradba virusov

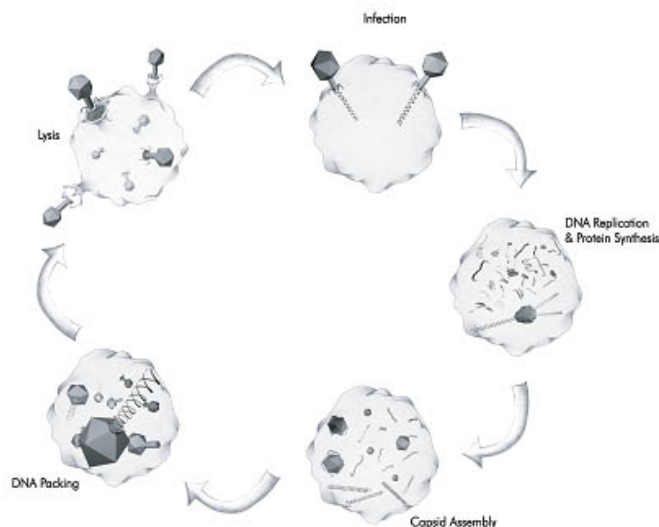
Virusi so majhni organizmi. V primerjavi s celicami, katerih velikosti se gibljejo okrog nekaj  $\mu\text{m}$ , so virusi dva do tri velikostne razrede manjši. Njihove velikosti se gibljejo od 20 do okrog 300 nm. Viruse v splošnem delimo glede na to, katero vrsto živih organizmov napadajo. Tako imamo bakteriofage (napadajo bakterije), rastlinske viruse ter živalske/človeške viruse. Nekaj primerov je prikazanih na sliki 1.



**Slika 1:** Posnetki virusov. *Levo: Bakteriofag T7. Sredina: Tobačni mozaični virus. Desno: virus gripe.*

Virusi so različnih oblik, zato se bomo v tem seminarju omejili zgolj na bakteriofage, ker so najpreprostejši. Najprej si oglejmo življenjski cikel bakteriofaga (slika 2). Med bakteriofagom in gostiteljem pride do naključnega trka, ob katerem se bakteriofag adsorbira na površje celice. Verjetnost takšnega dogodka je seveda odvisna od števila virusov ter gostiteljev. V primeru uspešne pritrditve bakteriofaga na gostitelja sledi vnos virusne DNK v celico. Vnos virusne DNK je v večini bakteriofagov pasiven proces, ki ga poganja tlačna razlika (v zadnjem času so se pojavile tudi teorije, da pri vnosu DNK pomagajo razni proteini [2]). Ta proces traja od nekaj deset sekund do nekaj minut, odvisno od dolžine genoma (hitrosti se gibljejo okrog 150 nm/s). Ko je virusna DNK v celici, se prične transkripcija le-te ter tvorba proteinov, potrebnih za izgradnjo novih kapsid. Ko je dosežena dovolj velika koncentracija ustreznih proteinov za tvorbo

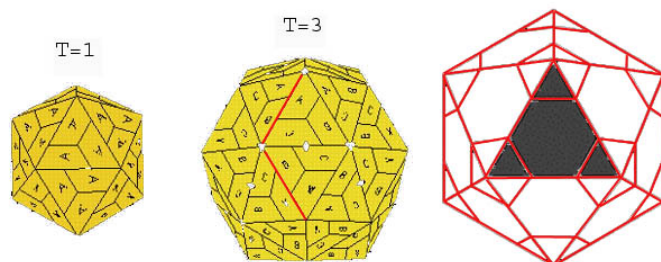
kapsid, se le-te prično samodejno sestavljati. Naslednji korak je pakiranje kopij virusnega genoma v novonastale kapside. Pakiranje je aktiven proces, ki poteka s pomočjo molekularnega motorja, ki potiska DNK v kapsido. Hitrosti pakiranja so v začetku okrog 30 nm/s, proti koncu pakiranja pa se hitrosti zmanjšujejo. Zmanjševanje hitrosti je posledica delovanja notranjih sil v kapsidi, ki postajajo čedalje večje z večanjem deleža genoma v kapsidi. Ko so vse virusne DNK zapakirane v kapside, sledi še razpad celice in izpust 50 do 300 kapsid z virusno DNK. Celoten proces od adsorbcije do izpusta nove generacije virusov je končan v manj kot eni uri.



