Univerza *v Ljubljani* Fakulteta za *matematiko in fiziko*



SEMINAR

Elastična teorija DNA: raztegovanje in topljenje DNA

Avtor: Matej Krajnc $Mentor: \\ prof. dr. Rudolf PODGORNIK$

 $6. \ {\rm avgust} \ 2012$

Povzetek

Elastične lastnosti DNA molekule vplivajo na to, kako se DNA npr. ovija okoli histonov, pakira v virusih, upogiba ob interakciji s proteini... Enostaven način raziskovanja elastičnosti DNA je raztegniti eno samo molekulo z obeh koncev in meriti silo kot funkcijo razdalje med koncema molekule (ali raztezka). Na kratko bomo omenili dve eksperimentalni metodi raztezanja, od katerih je najpogostejša metoda z lasersko pinceto. Teoretično obravnavo bomo začeli s Kratky-Porod modelom semifleksibilne verige, ki je osnova za ostale teoretične modele. Predstavili bomo teorijo preraztezanja molekule DNA, ko se zgodi strukturni prehod B-DNA–S-DNA. Avtorji te teorije imajo nekaj dobrih argumentov za to, da naj bi preraztezanje DNA vodilo v delno topljenje baznih parov, o čemer bomo prav tako diskutirali. Za konec bomo pogledali še, kaj se zgodi ob relaksaciji sprva raztegnjene molekule. Izkaže se da se pojavi histereza.

Kazalo

1	Kratky-Porod model	2
2	Elastičen odziv molekule DNA	3
3	Elektrostatski vpliv na raztezanje DNA	5
4	Meritev strukturnega prehoda B-DNA–S-DNA	6
5	Elastična teorija prehoda B-DNA–S-DNA 5.1 Vpliv koncentracije soli v raztopini	7 9
6	Raztegovanje in relaksacija DNA	11
7	Zaključek	13

1 Kratky-Porod model

Molekula DNA se običajno nahaja pri temperaturi okoli sobne temperature. Če jo obravnavamo kot elastično palico, ugotovimo, da je elastična prosta energija za dovolj dolgo molekulo primerljiva in slej kot prej manjša od termične energije. Termične fluktuacije imajo tako odločilen pomen na raztegovanje molekule DNA [1]. Če molekulo raztegujemo z zunanjo silo, se želi poravnati s smerjo sile, čemur pa nasprotujejo termične fluktuacije. Da je npr. razdalja med koncema molekule enaka njeni dolžini, moramo zato molekulo raztegovati z ustrezno veliko silo.

Predstavili bomo model neraztegljive semifleksibilne verige: Kratky-Porod model. Ta upošteva ukrivljanje molekule, ne upošteva pa torzijske elastičnosti [1]. Za prost torzijsko zrelaksiran filament lahko zapišemo elastično energijo kot

$$\mathcal{F}[\dot{\mathbf{t}}(l)] = \frac{1}{2} K_c \int_0^L \dot{\mathbf{t}}^2 \mathrm{d}l = \frac{1}{2} K_c \int_0^L \left(\frac{\mathrm{d}\mathbf{t}}{\mathrm{d}l}\right)^2 \mathrm{d}l \tag{1}$$

Tu je elastični modul $K_c = EI$ (E je Youngov prožnostni modul, I pa vztrajnostni moment "preseka"molekule), t pa tangentni vektor na filament, ki nam torej opisuje konfiguracijo molekule. l je ločni parameter, ki preteče interval [0, L], kjer je L celotna dolžina molekule.

Takoj lahko opazimo analogijo izraza s kinetično energijo delca z "lego" t in "časom" l. Tak delec se mora gibati po enotski sferi, saj t² = 1. Fazno vsoto izračunamo kot

$$\mathcal{Z}(T,L) = \int \mathcal{D}[\mathbf{t}(l)] \, e^{-\beta \mathcal{F}[\mathbf{\dot{t}}(l)]} \,, \qquad \mathbf{t}^2(l) = 1 \,, \tag{2}$$

kjer moramo itegral izvršiti preko vseh možnih enotskih vektorjih t. Tu je $\beta = 1/k_B T$. Fazna vsota je tako analogna amplitudi verjetnosti kvantnega delca s kinetično energijo (1) na enotski sferi, pri čemer moramo ločno dolžino l interpretirati kot "imaginarni čas". Za fazno vsoto dobimo tako enačbo, analogno Schrödingerjevi enačbi [1]

$$\frac{\partial \mathcal{Z}[\mathbf{t}(L), \mathbf{t}(0); L]}{\partial L} = \frac{1}{2\mathcal{L}_p} \mathbf{L}^2 \mathcal{Z}[\mathbf{t}(L), \mathbf{t}(0); L], \qquad (3)$$

kjer je $\mathcal{L}_p = \beta K_c$ persistenčna dolžina filamenta¹ in \mathbf{L}^2 kotni del Laplaceovega operatorja v krogenlnih koordinatah².

Prvi pomemben rezultat Kratky-Porod modela so smerne korelacije vzdolž elastičnega filamenta. Te padajo eksponentno, pri čemer je "razpadna dolžina" enaka persistenčni dolžini \mathcal{L}_p

$$\langle \mathbf{t}(0) \cdot (\mathbf{R}(L) - \mathbf{R}(0)) \rangle = \mathcal{L}_p \left(1 - e^{-L/\mathcal{L}_p} \right) .$$
 (4)

Drugi pomemben rezultat modela pa je povprečen kvadrat razdalje med koncema verige

$$\langle (\mathbf{R}(L) - \mathbf{R}(0))^2 \rangle \rangle = 2\mathcal{L}_p \left(L - \mathcal{L}_p + \mathcal{L}_p e^{-L/\mathcal{L}_p} \right) \,. \tag{5}$$

Do teh rezultatov sta prva prišla Kratky in Porod, po katerih se tudi imenuje ta model elastičnega filamenta. Kratky-Porod model pogosto imenujejo model/teorija "črvaste" verige (angl. wormlike chain model/theory) ali model semifleksibilne verige (od tu naprej WLC).

Poglejmo sedaj še rezultat Kratky-Porod modela v limitah fleksibilnega filamenta in trdega filamenta. V limiti fleksibilnega filamenta $L/\mathcal{L}_p \to \infty$ je

$$\lim_{L/\mathcal{L}_p \to \infty} \langle (\mathbf{R}(L) - \mathbf{R}(0))^2 \rangle = aL, \quad \lim_{L/\mathcal{L}_p \to \infty} \langle \mathbf{t}(0) \cdot (\mathbf{R}(L) - \mathbf{R}(0)) \rangle = a, \quad (6)$$

kjer je $a = 2\mathcal{L}_p$ Kuhnova dolžina in opisuje neodvisno enoto verige. V tej limiti torej ni več korelacij vzdolž verige med segmentoma daleč narazen. Tako lahko fleksibilen filament razumemo kot verigo, sestavljeno iz Kuhnovih segmentov dolžine a.

