

**Medida da Elasticidade Entrópica  
de Uma Molécula de DNA**

*José Coelho Neto*

# Medida da Elasticidade Entrópica de Uma Molécula de DNA

José Coelho Neto

Orientador: Prof. Oscar Nassif de Mesquita

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Física.

Belo Horizonte

Março de 2001

Dedicado aos meus pais,  
José Coelho e Maria Antônia,  
à Juliana,  
Renata e Alisson.

# Agradecimentos

É sempre muito bom quando vemos que atingimos alguns dos objetivos que desejamos na vida. Nestes momentos únicos muitas vezes somos pegos relembrando passagens de nossas vidas, nossas vitórias, nossos fracassos e as pessoas que estiveram ao nosso lado em todos esses momentos. É o fim de um processo e o início de outro, mais uma peça colocada no quebra-cabeças que é a vida de cada um de nós.

Agradeço

Aos meus pais, que sempre me apoiaram e incentivaram na busca dos meus próprios caminhos, assim como continuam fazendo até hoje...

À Juliana, que ainda continua me aguentando, apesar dos meus pequenos grandes defeitos...

Ao Oscar, por ter me acolhido no Laboratório de Física Estatística Experimental e ter me orientado nesta incursão pela biofísica molecular...

Aos amigos, companheiros no laboratório, Bira, Nathan, Rodrigo, Aline e Costelinha, por toda ajuda, colaboração e todo papo furado também...

Ao pessoal do ICB, principalmente à professora Glória Franco e ao professor Miguel Ortega, sem os quais a realização deste trabalho teria sido muito mais difícil.

Aos professores, funcionários, colegas e amigos do DF, pelos conselhos e sugestões, pelos papos na cantina ou no café, por todo o apoio e incentivo que ajudaram na realização deste trabalho.

Ao CNPq, pela concessão de bolsa, à FAPEMIG e ao FINEP-PRONEX, pelo financiamento do laboratório.

# Resumo

Neste trabalho combinamos as técnicas de pinçamento óptico e de vídeomicroscopia para estudar o comportamento elástico entrópico de moléculas de DNA de *fagos*  $\lambda$ . O método empregado permite a realização de experimentos com uma única molécula por vez. Cada molécula de DNA é presa por uma extremidade a uma microesfera de poliestireno de  $3\mu m$  de diâmetro e pela outra a uma lamínula de vidro, formando um análogo microscópico de um sistema massa–mola superamortecido, o qual podemos estirar usando a pinça óptica. Quando a pinça óptica é desligada, o movimento de recuo do DNA pode ser acompanhado através do recuo da microesfera presa a uma de suas extremidades. O movimento da microesfera é gravado em vídeo e as imagens são digitalizadas para análise posterior. A força de recuo que o DNA estirado exerce sobre a microesfera é descrita pelo modelo *wormlike chain* (WLC) para polímeros flexíveis. *Comprimentos de persistência* para moléculas de DNA puro e para complexos de DNA + brometo de etídio são obtidos.

# Abstract

In this work we combine optical tweezer and videomicroscopy techniques to obtain the entropic elastic behavior of single  $\lambda$  *phage* DNA molecules. By tethering a single DNA molecule by one end to a  $3\mu\text{m}$  poliestirene bead and by the other end to a microslide, we build a microscopic analog of an overdamped mass–spring system, that can be stretched using the optical tweezer. When the tweezer is turned off, the DNA recoil can be followed through the recoil of the tethered bead. The motion of the bead is videorecorded and the images are digitized for posterior analysis. The force that the stretched DNA exerts on the bead is well described by the wormlike chain (WLC) model for flexible polymers. *Persistence lengths* for single pure DNA molecules and for DNA + ethidium bromide complexes are obtained.