**Slika 2:** Življenjski cikel bakteriofaga. Razlaga posameznih dogodkov je v tekstu.

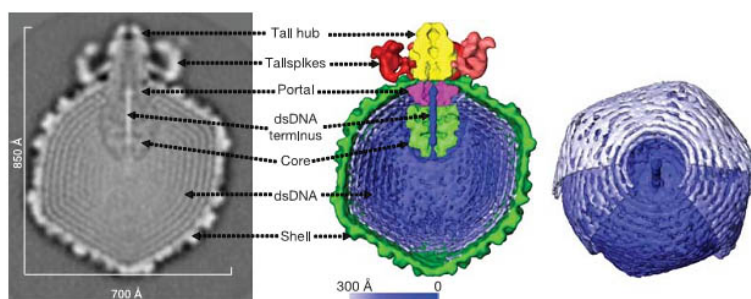
Raziskovalno delo na področju bakteriofagov je pokazalo, da je za samo razumevanje procesa infekcije, bistveno poznavanje strukture kapside ter urejenosti virusne DNK v kapsidi. Kapsida je kot nekakšna ovojnica, v kateri je spravljena DNK, in je sestavljena iz manjših enot, t.i. kapsomer. Vsaka kapsomera je sestavljena iz treh različnih proteinov. Najbolj optimalna oblika kapside bi bila krogla, h kateri se najbolj približa ikozaedralna struktura. Ikozaeder je zgrajen iz 20 trikotnih ploskev. Ker je vsaka ploskev sestavljena iz treh proteinov, potrebujemo natančno 60 proteinov, da sestavimo ovojnico. Če pogledamo ikozaeder (slika 3) vidimo, da vsebuje natanko 12 oglišč s petštevno simetrijo (lahko rečemo, da v vsakem oglišču pet kapsomer sestavlja t.i. pentamero). Poleg pentamer pa je mogoče iz trikotnih kapsomer sestaviti tudi t.i. heksamere (strukture s heksagonalno simetrijo). Tako lahko s kombinacijo natančno 12 pentamer in ustreznim številom heksamer sestavimo različno velike kapside (12 pentamer vnese v strukturo kapside ustrezno ukrivljenost, tako da je struktura topološko prostorsko zaključena; primer iz vsakdanjega življenja je nogometna žoga, ki ima prav tako 12 petkotnikov). Glede na zgradbo virusov je nastal tudi sistem označevanja le-teh, s pomočjo t. i. triangulacijskega števila  $T$ , ki v bistvu opisuje razmerja med petštevni osmi kapsid. Po definiciji je  $T = h^2 + hk + k^2$ , kjer  $h$  in  $k$  predstavljata število korakov v določeni smeri od ene petštevne osi do druge ( $h$  in  $k$  si lahko predstavljamo kot bazna vektorja heksagonalne struk-

ture). Več o zgradbi kapside in fizikalnih razlogih zanjo je moč najti v [3]. Poleg ikozaedralne je možna še ena oblika kapside, in sicer paličasta. V tem primeru je kapsida sestavljena izključno iz heksamer, ki so zvite v obliko valja. Te oblike kapside ni moč najti med bakteriofagi, zato se v seminarju ne bomo ukvarjali z njo.



**Slika 3:** Primeri ikozaedralnih struktur virusov. Levo: Primer osnovnega ikozaedra z 12 oglišči,  $T=1$ . Sredina: Primer družine  $T=3$ ; način določanja triangulacijskega števila je prikazan z rdečima črtama, ki kažeta najkrajšo pot med dvema petštevničima osema. Desno: Primer večje ikozaedralne strukture lepo prikazuje logiko zgradbe kapsid. Med večjimi območji heksamer je 12 pentamer, ki v sicer ravno strukturo heksamer vnesejo ukrivljenost in tako poskrbijo za prostorsko zaključenost kapside.

Premeri kapsid bakteriofagov so ocenjeni na velikosti  $\leq 92$  nm, medtem ko so dolžine zapakiranega genoma v kapsidi  $\leq 60 \mu\text{m}$  (oz.  $\leq 170$  kbp, kjer kbp pomeni število baznih parov v tisočih) [4]. Če upoštevamo mezoskopski opis DNK, v katerem lahko v zelo dobrem približku obravnavamo DNK kot palico nematskega tekočega kristala s persistenčno dolžino 50 nm (persistenčna dolžina je dolžina, na kateri lahko obravnavamo del DNK kot ravno palico), ugotovimo, da pakiranje DNK ni trivialen problem in da bodo pri njem delovale znatne sile. V zadnjih letih so se s pomočjo poskusov, ki so nakazali notranjo strukturo virusne DNK v kapsidi [5, 6], razvili tudi teoretski modeli, ki bolj ali manj uspešno opisujejo notranjo strukturo virusa. Poskusi so pokazali, da je DNK urejena v obliki t.i. *inverznega svitka* z zelo urejeno strukturo in veliko gostoto ob robovih kapside, ki pa se s približevanjem sredici kapside zmanjšujeta (slika 4).



**Slika 4:** Primer bakteriofaga *epsilon15*. Levo: Slika zamrznjenega bakteriofaga z elektronskim mikroskopom. Sredina: Prikaz ustreznih strukturnih enot bakteriofaga. Desno: Shematski prikaz zgornjih treh plasti pakirane DNK.