 $^{^1}$ Persistenčna dolžina DNA molekule je 46 – 50 nm oz. 140-150 baznih parov. Prvi je persistenčno dolžino DNA poskušal določiti Anton Peterlin. Njegov rezultat je 40.6 (1 \pm 0.28) nm oz. približno 120 baznih parov.

²Kotni del Laplaceovega operatorja v krogelnih koordinatah r, ϕ, θ je $\mathbf{L}^2 = \frac{1}{\sin \theta} \frac{\partial}{\partial \theta} \left(\sin \theta \frac{\partial}{\partial \theta} \right) + \frac{1}{\sin^2 \theta} \frac{\partial^2}{\partial \phi^2}$.

Na drugi strani v limiti tr
dega filamenta $L/\mathcal{L}_p \to 0$ dobimo

$$\lim_{L/\mathcal{L}_p \to 0} \langle (\mathbf{R}(L) - \mathbf{R}(0))^2 \rangle = L^2 , \quad \lim_{L/\mathcal{L}_p \to 0} \langle \mathbf{t}(0) \cdot (\mathbf{R}(L) - \mathbf{R}(0)) \rangle = L .$$
(7)

V tej limiti seveda termične fluktuacije nimajo več vpliva na rezultat.

2 Elastičen odziv molekule DNA

Poglejmo sedaj kako se Kratky-Porod filament odzove na zunanjo silo. Denimo, da na prosti konec molekule, deluje slia F, pri čemer je drugi konec molekule pritrjen. Sila razteguje molekulo, saj posamezni segmenti molekule težijo k temu, da bi se poravnale v smeri sile. Na ta način zunanja sila veča red molekule, čemur nasprotujejo termične fluktuacije.

V tem primeru je prosta energija

1

$$\mathcal{F} = \frac{1}{2} K_c \int_0^L \left(\frac{\mathrm{d}\mathbf{t}}{\mathrm{d}l}\right)^2 \mathrm{d}l + \mathbf{f} \cdot \left(\mathbf{R}(L) - \mathbf{R}(0)\right).$$
(8)

Zunanja sila je torej linearni člen v hamiltonjanu \mathcal{F} . Razdaljo med koncema molekule tako dobimo z odvajanjem proste energije po sili

$$\frac{\partial \mathcal{F}(f)}{\partial \mathbf{f}} = -k_B T \frac{\partial \ln \mathcal{Z}(f)}{\partial \mathbf{f}} = \left\langle (\mathbf{R}(L) - \mathbf{R}(0)) \right\rangle, \tag{9}$$

kjer smo upoštevali zvezo med prosto energijo in fazno vsoto $\mathcal{F}(l) = -k_B T \ln \mathcal{Z}(f)$. Fazne vsote \mathcal{Z} v splošnem ni mogoče analitično izračunati, lahko pa jo izračunamo v obeh limitnih primerih.

V limiti majhne zunanje sile $f\mathcal{L}_p \ll k_B T$ je odvisnost dolžine med koncema molekule $\langle x \rangle = \langle (\mathbf{R}(L) - \mathbf{R}(0)) \rangle$ od zunanje sile f [1]

$$\frac{\langle x \rangle}{L} = \mathcal{L}\left(\frac{fa}{k_B T}\right) \,, \tag{10}$$

kjer je L dolžina polimera, T temperatura in k_B Boltzmannova konstanta. \mathcal{L} je Langevinova funkcija $\mathcal{L}(x) = \operatorname{coth}(x) - 1/x$. Enačbo (10) lahko obrnemo pa dobimo

$$f = \frac{k_B T}{a} \mathcal{L}^{-1} \left(\frac{\langle x \rangle}{L}\right) \,. \tag{11}$$

V limiti velike zunanje sile $f\mathcal{L}_p \gg k_B T$ pa je odvisnost dolžine med koncema molekule $\langle x \rangle$ od zunanje sile f [1]

$$\frac{\langle x \rangle}{L} = 1 - \frac{1}{\sqrt{4\beta \mathcal{L}_p f}} \,. \tag{12}$$

Potrebno je še omeniti, da ta model ne vključuje raztegovanje molekule v smislu spremembe razdalje med baznimi pari. Ta predpostavka je skrita v $\mathbf{t}(l) \cdot \mathbf{t}(l) = 1$ v vsaki točki vzdolž verige. Za majhne zunanje sile je ta vez smiselna, ne velja pa dobro za velike sile.

Elastične lastnosti molekule DNA je možno izmeriti na eni sami molekuli. Približno lahko ocenimo, kakšnega velikostnega reda so sile, ki so pri sobni temperaturi smiselne za meritev elastičnega odziva molekule DNA

$$f \approx \frac{k_B T}{\mathcal{L}_p} = \frac{1.4 \times 10^{-23} \,\mathrm{Nm/K} \cdot 3 \times 10^2 \,\mathrm{K}}{5 \times 10^{-8} \mathrm{m}} \approx 0.1 \,\mathrm{pN} \,. \tag{13}$$

Bilo je opravljenih kar nekaj meritev z različnimi metodami. Predstavimo najprej meritve raziskovalcev Smith, Finzi in Bustamante [2]. Molekulo DNA so na enem koncu kemijsko pritrdili na stekleno površino, na drugem pa na magnetno kroglico. Na magnetno kroglico so nato delovali z med seboj pravokotnima silama: magnetno in viskozno (slika 1B). To so dosegli z več gibajočimi magneti in tokom viskozne tekočine. S tokom viskozne tekočine lahko dosežemo precej velike sile, vendar jih zaradi strižnih sil ob stekleni površini težko izmerimo. Na drugi strani magnetna sila tipično ni večja od 1 pN, a jo je lažje izmeriti [2]. Na ta način lahko z magnetno silo kalibriramo viskozno. Vsaka kombinacija magnetne in viskozne sile je tako odklonila kroglico za določen kot θ glede na smer magnetne sile (slika 1A). Večji



Slika 1: (B) Molekula DNA je pritrjena na kroglico, na kateru delujeta magnetna in viskozna sila. (A) Z magnetno silo kalibrirajo viskozno. Vsaka kombinacija magnetne in viskozne sile tako odkloni kroglico za določen kot θ glede na smer magnetne sile. Večji kot je tok viskozne tekočine, večji je kot θ . Na ta način položaj magnetne kroglice opiše elipso. [2]

kot je tok viskozne tekočine, večji je kot θ . Na ta način položaj magnetne kroglice opiše elipso, kar so opazovali na monitorju. Iz podatkov so izluščili razteg molekule in relativne magnitude magnetne in viskozne sile.