# Conteúdo

<b>1</b>	<b>Introdução</b>	<b>1</b>
1.1	Motivação . . . . .	1
1.2	Descrição do Trabalho . . . . .	3
<b>2</b>	<b>A Estrutura da Molécula de DNA</b>	<b>4</b>
2.1	Breve Histórico . . . . .	4
2.2	Composição e Estrutura Básica dos Ácidos Nucléicos . . . . .	6
2.3	A dupla hélice de DNA: O modelo de Watson e Crick . . . . .	11
<b>3</b>	<b>O DNA como um Polímero</b>	<b>16</b>
3.1	Moléculas Poliméricas . . . . .	16
3.2	Origem da Elasticidade Entrópica: O Efeito da Flexibilidade e a Maximização da Entropia . . . . .	18
3.3	O Modelo <i>WormLike Chain</i> (WLC) . . . . .	21
3.4	A Força Entrópica de Recuo . . . . .	22
3.4.1	Estiramentos Próximos da Conformação de Equilíbrio . . . . .	23
3.4.2	Estiramentos Longe da Conformação de Equilíbrio . . . . .	24
3.4.3	Estiramentos Próximos e Longe da Conformação de Equilíbrio . . . . .	25
<b>4</b>	<b>Observação da Força Entrópica de Recuo do DNA</b>	<b>27</b>
4.1	Requisitos Experimentais . . . . .	27
4.2	A Técnica Experimental . . . . .	28
4.3	Preparação das Amostras . . . . .	29

4.3.1	Limpeza e Preparação das Lâminas . . . . .	29
4.3.2	Preparação da Solução de DNA . . . . .	29
4.3.3	Finalização da Amostra . . . . .	30
4.4	Localização, Estiramento e Filmagem do Recuo do DNA . . .	33
4.4.1	A Montagem Experimental . . . . .	33
4.4.2	A Pinça Óptica . . . . .	33
4.4.3	O Sistema de Vídeomicroscopia . . . . .	37
4.5	Extração das Curvas de Recuo . . . . .	38
4.5.1	O Método de Análise de Imagens . . . . .	38
<b>5</b>	<b>O Modelo para o Ajuste dos Dados</b>	<b>40</b>
5.1	A Equação do Movimento de Recuo . . . . .	40
5.2	Polímeros Ideais <i>versus</i> Polímeros Reais . . . . .	41
5.3	O Efeito da Proximidade da Superfície Sobre o Coeficiente de Difusão D . . . . .	45
5.4	Correções para Altura $h > 0$ . . . . .	46
5.5	Parâmetros Ajustados . . . . .	48
<b>6</b>	<b>Resultados</b>	<b>49</b>
6.1	DNA Puro . . . . .	49
6.2	DNA + Brometo de Etídio . . . . .	50
<b>7</b>	<b>Conclusão</b>	<b>53</b>
<b>A</b>	<b>Cálculo Explícito de F para o Modelo FJC</b>	<b>54</b>
<b>B</b>	<b>Cálculo de <math>\langle R^2 \rangle</math> na Configuração de Equilíbrio</b>	<b>56</b>
<b>C</b>	<b>Cálculo do Valor Médio de <math> \vec{u}_\perp ^2</math></b>	<b>57</b>



# Lista de Figuras

1.1	Duplicação de uma dupla hélice de DNA . . . . .	2
2.1	Estrutura básica de purinas e pirimidinas . . . . .	6
2.2	Bases nitrogenadas mais comuns nos ácidos nucleicos . . . . .	7
2.3	Açúcares presentes nos ácidos nucleicos . . . . .	8
2.4	Desoxiribonucleotídeos de Adenina e Citosina . . . . .	8
2.5	Fitas simples de DNA e RNA . . . . .	10
2.6	Dupla Hélice de DNA . . . . .	11
2.7	Emparelhamento das bases do DNA . . . . .	12
2.8	Formas mais comuns de DNA dupla hélice . . . . .	14
3.1	Tipos de Polímeros . . . . .	17
3.2	Monômeros diferentes, polímeros iguais . . . . .	18
3.3	Elasticidade entrópica de um polímero . . . . .	19
3.4	Comportamento da Força Entrópica de Recuo . . . . .	26
4.1	Analogia massa–mola $\iff$ microesfera–DNA . . . . .	29
4.2	Amostra preparada . . . . .	31
4.3	Microesferas em uma amostra pronta . . . . .	32
4.4	Montagem Experimental . . . . .	34
4.5	Princípio do Pinçamento Óptico . . . . .	35
4.6	Pinçamento de um sistema microesfera-DNA . . . . .	37
4.7	Tratamento das imagens de recuo . . . . .	38
4.8	Seqüência de imagens de uma microesfera em recuo . . . . .	39