Eden izmed modelov, ki razmeroma dobro opisuje notranjo strukturo virusa je Odijk-Gelbartov model inverznega svitka. Osnovna predpostavka modela je ravnovesje dveh prispevkov h Gibbsovi prosti energiji sistema: 1) interakcijske energije med vijačnicami DNK in 2) elastične energije. V prvem primeru gre za Coulombsko interakcijo med negativno nabitimi vijačnicami DNK ter naboji v raztopini (proteini, ki sestavljajo kapsido namreč niso neprepustni, zato je v kapsidi poleg DNK lahko tudi voda ter razni ioni). Prispevek elastične energije pa pove kolikšna energija je potrebna, da ukrivimo DNK. Oblika inverznega svitka namreč sugerira, da poteka polnjenje kapside z DNK od roba kapside proti sredini. V začetnih fazah pakiranja, ko kapsida še ni preveč zapolnjena, je pomembnejši interakcijski člen, ko pa kapsida postaja bolj in bolj zapolnjena in je na voljo čedalje manj prostora, pride do izraza člen, ki opisuje ukrivljenost. V strukturi DNK pride tako do situacije, ko je energijsko bolj ugodno, da se zmanjša razdalja med vijačnicami DNK (in s tem poveča Coulombska odbojna sila), kot pa da se DNK močno ukrivlja blizu sredice kapside. Tako pride do pojava, da je sredica kapside praktično izpraznjena, medtem ko je ob robu DNK tesno pakirana s heksagonalno ureditvijo. Iz te ureditve sledi tudi izraz inverzni svitek.

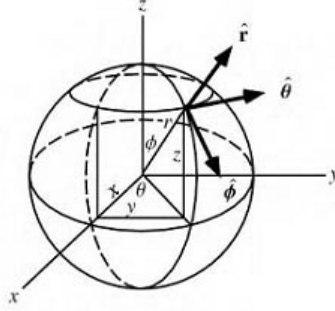
Tudi v seminarju se bomo držali osnovnih predpostavk zgoraj opisanega modela, zato jih na kratko povzemimo. Virus je sestavljen iz DNK in kapside, ki ima obliko krogle. Kapsida je toga, kar pomeni, da ni nobenih sprememb v njeni velikosti med polnjenjem oz. praznjenjem. Zanimarimo tudi vse možne interakcije med steno kapside in DNK. Stena kapside je polprepustna, prepušča molekule vode in manjše ione, večjih molekul pa ne. Prosto energijo DNK v kapsidi sestavljata dva prispevka: interakcijski in elastični. Poleg tega še predpostavimo, da je DNK v kapsidi v osmotskem ravnovesju z zunanjo raztopino polietilenglikola (PEG) z znanim osmotskim tlakom in aktivnostjo soli (pri čemer je kapsida neprepustna za molekule PEG). Z upoštevanjem omenjenih predpostavk bo v termodinamskem ravnovesju veljala naslednja enačba

$$p_0(\rho) + \frac{1}{2}kT\xi_P \frac{\rho L_{bp}^2}{L} (\mathbf{n} \times (\nabla \times \mathbf{n}))^2 = konst = p, \quad (1)$$

kjer prvi člen predstavlja interakcijski prispevek, drugi člen elastični prispevek ( $\xi_P$  persistenčna dolžina,  $L_{bp}$  razdalja med zaporednima baznima paroma 0.34 nm,  $L$  dolžina DNK in  $\mathbf{n}$  direktor polja) in tretji člen zunanji osmotski tlak. Odvisnost  $p_0(\rho)$  interakcijskega prispevka je eksperimentalno določena [10], medtem ko oblika elastičnega prispevka sledi iz Franck-Oseenovega nastavka za deformacijsko energijo nematskih tekočih kristalov [9].

### 3 Profil direktorskega polja

V tem poglavju bomo s pomočjo enačbe (1) preučili dva poučna primera, pri katerih je DNK pakiran kot inverzni svitek v sferični ali cilindrični simetriji. Na sliki 5 je predstavljen koordinatni sistem, ki ga bomo uporabljali.



Slika 5: Definicija enotskih vektorjev v sferičnih koordinatah.

### 3.1 Sferična simetrija

Kot prvi primer bomo pogledali sferično simetrično pakiranje genoma v kapsidi. To pomeni, da ima direktor samo meridionalno komponento in ga lahko zapišemo kot

$$\mathbf{n} = \mathbf{e}_\phi. \quad (2)$$

To je v bistvu zelo posplošen model pakiranja v kapsidi, ki pa nam bo služil kot nekakšna osnova za obnašanje našega modela. Če uporabimo smer direktorja v povezavi z enačbo (1) dobimo

$$\nabla \times \mathbf{n} = \frac{\mathbf{e}_\theta}{r} \quad \text{in} \quad \mathbf{n} \times (\nabla \times \mathbf{n}) = \frac{\mathbf{e}_r}{r}.$$

Sedaj lahko zapišemo enačbo mehanskega ravnovesja v naslednji obliki

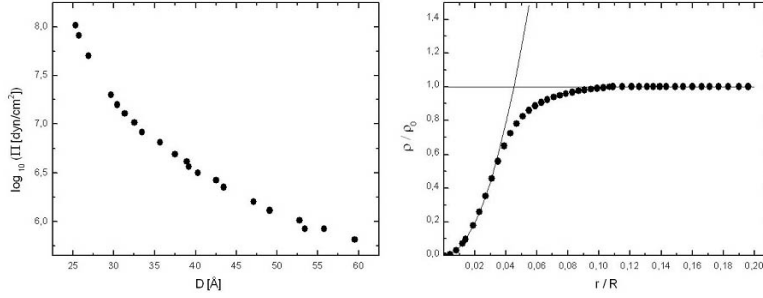
$$p_0(\rho(r)) + \frac{1}{2} kT \xi_P \frac{L_{bp}^2}{L} \frac{\rho(r)}{r^2} = p. \quad (3)$$