Izkaže se, da za odvisnost raztezka od sile obstaja interpolacijska formula, ki deluje tako v limiti velikih kot majhnih sil [3]

$$\frac{f\mathcal{L}_p}{k_BT} = \frac{1}{4} \left(1 - \frac{x}{L}\right)^{-2} - \frac{1}{4} + \frac{x}{L} \,. \tag{14}$$

Za velike sile $f\mathcal{L}_p \gg k_B T$ dobimo kvadratne fluktuacije okoli ravnega polimera, za majhne sile $f\mathcal{L}_p \ll k_B T$ pa dobimo naključno hojo (angl. random walk). Nelinearno prilagajanje funkcije (14) z metodo najmanjših kvadratov je v tem primeru [3] dal za rezultat $L = 32.80 \pm 0.10 \ \mu m$ in $\mathcal{L}_p = 53.4 \pm 2.3 \ nm$. Slika 2 prikazuje ujemanje izmerjene enačbe stanja za λ -DNA z enačbo stanja (14) (polna črta). Za primerjavo je dodana še enačba stanja v limiti majhnih zunanjih sil (10) (prekinjena črta).



Slika 2: Primerjava izmerjene enačbe stanja za λ -DNA z analitično zvezo med silo in raztezkom (14) (polna črta). S črtkano črto je prikazana enačba stanja v limiti majhnih zunanjih sil (10) (prekinjena črta). [3]

3 Elektrostatski vpliv na raztezanje DNA

Teorija raztezanja DNA, ki smo jo do sedaj predstavili je sicer zelo priročna a ne upošteva vpliva elektrostatike. Konec koncev je molekula DNA zaradi fosfatnih skupin zelo močno nabita in zato naboj nezanemarljivo vpliva na elastične lastnosti molekule [4]. Tako moramo v model vključiti še elektrostatski potencial med nabitima monomeroma. Izkaže se, da vpliv elektrostatske interakcije lahko upoštevamo s popravkom k elastičnima parametra K_c in λ . DNA obravnavamo v vodni raztopini monovalentnih ionov. Če je koncentracija soli visoka, potem elektrostatsko interakcijo dobro aproksimiramo s senčenim Debye-Hückelovim potencialom v kontinuumski limiti [4]

$$V(\mathbf{r}(z), \mathbf{r}(z')) = \frac{k_B T l_B}{a^2} \frac{\exp\left(-\kappa \left|\mathbf{r}(z) - \mathbf{r}(z')\right|\right)}{\left|\mathbf{r}(z) - \mathbf{r}(z')\right|},\tag{15}$$

kjer je l_B Bjerrumova dolžina

$$_B = \frac{e^2}{4\pi\epsilon_0 k_B T} \,. \tag{16}$$

Tu je *a* efektivna razdalja med naboji po kondenzaciji protionov in κ inverzna Debyeva dolžina. *z* in *z'* sta koordinati, ki parametrizirata polimer. Pokazali so [5], da je zveza med silo in raztezkom v limiti velikih zunanjih sil

l

$$\frac{x}{L} = 1 - \frac{k_B T}{2\sqrt{K_c^{(R)} f}} + \frac{f}{\lambda^{(R)}} \equiv y(f) , \qquad (17)$$

kjer sta $K_c^{(R)}$ in $\lambda^{(R)}$ renormalizirana elastična modula. Njuna odvisnost od parametrov elektrostatskega potenciala je podana z zvezama [5]

$$\lambda^{(R)} = \lambda - \frac{k_B T l_B}{\Delta^2 a^2} \left(e^{\kappa a} - \text{Ei}(-\kappa a) \right) , \qquad K_c^{(R)} = K_c + \frac{K_B T l_B}{4\Delta^3 (\kappa a)^2} , \tag{18}$$

kjer sta K_c in λ vrednosti elastičnih modulov brez upoštevanja elektrostatskih efektov. Ei(x) je eksponentna integralska funkcija³, Δ pa parameter lokalnega raztezka

$$\Delta = \frac{\lambda + f}{\lambda^{(R)}} \,. \tag{19}$$

Iz zvez (18) je vidno, da manjša koncentracija soli pomeni večji upogibni modul K_c in manjši razteznostni modul λ . Te efekte so kvalitativno raziskali v [6]: sprememba upogibnega modula je povezana s tem, da je efektivna interakcija med daljnima segmentoma vzdolž DNA odbojna, kar pomeni, da interakcija nasprotuje upogibanju in s tem veča upogibni modul. Razteznostni modul pa je sorazmeren drugemu odvodu potenciala po koordinati, ki opisuje polimer, kar pomeni, da Debye-Hückelov odboj lokalno raztegne segment molekule. Ker se ta dolžina poveča, postane interakcijska energija v minimumu bolj položna in zato drugi odvod manjši. Tako torej močnejši elektrostatski odboj vodi do manjše vrednosti razteznostnega modula.

Takoj lahko izračunamo še prosto energijo verige $G_{el}(f,L)$ iz pogoja za ravnovesje pri konstantni sili

$$-\frac{\partial G_{el}(f,L)}{\partial f} = x.$$
⁽²⁰⁾

Po integraciji dobimo

$$G_{el}(f,L) = L \left[\frac{f^{1/2}}{\beta \sqrt{K_c^{(R)}}} - f - \frac{f^2}{2\lambda^{(R)}} \right] = Lg(f) .$$
(21)

Ta enačba nam podaja elastično prosto energijo nabite semifleksibilne verige, ki jo napenja zunanja silaf.

³Eksponentna integralska funkcija je definirana s predpisom $\operatorname{Ei}(x) = \int_{-\infty}^{x} \frac{e^{t}}{t} dt$

4 Meritev strukturnega prehoda B-DNA–S-DNA

Meritve raztezka molekule DNA pod vplivom zunanje sile [2], kot tudi primerjavo rezultatov meritev z napovedjo Kratky-Porod modela [3] smo že predstavili. V skladu s teoretičnimi napovedmi so ugotovili, da sila med 2 in 3 pN raztegne molekulo DNA do 90 % njene celotne dolžine L in da strmo naraste, ko se raztezek bliža L. Toda njihovi eksperimenti so bili omejeni na sile manjše od 20 – 30 pN.