5.1	Curva de recuo e sua derivada . . . . .	42
5.2	Curva de recuo suavizada e sua derivada . . . . .	43
5.3	Variação do coeficiente de difusão D com a altura . . . . .	46
5.4	Situação de um sistema microesfera-DNA imediatamente após o início do recuo . . . . .	47
6.1	Comparação DNA puro <i>versus</i> DNA + brometo de etídio . . .	52

# Lista de Tabelas

2.1	Parâmetros das formas A, B e Z de DNA . . . . .	14
2.2	Exemplos de cadeias haplóides completas de DNA . . . . .	15
4.1	Composição das PBS utilizadas na preparação de amostras . .	31
4.2	Exemplos de soluções testadas na preparação de amostras . . .	32
6.1	Comprimentos de persistência obtidos para DNA puro . . . .	49
6.2	Comprimentos de persistência obtidos para complexos de DNA + brometo de etídio . . . . .	51

# Capítulo 1

## Introdução

### 1.1 Motivação

Durante o decorrer do século XX, as ciências físicas vivenciaram um período de mudança e revolução que modificaram nossa visão do Universo de uma maneira até então impensável. Ainda assim, embora novas descobertas e progressos continuem sendo feitos, como parte essencial no contínuo e infindável processo natural de desenvolvimento do conhecimento humano, não é difícil perceber que grande parte do progresso feito nas ciências físicas durante todo o século XX é essencialmente consequência do refinamento e expansão das novas idéias, conceitos e descobertas que tomaram forma no período que vai de 1900 até a década de 1930. Durante este período, que se inicia com o advento das idéias da velha teoria quântica e da relatividade, e que termina com o estabelecimento da forma básica geral da quântica moderna, houve o início do processo de mudança de ponto de vista que nos permitiu interpretar o Universo da maneira como fazemos hoje.

Por outro lado, se o século XX hoje é tido por muitos como “o século das ciências físicas”, acredita-se que o século XXI, no qual acabamos de entrar, será “o século das ciências biológicas”, o que a maior parte das pessoas, mesmo fora do meio acadêmico, não deve ter dificuldades em acreditar. *Projeto Genoma, Clonagem, Alimentos Transgênicos*, entre muitas outras coisas, são

produtos de um processo que vem se desenvolvendo nas ciências biológicas ao longo das últimas décadas. De fato, as recentes mudanças e inovações introduzidas no ramo da biologia podem ser interpretadas como parte de um processo semelhante àquele visto nas ciências físicas no início do século XX.

Este processo teve início ainda no século XX, quando, em meados da década de 1930, a *Biologia Molecular* começou a se estabelecer como a melhor maneira de esboçar a natureza da vida e dos processos biológicos. Desempenhando um papel essencial no desenvolvimento desta primeira fase da revolução biológica, finda por volta de 1970, esteve sempre, como ainda continua até hoje, a molécula de Ácido Desoxiribonucléico (DNA), cuja estrutura foi determinada em 1953 pelo biólogo James Watson e pelo físico Francis Crick.