Namesto numeričnega reševanja gornje enačbe, si najprej pogledimo, kaj lahko izluščimo iz nje. Seveda nas najbolj zanimata limitna primera, torej kaj se bo dogajalo z gostoto pakiranja v primeru, ko se bomo približevali središču kapside oz. njenemu robu.

$$\begin{aligned} r \longrightarrow 0: \quad \rho(r) &= \frac{2 p L}{kT \xi_P L_{bp}^2} r^2 + \dots \\ r \longrightarrow R: \quad \rho(r) &= \rho_0(p), \end{aligned}$$

$\rho_0(p)$  predstavlja rešitev enačbe  $p_0(\rho_0) = p$ ,  $R$  je polmer kapside. Očitno bo v primeru približevanja središču kapside gostota naraščala sorazmerno s kvadratom polmera kapside, medtem ko bo ob robovih kapside imela neko konstantno vrednost, ki bo seveda odvisna od zunanega osmotskega tlaka. Ti dve rešitvi enačbe sta lepo vidni tudi na slikah 6 in 7, kjer je predstavljena numerična rešitev enačbe. S slike vidimo, da je gostota pakiranja DNK okoli središča kapside zelo majhna, kar je pričakovano, saj je ukrivljanje pri majhnih polmerih zelo energijsko potratno. Tako lahko govorimo o inverznem svitku, za katerega lahko določimo efektivni polmer. V našem primeru je to kar polmer pri katerem se sekata obe limitni rešitvi in ga izrazimo kot

$$\frac{2 p L}{kT \xi_P L_{bp}^2} r^{*2} = \rho_0(p). \quad (4)$$



**Slika 6:** *Levo: Odvisnost osmotskega tlaka od medosne razdalje vijačnic DNK za primer 0.3 M raztopine NaCl [10]. Desno: Profil gostote pakiranja za primer omenjene raztopine z dodanima limitnima primeroma (neprekinjeni črti).*

Sedaj nam preostane še, da izračunamo količino pakiranega genoma v odvisnosti od zunanega tlaka, kar je eden bistvenih podatkov pri eksperimentih. Tega se lahko lotimo na dva načina. Prvi je, da rešujemo enačbo (3) pri vsakem tlaku  $p$ . Drugi način je mnogo elegantnejši, hkrati pa se tudi izognemo numeričnemu računanju, vendar za ceno natančnosti. Poglejmo si поблиže drugi način. Tu predpostavimo, da lahko profil gostote pakiranja razdelimo na dva dela,  $\rho(r) = \rho_0(p)$  za  $r > r^*$  in  $\rho(r) = \frac{2p}{kT} \frac{L}{\xi_P L_{bp}^2} r^2$  za  $r < r^*$ . Količina pakiranega genoma je definirana kot število baznih parov znotraj kapside

$$\frac{L_{in}(p)}{L_{bp}} = 4\pi \int_0^R \rho(r)r^2 dr = 4\pi \int_0^{r^*} \rho(r)r^2 dr + 4\pi \int_{r^*}^R \rho(r)r^2 dr. \quad (5)$$

Ko vnesemo ustrezne izraze za gostoto v zgornjo enačbo in integriramo, dobimo

$$\frac{L_{in}(p)}{L_{bp}} = \frac{4\pi}{3} \rho_0 R^3 \left( 1 - \frac{2}{5} \left( \frac{r^*}{R} \right)^3 \right). \quad (6)$$

Ob predpostavki, da je DNK v kapsidi povsod lokalno heksagonalno pakirana, nam edino preostalo neznanko v gornji enačbi  $\rho_0$  določa izraz

$$\rho(r) = \frac{L}{L_{bp}^2 \sqrt{3} D^2},$$

kjer je  $D$  medosna razdalja vijačnic med heksagonalno pakirano DNK, ki jo lahko natančno merimo v eksperimentih.

### 3.2 Cilindrična simetrija

Sedaj predpostavimo, da ima direktor polja v kapsidi izključno ekvatorialno komponento glede na os  $z$

$$\mathbf{n} = \mathbf{e}_\theta. \quad (7)$$

Ustrezni vektorski produkti se izrazijo kot

$$\nabla \times \mathbf{n} = \frac{\mathbf{e}_\theta}{r \sin \theta} \quad in \quad \mathbf{n} \times (\nabla \times \mathbf{n}) = \frac{\mathbf{e}_r}{r \sin \theta}.$$



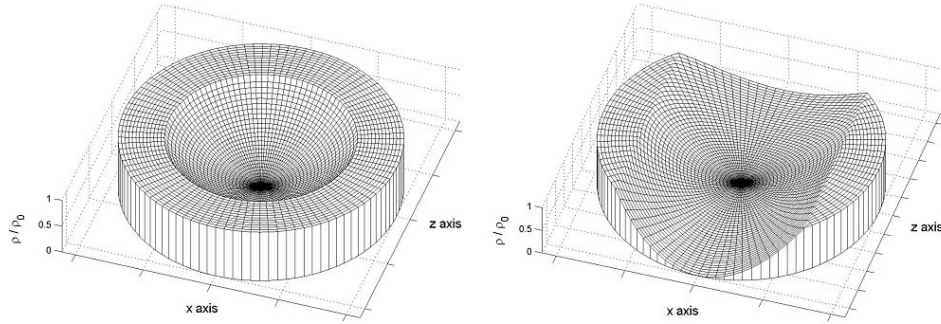
Sedaj lahko zapišemo enačbo mehanskega ravnovesja v naslednji obliki

$$p_0(\rho(r, \theta)) + \frac{1}{2} kT \xi_P \frac{L_{bp}^2}{L} \frac{\rho(r, \theta)}{r^2 \sin^2 \theta} = p. \quad (8)$$