V tem poglavju pa bomo predstavili rezultate meritev odziva DNA molekule na zunanjo silo v razponu med 10 in 160pN [7]. Uspeli so izmeriti dva tipa krivulj sila-raztezek. Prvi je enostaven monoton profil z enim ravnim delom (slika 3A), ki mu sledi strm padec sile, drugi pa je bolj kompleksen z več ravnimi deli (slika 3B). Enostavnejše krivulje so bile rezultat poskusov z majhno gostoto DNA molekul (1 ali 2 molekuli), medtem ko so bile kompleksnejše in nereproducibilne krivulje rezultat poskusov z večjim številom (gostoto) molekul [7].

DNA so lahko raztegnili do vsaj 1.7L. Najpomembnejši rezultat meritev je prisotnost ravnega dela krivuje, kjer se DNA raztegne pri skoraj konstantni raztezni sili. Ker se ravni del krivulje začne okoli popolno iztegnjene molekule (L) B-konfiguracije, ta proces razumejo kot napetostno induciran strukturni prehod. Kvalitativno je ta proces reverzibilna transformacija baz med B-DNA konfiguracijo in raztegnjeno konfiguracijo DNA, ki jo imenujejo S-DNA (angl. stretched DNA). Proces je končan na koncu ravnega dela krivuje. Če je koncema molekule dovoljena rotacija, ta model predpostavlja, da je struktura S-DNA lestvi podobna molekula, in jo lahko interpretiramo kot odvito dvojno vijačnico. To seveda pomeni, da je S-DNA daljša od B-DNA.

Prehod med konfiguracijama B- in S-DNA bolje razumemo, če molekulo DNA obravnavamo kot verigo elementov (nukleotidnih parov), ki so lako v dveh možnih stanjih: v kratkem stanju z dolžino l_1 (B-DNA) in dolgem stanju z dolžino l_2 (S-DNA) z razliko energij med stanji ΔE . ω je interakcija med najbližjimi B-DNA in S-DNA elementi in določa energijo potrebno, da S-DNA element vstavimo v območje z B-DNA elementi. Sila, ki jo da ta model je [7]

$$f = \frac{\Delta E}{\Delta l} + \frac{k_B T N}{\Delta l} \ln \left[\frac{\beta + 2y/\Delta l}{\beta - 2y/\Delta l} \right], \qquad (22)$$

kjer je

$$\beta = \sqrt{1 - \left[1 - \exp\left(\frac{\omega}{k_B T}\right)\right] \left[1 - \left(\frac{2y}{\Delta l}\right)^2\right]}.$$
(23)

Tu je $y = x/N - (l_1 + l_2)/2$, N je število elementov (nukleotidnih parov), $\Delta l = l_2 - l_1$ in x je raztezek verige. Za $\omega = -16.6 \text{ kJ/mol}$ na bazni par, kar ne favorizira izoliranih S-DNA ali B-DNA elementov, so v območju prehoda dobili odlično ujemanje z meritvami (slika 3A).



Slika 3: (A) Izmerjena odvisnost sile od raztezka za malo število molekul. Pojavi se en ravni del krivulje, kjer v majhnem razponu sil raztezek hitro naraste. Gre za strukturni prehod iz B-DNA v S-DNA (angl. stretched DNA). Ko so poskus ponovili z večjim številom molekul, so dobili več ravnih delov (B). [7]

5 Elastična teorija prehoda B-DNA–S-DNA

Zanima nas, ali je mogoče najti enostaven in splošen elastičen model za polimere, ki so podvrženi dovolj velikim napetostim, da pride do strukturnega prehoda med nizkonapetostnim stanjem (B) in novim raztegnjenim stanjem (S), ki ima zaradi zunanje napetosti nižjo prosto energijo.

Predstavili smo že dvonivojski model (Isingov model) [7], ki da v območju prehoda B-DNA–S-DNA dobro ujemanje z meritvami odvisnosti sile od raztezka. V tem modelu je segment polimera bodisi v B stanju ali v S stanju. B in S segmenti so ločeni z ozkimi mejami (B, S stiki), ki so energijsko neugodne [4]. Višja kot je energija stika, bolj ugodna je fazna transformacija B-S⁴. Problem tega modela je, da ne vključuje efektov fleksibilnosti verige in zato ne deluje v območju nizkih napetosti, kjer pa naj bi veljala enačba (14). Ne vključuje niti vpliva soli (koncentracije raztopine) na prehod.

V tem poglavju pa bomo predstavili izračun analitične krivulje sila-raztezek, ki ga avtorji [8] imenujejo dvonivojski WLC (worm-like chain) model. To je model, katerega limitna primera sta na eni strani čisti WLC (tudi Kratky-Porod) in na drugi strani čisti Isingov model. V tem modelu se torej odvisnost sile od raztezka v limiti majhnih sil zreducira v enačbo (14). Model daje uporaben izraz za prilagajanje krivulje k meritvam odvisnosti sile od raztezka na večjem območju sil in zagotavlja orodje za študij efektov termičnih fluktuacij pri prehodu B-DNA–S-DNA [8].

Molekulo DNA razdelimo na zaporedje kratkih segmentov dolžine *a*, tako da je lahko vsak segment bodisi v B bodisi v S stanju. Energija ΔE , ki je potrebna, da transformiramo B segment v S segment bo odvisna od stanj obeh sosednjih segmentov. Če stanje B označimo z (\uparrow), stanje S pa z (\downarrow), potem ima energijski spekter 4 različne vrednosti: $\Delta E(\uparrow\uparrow)$, $\Delta E(\downarrow\downarrow)$, $\Delta E(\uparrow\downarrow)$ in $\Delta E(\downarrow\uparrow)$, odvisno od stanj dveh sosedov. Zaradi simetrije sta dve stanji energijsko degenerirani $\Delta E(\uparrow\downarrow) = \Delta E(\downarrow\uparrow)$. Najenostavnejši primer je simetrični spekter okoli srednjega energijskega nivoja $\Delta E(\uparrow\downarrow) = \Delta E(\downarrow\uparrow)$. Takšen spekter je lahko parametriziran z dvema količinama *H* in *J*

$$\Delta E(\uparrow\uparrow) = 2H + 4J, \qquad (24)$$

$$\Delta E(\uparrow\downarrow) = \Delta E(\downarrow\uparrow) = 2H , \qquad (25)$$

$$\Delta E(\downarrow\downarrow) = 2H - 4J. \tag{26}$$

Hamiltonjan za take vrste Isingov model najbližjih sosedov lahko zapišemo kot

$$\mathcal{H}_{int} = -J \sum_{i=1}^{N} S_i S_{i+1} - H \sum_{i=1}^{N} S_i \,.$$
(27)