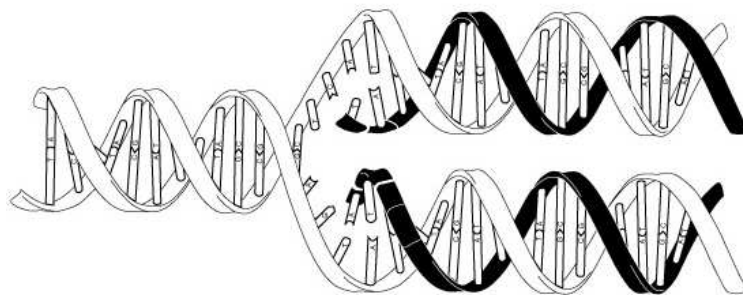


Figura 1.1: Duplicação de uma dupla hélice de DNA: A dupla hélice original (em branco) se separa em duas fitas simples. Uma nova fita simples (em preto) começa a se formar a partir de cada fita simples original. No fim do processo, teremos duas novas duplas hélices idênticas à original.

Embora venha sendo estudada exaustivamente há mais de 50 anos, ainda há aspectos na molécula de DNA que não são bem compreendidos, como a existência de *éxons* e *íntrons*, os mecanismos da especificidade das interações DNA-proteínas e a dinâmica de processos como as transições de forma, desnaturação e renaturação.

Fundamentada em todos estes aspectos, nossa motivação no estudo da molécula de DNA conta ainda com o fato de, através da técnica experimental

usada nesta dissertação, sermos capazes de realizar experimentos utilizando apenas uma única molécula por vez, eliminando os efeitos das interações intermoleculares e a necessidade de se fazer médias estatísticas sobre muitas moléculas para se analisar os resultados.

## 1.2 Descrição do Trabalho

Nosso experimento consiste na observação e ajuste, segundo um modelo físico dinâmico, do comportamento elástico entrópico de moléculas de DNA. Por se tratar de uma molécula bastante flexível, o estado de equilíbrio de uma cadeia de DNA em solução não é retilíneo, mas sim enovelado. O processo experimental consiste em estirar uma molécula de DNA, deixando-a em uma conformação retilínea, portanto, fora do equilíbrio, e então observar seu retorno à conformação enovelada de equilíbrio termodinâmico com o meio. A partir deste movimento de recuo, ajustado através de um modelo teórico, somos capazes de obter informação sobre a elasticidade entrópica das moléculas de DNA.

No capítulo 2, descrevemos sucintamente a estrutura e composição dos ácidos nucleicos, especialmente o DNA.

No capítulo 3, apresentamos o modelo teórico, baseado na física de polímeros, que descreve a força entrópica que tende a manter a molécula de DNA em sua conformação enovelada de equilíbrio com o meio à sua volta.

No capítulo 4, descrevemos os requisitos experimentais, a técnica de preparação das amostras, a montagem experimental, o sistema de coleta e análise de dados e todos os demais detalhes da realização do experimento.

No capítulo 5, mostramos como os dados experimentais são ajustados ao modelo teórico do capítulo 2.

Nossos resultados e conclusões são apresentados e discutidos nos capítulos 6 e 7.

# Capítulo 2

## A Estrutura da Molécula de DNA

### 2.1 Breve Histórico\*

Os ácidos nucléicos foram descobertos em 1869 pelo médico Friedrich Miescher, enquanto fazia estudos sobre a composição dos *leucócitos* (glóbulos brancos) presentes no pus. A nova substância, atribuída por Miescher ao núcleo das células, recebeu o nome de *nucleína* e, embora seu caráter ácido fosse conhecido desde sua descoberta, o termo *ácido nucléico* somente foi introduzido em 1889 pelo bioquímico Richard Altmann.

Durante os anos seguintes à sua descoberta, a *nucleína* esteve diretamente associada aos processos hereditários, uma vez que experimentos a apontavam como principal elemento constituinte dos cromossomos. De fato, durante o período que vai de 1880 a 1900, a hipótese de que a *nucleína* era a substância responsável pela transmissão das características hereditárias era sustentada por uma série de biólogos. Esta hipótese, entretanto, foi abandonada com o surgimento de experimentos que demonstravam haver, aparentemente, grande instabilidade na quantidade de *nucleína* presente no núcleo celular durante

---

\*Maiores detalhes sobre descoberta e evolução do conhecimento sobre os ácidos nucléicos podem ser encontrados em [1] e [2].

os diversos estágios de vida de uma célula. Em alguns casos, a quantidade de *nucleína* presente no núcleo celular de certos tipos de células parecia ser nula.