Podobno kot prej pogledamo limitna primer

$$\begin{aligned} r \longrightarrow 0 : \quad \rho(r, \theta) &= \frac{2 p L}{kT \xi_P L_{bp}^2} r^2 \sin^2 \theta + \dots \\ r \longrightarrow R : \quad \rho(r, \theta) &= \rho_0(p), \end{aligned}$$

Rezultat je podoben, kot v primeru sferične simetrije, s to razliko, da dobimo v limitnem primeru, ko gre  $r \rightarrow 0$  dodaten člen  $\sin^2 \theta$ . Ta člen povzroči, da ima sedaj gostotni profil rotacijsko simetrijo okoli osi  $\theta = 0$  (oz. os  $z$ ), kar je lepo vidno na sliki 7.



**Slika 7:** Primerjava gostotnega profila za sferično (levo) in cilindrično simetrijo (desno).

Podobno kot v primeru sferične simetrije nas zanima količina pakiranega genoma. S slike 7 vidimo, da mora obstajati nek kot  $\theta^*$ , za katerega velja

$$\frac{2 p L}{kT \xi_P L_{bp}^2} R^2 \sin^2 \theta^* = \rho_0(p). \quad (9)$$

S pomočjo tega izraza sedaj izračunamo količino pakiranega genoma v kapsidi kot

$$\begin{aligned} \frac{L_{in}(p)}{L_{bp}} &= \int_V \rho(r, \theta) d^3 \vec{r} = \\ &= 2 \int_0^{\theta^*} \int_0^R 2\pi \rho(r, \theta) r^2 \sin \theta d\theta dr + \\ &\quad + 2 \int_{\theta^*}^{\frac{\pi}{2}} \int_0^{R \frac{\sin \theta^*}{\sin \theta}} 2\pi \rho(r, \theta) r^2 \sin \theta d\theta dr + \\ &\quad + 2 \int_{\theta^*}^{\frac{\pi}{2}} \int_{R \frac{\sin \theta^*}{\sin \theta}}^R 2\pi \rho_0(p) r^2 \sin \theta d\theta dr. \end{aligned} \quad (10)$$

Krajši račun nam poda analitično enačbo za količino pakiranega genoma v kapsidi za cilindrično simetrijo

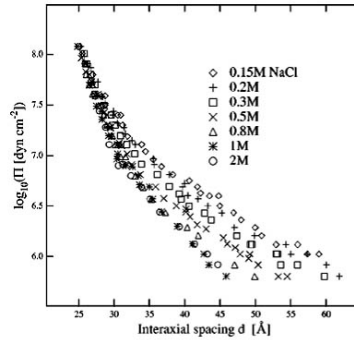
$$\frac{L_{in}(p)}{L_{bp}} = \frac{8\pi}{15} \rho_0 R^3 \left( \cos^3 \theta^* + \frac{2 p L R^2}{kT \xi_P L_{bp}^2 \rho_0} (1 - \cos^3 \theta^*) \right), \quad (11)$$

oz. če zapišemo rezultat s pomočjo  $r^*$

$$\frac{L_{in}}{L_{bp}} = \frac{8\pi}{15}\rho_0 R^3 \left( \left(1 - \frac{r^{*2}}{R^2}\right)^{\frac{3}{2}} + \frac{R^2}{r^{*2}} \left(1 - \left(1 - \frac{r^{*2}}{R^2}\right)^{\frac{3}{2}}\right) \right). \quad (12)$$

## 4 Polnjenje kapside

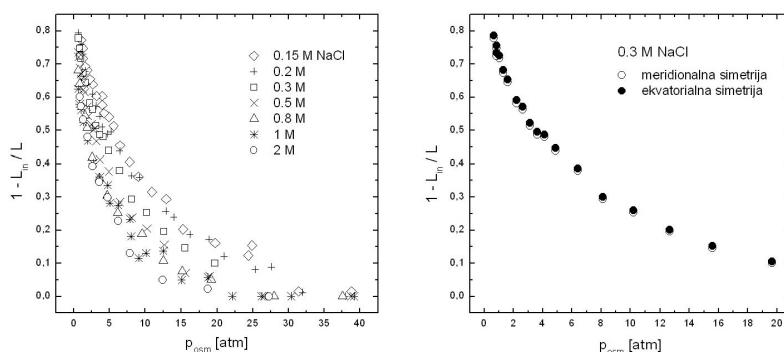
V prejšnjem poglavju smo izpeljali enačbi (6 in 12), ki opisujeta delež polnjenja kapside za dve simetriji: sferično in cilindrično. V tem poglavju bomo na dveh primerih preverili obnašanje našega modela in ga na koncu primerjali z dejansko izvedeno meritvijo [13]. Kot primer virusa bomo uporabili  $\lambda$  bakteriofag z radijem kapside 30 nm in dolžino genoma 16.5  $\mu\text{m}$ .  $\lambda$  bakteriofag nima proteinskega čepa, kar je pomemben podatek, saj obstoj proteinskega čepa omogoča zgolj cilindrično simetrijo pakiranja. Poglejmo si najprej osnovne značilnosti rezultatov meritve [10], prikazanih na grafu na sliki 8.