Količini H in J določimo s prilagajanjem funkcije k meritvam. Fizikalen pomen parametra 2H je razlika proste energije na segment med stanjema B in S ob odsotnosti zunanje napetosti. Če delni raztezek stanja S označimo z δ , potem je kritična napetost T_c za prehod B-S reda $H/(a\delta)$. Parameter J meri korelacijsko energijo med sosednima segmentoma. Globalna sklopitev med notranjo strukturo in konformacijo verige je zagotovljena z vezjo [8]

$$L(\{S_i\}) = L_0 \left(1 - \frac{\delta}{2N} \sum_{i=1}^N (S_i - 1) \right) , \qquad (28)$$

kjer je L_0 dolžina verige v B fazi, $N \gg 1$ število segmentov in $S_i = \pm 1$ spremenljivka, ki je enaka 1 v stanju B in -1 v stanju S. Dolžina verige L tako postane statistična spremenljivka, katere termično povprečje $\langle L \rangle$ izračunamo kot ustrezen odvod proste energije.

Efektiven Hamiltonjan dobimo s kombinacijo enačb (27) in (21)

$$\mathcal{H}_{eff} = \mathcal{H}_{int} + Lg(f) \,. \tag{29}$$

Z uporabo tega modela se da analitično izračunati [8] zvezo med silo in raztezkom

$$\frac{x(f)}{L_0} = y(f) \left[1 + \frac{\delta}{2} (1 - \langle S \rangle) \right] , \qquad (30)$$

⁴Omeniti še moramo, da zaradi enodimenzionalne narave verige prehod B-S ni pravi fazni prehod.

kjer je termično povprečje spremenljivke S

$$\langle S \rangle = \frac{e^{\beta J} \sinh\left(\beta \tilde{H}\right) + \frac{1}{2} e^{2\beta J} \sinh\left(2\beta \tilde{H}\right) Z}{e^{\beta J} \cosh\left(\beta \tilde{H}\right) + Z}$$
(31)

 ${\cal Z}$ pa je

$$Z = \sqrt{e^{2\beta J} \cosh^2\left(\beta \tilde{H}\right) - 2\sinh\left(2\beta J\right)}.$$
(32)

Elastično enačbo stanja y(f) = x/L, kot so jo izračunali v [8] dobimo, če v enačbi stanja (17) upoštavamo nepopravljena elastična modula. Končno je renolmalizirano zunanje polje \tilde{H} [4]

$$\tilde{H} = H + \frac{\delta a}{2}g(f) .$$
(33)

V članku [8] so svoj model prilagajali eksperimentalnim podatkom iz [7]. Najboljše ujemanje (polna črta J, H) so dobili za $J = 1.25k_BT$, $H = 1.64k_BT$ na bazni par in $\delta = 0.78$. Ujemanje teorije z eksperimentom je zelo dobro z izjemo relativnih raztezkov ~ 1. Neujemanje je posledica notranjih raztezkov, ki jih pri tej teoriji niso upoštevali. Na sliki 4B vidimo, da se pri nizkih silah (< 10 pN) opisana teorija popolnoma ujema s čistim WLC modelom. Termične fluktuacije imajo zanemarljiv vpliv v območju majhnih sil. Raven del krivulje za relativne raztezke > 1 in sile ~ 70 pN (slika 4A) kaže na hkratni obstoj velikega območja B segmentov in S segmentov na enaki verigi. V tem območju sil se B segmenti hitro transformirajo v S segmente z naraščajočo silo. Za zelo velike sile krivulja sila-raztezek hitro naraste. Veriga je tako skoraj dosegla njen maksimalni raztezek za S fazo.



Slika 4: (A) Meritvam odvisnosti sile od raztezka so prilagajali enačbo stanja dvonivojskega WLC modela (30). Vidimo, da se ta model v limitnih primerih ujema s čistim WLC modelom (za majhne sile) in čistim Isingovim modelom (za velike sile). Ujemanje teorije z eksperimentom je v splošnem dobro. Problem je le pri relativnih raztezkih ~ 1 , kjer ujemanje ni optimalno. To je posledica notranjih raztezkov (raztezkov kemijskih vezi), ki jih pri tej teoriji niso upoštevali. (B) Vpliv termičnih fluktuacij. Izkaže se da je krivulja za tršo verigo prestavljena v desno. Razlog je v tem, da povečanje trdnosti verige zatre termične fluktuacije v obliki verige. Zmanjšanje termičnih fluktuacij pa poveča efektivno dolžino verige in s tem efektivne maksimalne raztezke B in S stanj. [8]

Poglejmo sedaj še efekt termičnih fluktuacij verige na B-S transformacijo. Krivuljo so izračunali še enkrat za enake vrednosti J in H, z razliko, da so tokrat povečali energijo ukrivljenosti za faktor 10 [8]. To je pričakovano vodilo v velike razlike v krivulji sila-raztezek pri silah < 10 pN (pikčasta krivulja J, H na sliki 4B), saj je v čistem WLC režimu sila obratno sorazmerna energiji ukrivljenosti (14). Pričakovali bi, da bodo fluktuacije pri višjih silah zanemarljive, a temu ni tako (slika 4A). Izkaže se, da je celotna krivulja za tršo verigo prestavljena v desno. Fizikalni razlog za ta premik krivulje je v tem,

da povečanje trdnosti verige zatre termične fluktuacije v obliki verige. Zmanjšanje termičnih fluktuacij pa poveča efektivno dolžino verige, kar poveča efektivne maksimalne raztezke B in S stanj. Opazimo še, da v režimu soobstoja obeh faz fleksibilnost verige nima efekta.

Efekt fleksibilnosti verige na B-S prehod je še večji, če sta J in H zmanjšana pod vrednost dobljeno s prilagajanjem funkcije meritvam. Na sliki 4A vidimo krivulji še za J/2, H/2 in J/4, H/4 tako za originalno in povečano trdnost verige (neprekinjena/prekinjena krivulja). Odstopanje je večje in se sedaj pojavi tudi v režimu obeh faz. V vseh primerih pa se povečana trdnost verige kaže v večjem raztezku pri enaki sili. Fluktuacije v konformaciji verige so tako pomembne ne samo v režimu malih sil, pač pa tudi pri večjih silah, kar kaže na to da potrebujemo model, ki vključuje notranje prostostne stopnje in geometrično obliko (npr. ukrivljenost), da se teorija ujema z meritvami na celotnem območju sil [8].