Por volta de 1900, a redescoberta do trabalho de Mendel, associada ao conhecimento acumulado sobre os cromossomos, abriu novos caminhos no estudo da hereditariedade. O termo *gene* foi introduzido por volta de 1909, originalmente como forma de identificar cada fator presente no óvulo e no espermatozóide que determinavam as características dos descendentes. Entretanto, até aquele momento nenhuma idéia sobre sua natureza era suficientemente bem fundamentada.

Com o abandono da hipótese da *nucleína*, a composição dos genes passou a ser atribuída a outro tipo de substância presente no núcleo celular e cuja diversidade e propriedades autocatalíticas aparentemente se adequavam aos requisitos. No início da década de 1940, a idéia de que os genes eram constituídos de proteína era largamente aceita.

O retorno à hipótese dos ácidos nucléicos foi marcado pela publicação, em 1944, do trabalho de Avery *et al.* [3], baseado nos experimentos de Griffith [4], de 1928. O trabalho de Avery demonstrava que a virulência de um tipo de bactéria era transmitida para outro tipo, inicialmente inofensivo, quando este entrava em contato com o DNA do tipo virulento. Sistemáticamente, outros experimentos, como o de Hershey-Chase [5], passaram a confirmar a idéia de que o material genético das células era realmente DNA.

A partir de então, questões sobre a maneira específica com que a informação genética era armazenada, sua capacidade de autoduplicação, sua tradução em proteínas e até mesmo sua susceptibilidade a mutações passaram a demandar a determinação de um modelo estrutural compatível para o DNA, que veio na forma da dupla hélice de Watson e Crick [6] de 1953. O modelo de Watson e Crick, cujas implicações [7] moldaram a genética molecular moderna, deu a eles o Prêmio Nobel de Medicina em 1962 e continua vigente até o momento.



## 2.2 Composição e Estrutura Básica dos Ácidos Nucléicos

Os ácidos nucleicos são compostos orgânicos ricos em nitrogênio e fósforo. O nitrogênio está concentrado em 2 tipos de bases orgânicas: as pirimidinas e as purinas. As purinas são moléculas cuja estrutura básica consiste em dois anéis orgânicos (um hexágono e um pentágono) que compartilham dois átomos de carbono. Já as pirimidinas são formadas apenas por um anel hexagonal (*figura 2.1*).

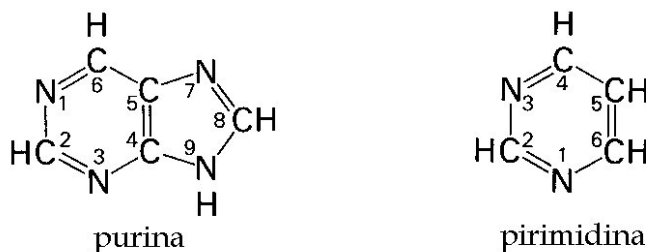


Figura 2.1: Estrutura básica de purinas e pirimidinas

Embora existam diversos tipos de purinas e pirimidinas, os ácidos nucleicos contêm principalmente cinco tipos, sendo três pirimidinas e duas purinas. As purinas são *adenina* e *guanina*. As pirimidinas são *citocina*, *timina* e *uracila* (*figura 2.2*).