**Slika 8:** Odvisnost tlaka od medosne razdalje vijačnic DNK za primer različnih koncentracij monovalentnih soli NaCl [10].

S slike je razvidno, da osmotski tlak pada z naraščanjem medosne razdalje. Odvisnost osmotskega tlaka od medosne razdalje je mogoče opisati z eksponentno padajočo krivuljo, z razpadno konstanto velikosti okrog 3 Å. Lepo je tudi razvidno, da se s povečevanjem koncentracije monovalentnih protiionov osmotski tlak pri poljubno določeni medosni razdalji manjša in obratno. Pri bolj podrobni analizi tega pojava pa naletimo na zanimivo podrobnost, da so si merski rezultati za različne koncentracije monovalentnih protiionov pri majhnih medosnih razdaljah (in torej visokih osmotski tlakih) zelo podobni, v bistvu jih lahko v okviru napake opišemo s samo eno eksponentno krivuljo, medtem ko se pri večjih medosnih razdaljah (in ustrezno nižjih osmotski tlakih) merski rezultati razpršijo in jih ne moramo več opisati s samo eno eksponentno krivuljo, ampak potrebujemo za vsak niz podatkov pri določeni koncentraciji monovalentnih protiionov svojo eksponentno krivuljo. To dvojnost potenciala je mogoče lepo pojasniti [10, 11] z dejstvom, da gre tu za dva prispevka k odbojnemu potencialu. Prvi prispevek (pri majhnih osmotski tlakih oz. pri visokih medosnih razdaljah) je posledica elektrostatičnega odboja in postane prevladujoč efekt pri medosnih razdaljah, ki so večje od 30 Å. Pomemben podatek je tudi, da je ta prispevek močno odvisen od koncentracije monovalentnih protiionov, kar pomeni, da se mu lahko z dovolj veliko koncentracijo le-teh izognemo (to vidimo pri primeru 1 in

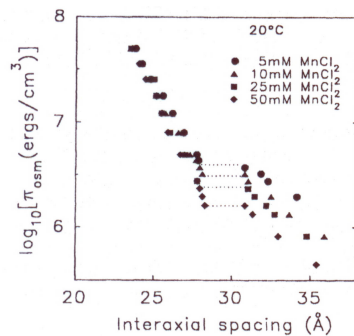
2 M raztopine, kjer merski rezultati ležijo praktično na eni krivulji in lahko zato zanemarimo vpliv elektrostatičnega odboja, ker je popolnoma zasenčen z monovalentnimi protiioni). Drugi prispevek je posledica hidracijskih sil (povzročijo ga urejene strukture vodnih molekul med vijačnicami) in je neodvisen od koncentracije protiionov. Ta efekt je zelo pomemben pri poskusih z di- in polivalentnimi solmi, kjer pride do zelo zanimivih pojavov, kar bomo pokazali v nadaljevanju. Iz tega grafa lahko sedaj razberemo ustrezno odvisnost  $p(D)$  in jo s pomočjo numeričnih rešitev, opisanih v 3. poglavju, pretvorimo v željeno odvisnost pakiranega genoma od tlaka. Za primer sferičnega pakiranja ob uporabi enačbe (6) je to prikazano na sliki 9.



**Slika 9:** *Levo: Odvisnost deleža nepakiranega genoma v odvisnosti od osmotskega tlaka za primer meridionalne simetrije. Desno: Primerjava med meridionalno in ekvatorialno simetrijo pakiranja za primer 0.3 M raztopine NaCl.*