Treba je še poudariti, da dvonivojski WLC model temelji na nekaj predpostavkah, ki niso nujno povsem opravičene: 1) predpostavlja simetričen spekter za transformacijsko energijo, 2) zanemari korelacijo naslednjega najbližjega segmenta (soseda), 3) predpostavlja enako upogiblno energijo v obeh stanjih (B in S), 4) zanemari heterogenost verige (zaporedje baznih parov) in 5) zanemari razne defekte, ki bi lahko vodili do razdružitve obeh verig molekule, ali pa sprožili lokalno topljenje⁵ DNA.

Da bi izboljšali ujemanje teorije z meritvami za raztezke reda 1, avtorji [8] predlagajo vključitev intrinzične elastičnosti verige (Odijk 1995). Izkaže se, da lahko lokalno sklopitev med parametrom urejenosti in togost ukrivljanja obravnavamo preprosto z redefiniranjem parametra J, medtem ko druge predpostavke zahtevajo dodatno numerično modeliranje in eksperimentalno testiranje. Napovejo, da bi bil uporaben test ponovno izmeriti krivuljo sila-raztezek pri nizkih koncentracijah soli. To bi po njihovem mnenju zmanjšalo vrednosti parametrov J in H (zaradi dodatnega elektrostatskega odboja med monomeroma). Skladno s sliko 4A v tem režimu pričakujejo večje odstopanje od dvonivojskega WLC modela.

5.1 Vpliv koncentracije soli v raztopini

Avtorji članka [4] so se v odgovor dvonivojskemu WLC modelu vprašali, ali je možno v ta model vključiti še vpliv soli. Uporabili so zvezo (30) v kombinaciji z enačbo stanja y(f) (enačba 17), kjer pa so uporabili renoramalizirana elastična modula $K_c^{(R)}$ in $\lambda^{(R)}$ (18), kot so ju izpeljali v [6]. Ta popravljen model so prilagajali na eksperimentalne podatke iz [5] za različne koncentracije soli. Ugotovili so, da take vrste teoretičen opis ne opiše pravilno enačbe stanja za vse vrednosti koncentracije soli. To neujemanje naj bi bilo posledica tega, da sta elastični energiji B in S segmentov obravnavani kot enaki. Pokazalo se je, da sila po ravnem delu krivulje spet strmo naraste. Naraščanje se nadaljuje vse do ~ 140 pN, kjer se krivuja sila-raztezek dsDNA začne ujemati s tisto, ki pripada raztezanju ssDNA [10]. Ker se elastični moduli ssDNA opazno razlikujejo od modulov dsDNA [11], sklepajo, da ni pravilno obravnavati elastične parametre kot konstantne vzdolž DNA. V nadaljevanju bomo predstavili popoln opis teoretične krivulje sila-raztezek preko modela, kjer elastični parametri niso konstantni vzdolž molekule, in kjer je upoštevana tudi njihova odvisnost od koncentracije soli.

Sprememba strukture DNA med prehodom B–S ima nekaj pomembnih posledic: 1) nehomogenost elastičnih lastnosti vzdolž molekule, 2) neenakomerna porazdelitev naboja vzdolž molekule, 3) reducirana povprečna gostota naboja. Zato v [4] predlagajo popravljen model. DNA molekulo opišejo s segmenti v B-stanju (dsDNA) in S-stanju (raztopljena DNA). Segmente v S-stanju modelirajo kot dve rahlo ločeni, a vzporedni verigi, ki sta elektrostatsko sklopljeni in interagirajo elektrostatsko na podoben način kot segmenti v B-stanju. Z drugimi besedami: ne ločujejo med preraztegnjeno in raztopljeno molekulo DNA.

Efektivno prosto energijo, povezano z notranjo strukturo stanja WLC pod konstantno silo zapišejo kot

$$H_{WLC} = \frac{L}{N} \sum_{i=1}^{N} \left[\delta_{S_{i,+1}} g_{ds}(f) + \delta_{S_{i,-1}} g_{ss}(f) \right] , \qquad (34)$$

kjer je $\delta_{S_i,\pm 1}$ Kroneckerjev simbol, g_{ds} in g_{ss} sta gostoti proste energije čistega B-stanja (ds) in čistega S-stanja (raztopljeno stanje). Njuna odvisnost od sile f je enaka kot v enačbi (21), le da z različnima

⁵Topljenje DNA je proces, pri katerem se dsDNA odvije in loči v ssDNA preko razpada vodikove vezi med bazami [9].



Slika 5: (A) in (B) Odvisnost enačbe stanja (sila-raztezek) od koncentracije soli v raztopini. Vidimo, da koncentracija raztopine vpliva na obliko enačbe stanja. Vpliva predvsem na strmino krivulje pri strukturnem prehodu. Eksperimentalnim podatkom so prilagajali popravljeno teorijo dvonivojskega WLC sistema, kjer so dobili enačbo stanja (37). Ujemanje je za vse koncentracije zelo dobro. [4]

renormaliziranima elastičnima moduloma (18). Edina razlika v elastičnih modulih obeh stanj je v različnih K_c in λ (elastična modula pred renormalizacijo). Tako je upoštevana nehomogenost verige, o kateri smo diskutirali zgoraj. Vseeno pa ta preprost opis predpostavi, da je celotna interakcijska energija ds segmentov neodvisna od celotne interakcijske energije ss segmentov, s čimer zanemari elektrostatske interakcije dolgega dosega. Te predpostavke se rešimo če še enkrat izrazimo celotno prosto energijo kot vsoto enačb (27) in (34)

$$\mathcal{H}_{eff} = -J \sum_{i=1}^{N} S_i S_{i+1} - \tilde{H}(f) \sum_{i=1}^{N} S_i - \frac{L_0 \delta}{4N^2} \left[g_{ds}(f) - g_{ss}(f) \right] \left(\sum_{i=1}^{N} S_i \right)^2 + \frac{L_0}{2} \left(1 + \frac{\delta}{2} \right) \left[g_{ds}(f) + g_{ss}(f) \right],$$
(35)

kjer je efektivno zunanje polje $\tilde{H}(f)$ podano z enačbo

$$\tilde{H}(f) = H - \frac{a_0}{2} \left[g_{ds}(f) - (1+\delta)g_{ss}(f) \right] \,. \tag{36}$$

Takoj vidimo, da tretji člen v enačbi (35) res opiše globalno sklopitev, t.j. sklopitev dolgega dosega, med notranjimi spremenljivkami stanja S_i .