O fósforo contido nos ácidos nucleicos fica em forma de íons de fosfato ( $PO_4^-$ ), sendo esta a origem de sua carga negativa. Cada íon de fosfato é conectado a uma única base nitrogenada através de um açúcar. Este açúcar, que é uma pentose, pode ser uma ribose ou uma desoxiribose. Se o açúcar em questão for uma ribose, temos o ácido ribonucleico (RNA). Se for uma desoxiribose, temos o ácido desoxiribonucleico (DNA). A diferença entre a ribose e a desoxiribose é que a última possui um oxigênio a menos, perdido pelo carbono 2 do seu anel (*figura 2.3*). Além da diferença no açúcar, RNA e DNA diferem também nas bases presentes em sua constituição. Na estrutura do DNA estão presentes estritamente duas purinas, *adenina* e *guanina*, e

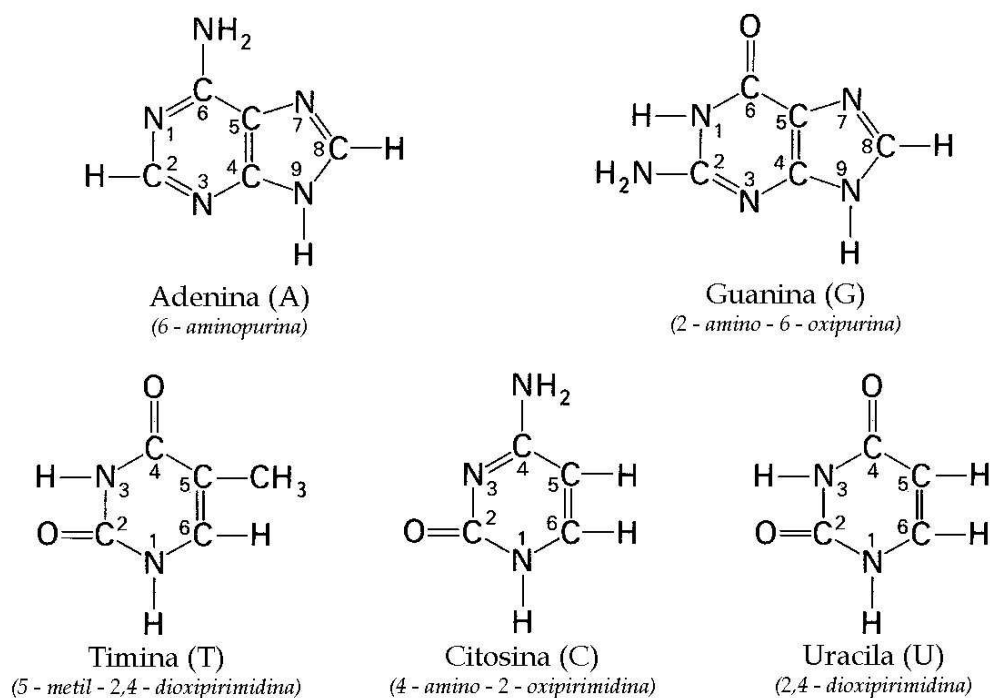


Figura 2.2: Bases nitrogenadas mais comuns nos ácidos nucleicos

duas pirimidinas, *citossina* e *timina*. Já o RNA emprega *uracila* no lugar da *timina*, além de conter, ocasionalmente, outros tipos de base além dos cinco tipos principais <sup>†</sup>.

Cada bloco *fosfato-açúcar-base* recebe o nome de *nucleotídeo*<sup>‡</sup>. Em cada nucleotídeo, o fosfato se liga ao carbono C5' do açúcar, que se conecta à base nitrogenada sempre no carbono C1'. Se a base for uma purina, ela estará conectada ao açúcar pelo nitrogênio N9. Se for uma pirimidina, pelo

<sup>†</sup>Embora o RNA *messenger* e o RNA *ribossomal* contenham apenas *adenina*, *guanina*, *citossina* e *uracila*, outros tipos de RNA presentes na célula, como o RNA *transportador*, contêm outras bases nitrogenadas de estrutura semelhante [8].

<sup>‡</sup>Embora a presença de bases nitrogenadas e de fosfato na composição dos ácidos nucleicos fosse conhecida desde o final do século XIX, a descoberta da presença dos 2 açúcares, ribose e desoxiribose, bem como da existência dos nucleotídeos, se deveu em grande parte ao trabalho de Levene [9], também responsável pelo primeiro modelo estrutural dos ácidos nucleicos e pela introdução das denominações ácido ribonucleico e ácido desoxiribonucleico.