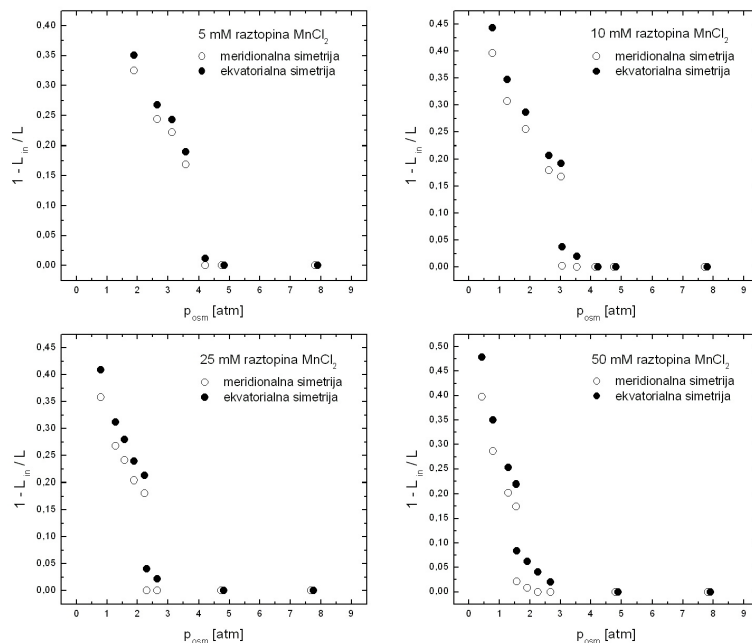
Takoj je opazno, da se eksponentna odvisnost med osmotskim tlakom in medosno razdaljo prevede v podobno eksponentno odvisnost med deležem pakiranja genoma in osmotskim tlakom, kar je pričakovan rezultat. Prav tako vidimo, da večja koncentracija monovalentnih protiionov zapolni večji delež kapside pri istem osmotskem tlaku kot manjša koncentracija le-teh. To smo nekako tudi intuitivno pričakovali, saj večja koncentracija protiionov bolje zasenči elektrostatičen odboj in s tem omogoči manjše medosne razdalje DNK vijačnic. Delež pakiranja je seveda omejen na območje (0, 1), saj ne moremo zapakirati več kot 100 % dolžine DNK. Na sliki 9 je narejena še primerjava deležev pakiranja za sferično in cilindrično geometrijo v odvisnosti od osmotskega tlaka pri 0.3 M koncentraciji monovalentnih protiionov. Zanimivo je, da kljub analitično precej različnim rešitvama, rezultati pakiranja na grafu tega ne kažejo in so razlike praktično zanemarljive. To velja splošno pri monovalentnih solih pri vseh koncentracijah.

Naslednji primer, ki si ga bomo ogledali, je primer divalentnih soli  $MnCl_2$  v 0.25 M raztopini  $NaCl$  (slika 10). V primerjavi z eksperimenti, opravljenimi samo z monovalentno soljo ( $NaCl$ ), je predvsem opazen skok v medosni razdalji. Pri različnih koncentracijah soli pride do skoka pri različnih osmotskih tlakih (višja kot je koncentracija, nižji je osmotski tlak, pri katerem pride do skoka in obratno), medtem ko začetek (pri medosni razdalji okrog 29 nm) in dolžina skoka (okrog 3.4 Å) nista odvisna od koncentracije. Razlaga skoka je podrobno razložena v [11].



**Slika 10:** Odvisnost tlaka od medosne razdalje vijačnic DNK za primer različnih koncentracij divalentnih soli  $MnCl_2$  [12].

Zelo poenostavljena razlaga, temelječa na zgoraj omenjeni dvojnosti potenciala (elektrostatične in hidracijske sile) pove, da gre za prehod med stanjem, ko med vijačnicami DNK prevladujejo privlačne sile (pri majhnih medosnih razdaljah oz. pred prehodom) in stanjem, ko med vijačnicami DNK prevladujejo odbojne sile (velike medosne razdalje oz. po prehodu). Ker smo pri monovalentnih solih opazili le slednji pojav (prevlado odbojnih sil), sklepamo, da so za privlačne sile odgovorne divalentne soli.

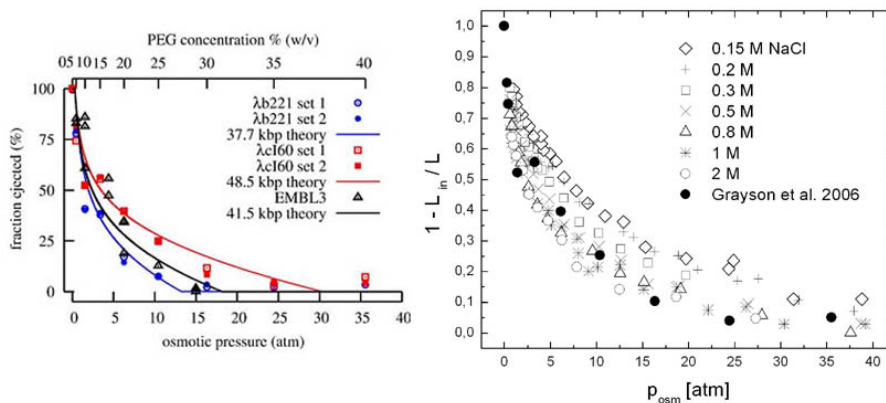


**Slika 11:** Primerjava med meridionalno in ekvatorialno simetrijo pakiranja za primer divalentnih soli  $MnCl_2$ . Posamezni primeri so zaradi preglednosti ločeni.

Ostale značilnosti eksperimenta so podobne poskusom z monovalentno soljo (razpršitev merskih rezultatov po prehodu, kar kaže na vpliv elektrostatičnih sil ter zmanjševanje tlaka pri povečavanju koncentracij soli pri enakih medosnih

dolžinah). Ob pogledu na graf, ki prikazuje odvisnost deleža pakiranja od osmotskega tlaka, pa vidimo, da pride v primeru dodatka divalentne soli  $MnCl_2$  do odstopanja rezultatov v primeru sferičnega in cilindričnega pakiranja, in sicer ugotovimo, da je energijsko ugodnejše meridionalno pakiranje. Pri visokih tlakih ni bistvenih razlik, medtem ko pri manjših tlakih le-te dosežejo do okrog 7 %. Vidimo tudi, da je razlika med deležem meridionalno in ekvatorialno pakiranega genoma odvisna od koncentracije divalentnih soli, in sicer se razlika povečuje sorazmerno z naraščanjem koncentracije soli.