Sedaj ko imamo efektiven Hamiltonjan (35), lahko napravimo statistično povprečje preko vseh možnih stanj in nato izračunamo analitično enačbo stanja [x(f)] tega modela. Izpeljava je narejena v [4], mi navedemo le končni rezultat

$$\frac{x}{L_0} = \frac{1}{2} \left(1 + \frac{\delta}{2} \right) \left[y_{ds}(f) + y_{ss}(f) \right] + \frac{1}{2} \left[y_{ds}(f) - (1 + \delta) y_{ss}(f) \right] \langle S \rangle - \frac{\delta}{4} \left[y_{ds}(f) - y_{ss}(f) \right] \langle S \rangle^2 .$$
(37)

Tu je $y_{ds}(f) = -\partial g_{ds}/\partial f$ in analogno za y_{ss} . To sta v resnici le krivulji sila-raztezek, dani z enačbo (17), le da so elastični parametri zamenjani s tistima za ds-stanje in ss-stanje, kot smo v tem poglavju že diskutirali.

Če v enačbo (37) vstavimo $\langle S \rangle = \pm 1$, krivulja ustreza limitnima primeroma čiste ds-DNA in čiste preraztegnjene DNA. Tako smo opisali teorijo, ki sklaplja spremembo elastičnih parametrov s faznim prehodom na netrivialen način in da pravina rezultata v obeh limitnih primerih. Še več: v tem modelu so vključeni tudi elektrostatski efekti preko renormaliziranih elastičnih modulov.

Odvisnost parametrov J, H, a in δ od koncentracije soli so določili z nelinearno metodo najmanjših kvadratov, pri čemer so uporabili eksperimentalne podatke iz [5]. V primeru dsDNA so za elastična

modula (nerenormalizirana) uporabili vrednosti $\lambda_{ds} = 1256 \text{ pN}$ in $K_{ds}/k_BT = 46 \text{ nm}$, v primeru ssDNA stanja pa $\lambda_{ss} = 920 \text{ pN}$ in $K_{ss}/k_BT = 0.75 \text{ nm}$. Na podlagi teh vrednosti teoretični model, ki smo ga predstavili zelo dobro opiše eksperimentalne podatke (sliki 5a in 5b) za vse koncentracije soli. Edin primer, kjer se pojavijo manjša odstopanja med teorijo in eksperimentom se pokažejo v režimu za prehodom.

6 Raztegovanje in relaksacija DNA

Nekoliko novejša eksperimentalna metoda za manipulacijo s posameznimi makromolekulami je metoda z lasersko pinceto. Tu v laserskem curku držimo kroglico, na katero je pritrjen en konec molekule DNA. Drugi konec je pritrjen na še eno kroglico. Ta ni v laserskem curku, pač pa je pritrjena na mikropipeto. DNA nato raztegujejo tako, da premikajo pipeto glede na lasersko pinceto (slika 5), raztezek pa potem izmerijo z videokamereo iz razdalje med kroglicama. Silo kalibrirajo s tokom viskozne tekočine, kjer upoštevajo Stokesov zakon. Možno jo je kalibrirati tudi z optično pinceto z dvojnim laserskim curkom [11].



Slika 6: Shema meritve enačbe stanja makromulekule z lasersko pinceto. Vsak izmed koncev molekule je pritrjen na svojo kroglicu, pri čemer je ena kroglica ujeta v laserskem curku, druga pa je pritrjena na stekleno mikropipeto. Molekulo raztegujemo tako, da premikamo mikropipeto in opazujemo razteg na ekranu.[12].

Izmerjena odvisnost sile od raztezka [11] za eno samo molekulo v 150mM raztopini NaCl je prikazana na sliki 7a. Dolžina λ -DNA naj bi bila 16.4 μ m (3.38 Å/bp). Za manjše raztezke (10-15 μ m) majhna sila (< 5 pN) ustreza entropični elastičnosti dsDNA, skladno s prejšnjimi raziskavami [2]. Sila sunkovito naraste, ko se približujemo dolžini molekule.

Pri silah < 50 pN, kjer je molekula še vedno v svoji B-obliki, se že pozna neupoštevanje notranjega raztezka molekule (raztezka kemijskih vezi) v teoretičnih izračunih. To se izraža v neujemanju modela neraztegljive semifleksibilne verige z meritvami. Elastičnost molekule DNA so povprečili preko 10 posameznih molekul in preko tega neujemanja (slika 7a)ocenili Youngov prožnostni modul $3.46\pm0.3\times10^8$ Pa [11].

Pri sili $F \approx 65 \text{ pN}$ se molekula hitro podaljša in se raztegne do ~ 1.7-kratno dolžino molekule DNA v B-obliki, kar ustreza razdalji med baznimi pari od 3.4 do 5.8 Å. Ta prehod se zgodi v zelo ozkem območju sil (~ 2 pN). Sila ponovno hitro naraste pri raztezkih večjih od 28 μ m, kar kaže na to, da je molekula v celoti v preraztegnjeni obliki (fazi).

Med razbremenitvijo se v krivulji sila-raztezek pogosto pojavi histereza (slika 7a). Mehanizem, ki bi lahko bil v ozadju tega pojava je prikazan na sliki 7b. Denimo da bi molekula DNA imela vsaj na enem mestu eno od vijačnic prekinjeno. Tak defekt je na sliki 7b označen z *. Natezna sila bi dvojno vijačnico B-DNA najprej odvila. Rezultat tega bi bila preraztegnjena, lestvi podobna molekula. Navajajo dva možna scenarija: paralelno lestev (B) in asimetrično zamaknjeno lestev (B'). Če bi preraztegnjena molekula dsDNA ostala nekaj sekund v raztopini z nizko koncentracijo soli, bi se začela topiti, oba konca prekinjene vijačnice pa bi se odvila od osi molekule. To bi pomenilo prisotnost ss segmentov v



Slika 7: (a) Meritev razteznostnega cikla molekule DNA. Najprej so molekulo raztegnili, nato pa silo popustili. Pojavi se histereza, za katero predlagajo model na sliki (b). Najprej je molekula v B-stanju (stanje dvojne vijačnice), ki pa ima en defekt (ena veriga je prekinjena). Ko raztegujejo molekulo, naj bi se dvojna vijačnica odvila in bi postala oblike podobne lestvi. Tu predlagajo dve možnosti: ena je paralelna lestev (B), druga pa da asimetrično zamaknjena lestev (B'). Če bi preraztegnjena molekula ostala nekaj sekund v raztopini z nizko koncentracijo soli, bi se začela topiti, oba konca prekinjene vijačnice pa bi se odvila od osi molekule (C). Ko bi molekulo relaksirali, bi se oba dela prekinjene verige začela nazaj privijati k osi druge verige in bazni pari začeli rekombinirati (D). [11]

molekuli, kar pa bi lahko vplivalo na nižje sile pri enakem raztezku v povratnem delu razteznostnega cikla. V tem delu bi se ssDNA verigi nazaj združevali v dvojno verigo. To bi hitreje potekalo na konceh raztopljenega dela, kjer prekinjena veriga ni odvita od osi neprekinjene verige, saj se lahko v odvitih delih prekinjene verige pojavijo še kakšne sekundarne strukture, ki morajo še razpasti pred rekombinacijo ssDNA verig. Sledi le še zvijanje dvojne verige v B-DNA dvojno vijačnico.

Konsistentno s tem modelom 1 M Na⁺ raztopina skoraj izniči histerezo ne da bi spremenila silo ali samo prisotnost faznega prehoda. Če ta mehanizem drži, potem bi histereza morala izginiti če bi nekako lahko preprečili raztapljanje molekule DNA [11]. Da bi še preverili ta model so tako verigi (vijačnici) dsDNA povezali s 4.5', 8-trimetil psoralenom (en psoralen na ~ 20 bp). Kot vidimo na zgornji krivulji na sliki 8 prisotnost psoralena v 150 mM raztopini Na⁺ izniči histerezo.

Na sliki 8 je prav tako viden vpliv ionske moči na molekule. Spodnje krivulje kažejo padec sile faznega prehoda do ~ 45 pN v 0.6 mM Na⁺ raztopini. Pri nizkih ionskih močeh so za prehod dovolj majhne sile raztezanja, saj elektrostatski odboj med fosfati preferira daljše preraztegnjeno stanje. Kljub temu pa sila faznega prehoda molekule v 1 mM raztopini Mg^{2+} ostaja visoka (65 pN), kar je najbrž posledica kondenziranih divalentnih protionov, ki zmanjšajo efektivni naboj molekule DNA. [11] Za večino molekul 1 mM raztopina Mg^{2+} dovoli približno enako veliko histereze kot 150 mM raztopina Na⁺.

Histereza se ponovno pojavi tudi pri molekulah, kjer sta vijačnici povezani s psoralenom, če je le DNA v raztopini z dovolj nizko koncentracijo soli (modra krivulja na sliki 8, kjer je raztopina Na^+ 0.625 mM). To bi lahko pomenilo topljenje DNA brez odvijanja prekinjene verige od osi neprekinjene [11].

Fazni prehod se kot rečeno zgodi v zelo ozkem območju sil ($\sim 2 \text{ pN}$), kar kaže na zelo kooperativen proces. Kooperativnost pomeni, da so preraztegnjena območja znotraj molekule velika in homogena, in da se razširjajo oz. krčijo samo preko raztapljanja oz rekombiniranja baznih parov na robovih. Z drugimi besedami: energijsko je ugodneje razširiti že obstoječe območje raztopljene molekule DNA, kot pa ustvariti novo.



Slika 8: Raztezanje molekule dsDNA s psoralenom v 150mM NaCl raztopini (črna krivulja), 5mM (rdeča krivulja), 2.5 mM (zelena krivulja) in 0.625 mM (modra krivulja). Koncentracija raztopine očitno vpliva na izmerjeno odvisnost sila-raztezek. Predvsem nas tu zanima histereza. Ta izgine npr. za 150 mM NaCl (črna krivulja) in se zopet pojavi pri nizkih koncentracijah soli. [11]

7 Zaključek

V seminarju smo za začetek predstavili Kratky-Porod model (WLC), osnovo obravnave molekule DNA pri končnih temperaturah. Ta model daje dobro ujemanje enačbe stanja z izmerjeno za majhne zunanje sile. Predstavili smo meritve raztezanja molekule DNA še pri večjih silah, kjer so ugotovili, da pride do strukturnega prehoda iz B-DNA v raztegnjeno obliko S-DNA. Za to strukturo namigujejo na to, da naj bi bila raztopljena ali pa vsaj delno raztopljena DNA, saj se enačba stanja po strukturnem prehodu začne ujemati z enačbo stanja ssDNA. V seminarju smo se osredotočili predvsem na predstavitev dvonivojskega WLC modela za obravnavo tega strukturnega prehoda, ki daje dobre rezultate. Vključili smo še vpliv elektrostatske interakcije, ki prav tako dobro opiše raztegovanje molekule DNA v različnih koncentracijah raztopine. Za konec smo predstavili še izsledke raziskovalne skupine, ki je opazila pri relaksaciji predraztegnjene DNA histerezo. Pojasnili smo predlog njihovega mehanizma, ki prav tako vključuje topljenje DNA.

Predstavljene teorije dajejo dobra ujemanja z eksperimentalnimi podatki za raztezanje molekule DNA ne samo pri majhnih ali samo pri velikih silah, pač pa tudi v območju strukturnega prehoda. Jasno je, da se strukturni prehod zgodi in da je struktura, ki jo imenujejo S-DNA, nekako preraztegnjena DNA, ni pa še povsem jasno ali je predlagan mehanizem preraztegovanja in topljenja tisti pravi.

Literatura

- [1] R. Podgornik, Physics of DNA
- [2] S. Smith, L. Finzi, C. Bustamante, Science 258, 1122 (1992),
- [3] C. Bustamante, J. F. Marko, E. D. Siggia, S. Smith, Science 265, 1599 (1994),
- [4] O. Punkkinen, P. L. Hansen, L. Miao in I. Vattulainen, Biophysical Journal 89, 967 (2005),
- [5] J. R. Wenner, M. C. Williams, I. Rouzina, V. A. Bloomfield, Biophysical Journal 82, 3160 (2002),
- [6] R. Podgornik, P. L. Hansen in V. A. Parsegian, J. Chem. Phys. 113, 9343 (2000),
- [7] P. Cluzel, A. Lebrun, C. Heller, R. Lavery, J-L. Viovy, D. Chatenay in F. Caron, Science 271, 792 (1996),
- [8] A. Ahsan, J. Rudnick and R. Bruinsma, Biophysical Journal, 74, 132 (1998),
- [9] http:en.wikipedia.orgwikiNucleic_acid_thermodynamics (2.8.2012),
- [10] H. Clausen-Schaumann, M. Rief, C. Tolksdorf, H. E. Gaub, Biophysical Journal 78, 1997 (2000),
- [11] S. Smith, Y. Cui, C. Bustamante, Science 271, 795 (1996).
- [12] M. C. Williams, Optical Tweezers: Measuring Piconewton Forces, Northeastern University.