Sedaj nam ostane še primerjava rezultatov, ki jih napove naš model, z dejanskimi meritvami deleža pakirane DNK v odvisnosti od osmotskega tlaka, ki so prikazane na sliki 12 [13]. V meritvah je bil uporabljen bakteriofag  $\lambda$  s tremi različnimi dolžinami genoma (37.7 kbp v primeru  $\lambda b221$ , 41.5 kbp v primeru EMBL3 in 48.5 kbp v primeru  $\lambda cI60$ ). Naredili bomo samo primerjavo s  $\lambda cI60$  bakteriofagom, saj ostali dve primerjavi kvalitativno ne prineseta nič novega.



**Slika 12:** Odvisnost deleža nepakiranega genoma v odvisnosti od osmotskega tlaka za tri vrste bakteriofagov [13]. Primerjava rezultatov, ki jih napove model v primeru različnih koncentracij  $NaCl$  raztopine z eksperimentom [13].

Eksperiment je bil opravljen v 10 mM raztopini  $Mg^{2+}$  protiionov, vendar kljub temu opazimo obnašanje, značilno za monovalentne soli (ni skoka). Iz tega razloga bomo tudi naredili primerjavo z monovalentnimi solmi. Naše koncentracije so primerjalno mnogo večje (0.15 - 2 M) od koncentracije uporabljene v eksperimentu (10 mM), vendar smo že pri obravnavi divalentnih soli videli, da je takšno razmerje dokaj ekvivalentno (0.25 M  $NaCl$  proti nekaj deset mM raztopinam  $MnCl_2$ ). Primerjava rezultatov je prikazana na sliki 12. Vidimo, da kažejo naši rezultati dobro ujemanje z opravljenimi meritvami, kar potrjuje pravilnost modela.

## 5 Zaključek

V seminarju je bil predstavljen model inverznega svitka, ki opisuje pakiranje DNK v kapsidi, temelječ na ideji ravnovesja med elastično energijo ukrivljanja in interakcijami med vijačnicami DNK. Model smo uporabili za opis sferno in cilindrično simetričnega pakiranja DNK. Ugotovili smo, da je sferna simetrija

energijsko bolj ugodna od cilindrične simetrije, vendar se to pokaže šele pri divalentnih (oz. na splošno pri polivalentnih) soleh, medtem ko pri monovalentnih soleh ni bistvene razlike. Rezultati našega modela se skladajo tudi z opravljenimi meritvami, kar pomeni, da model dobro opiše osnovne lastnosti pakiranja DNK v bakteriofagih.

## Literatura

- [1] M.T. Madigan and J.M. Martinko: *Brock Biology of Microorganisms*, 11<sup>th</sup> Edition, Pearson Prentice Hall, New York, 2006
- [2] I.J. Molineux: *Fifty-three years since Hershey and Chase: much ado about pressure but which pressure is it?*. *Virology* 344, 221-229 (2006)
- [3] R.F. Bruinsma *et al.*: *Viral self-assembly as a thermodynamic process*. *Phys. Rev. Lett.* 90(24), Art. No. 248101 (2003)
- [4] P.K. Purohit *et al.*: *Forces during Bacteriophage DNA Packaging and Ejection*. *Biophys. J.* 88, 851-866 (2005)
- [5] M.E. Cerritelli *et al.*: *Encapsidated Conformation of Bacteriophage T7 DNA*. *Cell* 91, 271-280 (1997)
- [6] W. Jiang *et al.*: *Structure of epsilon15 bacteriophage reveals genome organization and DNA packaging/injection apparatus*. *Nature* 439, 612-616 (2006)
- [7] T. Odijk: *Statics and dynamics of condensed DNA within phages and globules*. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. A* 362, 1497-1517, (2004)
- [8] S. Tzllil *et al.*: *Forces and Pressures in DNA packaging and Release from Viral Capsids*. *Biophys. J.* 84, 1616-1627 (2003)
- [9] P.G. de Gennes and J. Prost: *The Physics of Liquid Crystals*, 2<sup>nd</sup> Edition, Oxford University Press, New York, 1993
- [10] H.H. Strey, V.A. Parsegian and R. Podgornik: *Equation of state for polymer liquid crystals: Theory and experiment*. *Phys. Rev. E* 59, 999-1008 (1999)
- [11] D.C. Rau and V.A. Parsegian: *Direct measurement of the intermolecular forces between counterion-condensed DNA double helices: Evidence for long range attractive hydration forces*. *Biophys. J.* 61, 246-259 (1992)
- [12] S. Leikin, D.C. Rau and V.A. Parsegian: *Measured entropy and enthalpy of hydration as a function of distance between DNA double helices*. *Phys. Rev. A*, 44(8), 5272-5278 (1991)
- [13] P. Grayson *et al.*: *The effect of genome length on ejection forces in bacteriophage lambda*. *Virology* 348, 430-436 (2006)