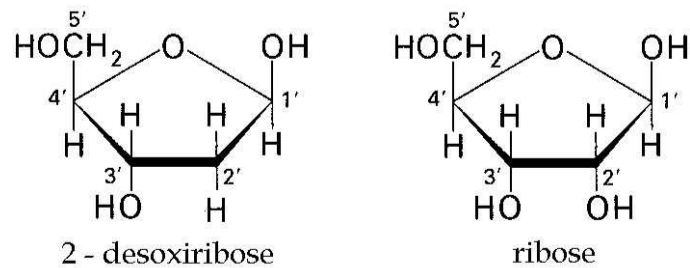


Figura 2.3: Açúcares presentes nos ácidos nucleicos: desoxiribose (DNA) e ribose (RNA)

nitrogênio N1 (*figura 2.4*).

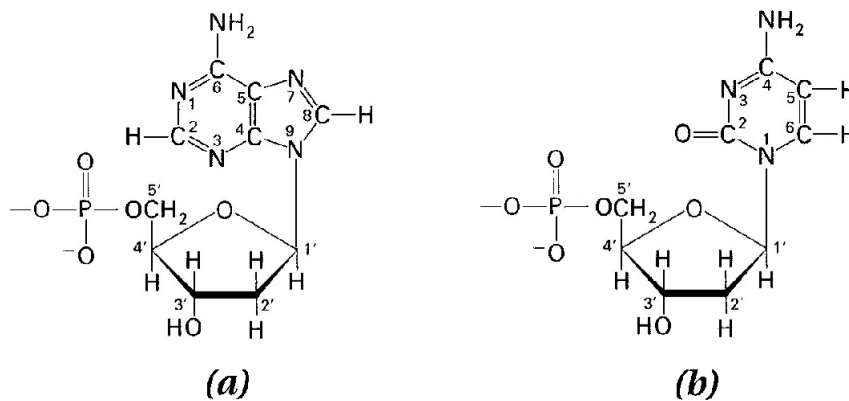


Figura 2.4: Desoxiribonucleotídeos de Adenina (a) e Citosina (b)

As moléculas dos ácidos nucleicos são formadas pela polimerização<sup>§</sup> dos nucleotídeos, dando origem a longas fitas (*figura 2.5*). Em uma fita de ácido nucleico, cada fosfato de um nucleotídeo se conecta ao açúcar do nucleotídeo anterior pelo carbono C3'. Como, em cada nucleotídeo isolado, o fosfato

<sup>§</sup>Antes do processo de polimerização, catalizado por enzimas denominadas genericamente de *polimerases*, cada nucleotídeo contém 3 grupos fosfato, conectados entre si. Tais nucleotídeos *trifosfato* são as unidades precursoras no processo de síntese dos ácidos nucleicos, sendo a quebra de uma das ligações entre os grupos fosfato, formando nucleotídeos monofosfato (*figura 2.4*), o fator responsável por prover a energia necessária ao processo de polimerização [8].

se encontra ligado do carbono C5' do açúcar, as fitas de ácido nucléico são polimerizadas sempre no sentido  $5' \rightarrow 3'$ , isto é, do carbono C5' para o carbono C3' do açúcar. Coincidentemente, por convenção, a sequência de bases em cada fita é sempre escrita partindo da extremidade C5' e terminando na extremidade C3'. Assim, uma fita de ácido nucléico sempre começa pela extremidade que possui o grupo C5'-OH livre, terminando na extremidade que possui o grupo C3'-OH livre. A sequência de ligações *açúcar-fosfato-açúcar-fosfato-açúcar* serve de sustentação para as bases, que não participam das ligações que formam a cadeia polimérica, permanecendo independentes entre si. Desta forma, a sequência de bases em uma fita pode ser qualquer, sendo responsável pela armazenagem e transporte da informação genética. Como consequência, eventos como a ocorrência das mutações podem ser justificados como sendo decorrentes de uma alteração na sequência das bases [7].

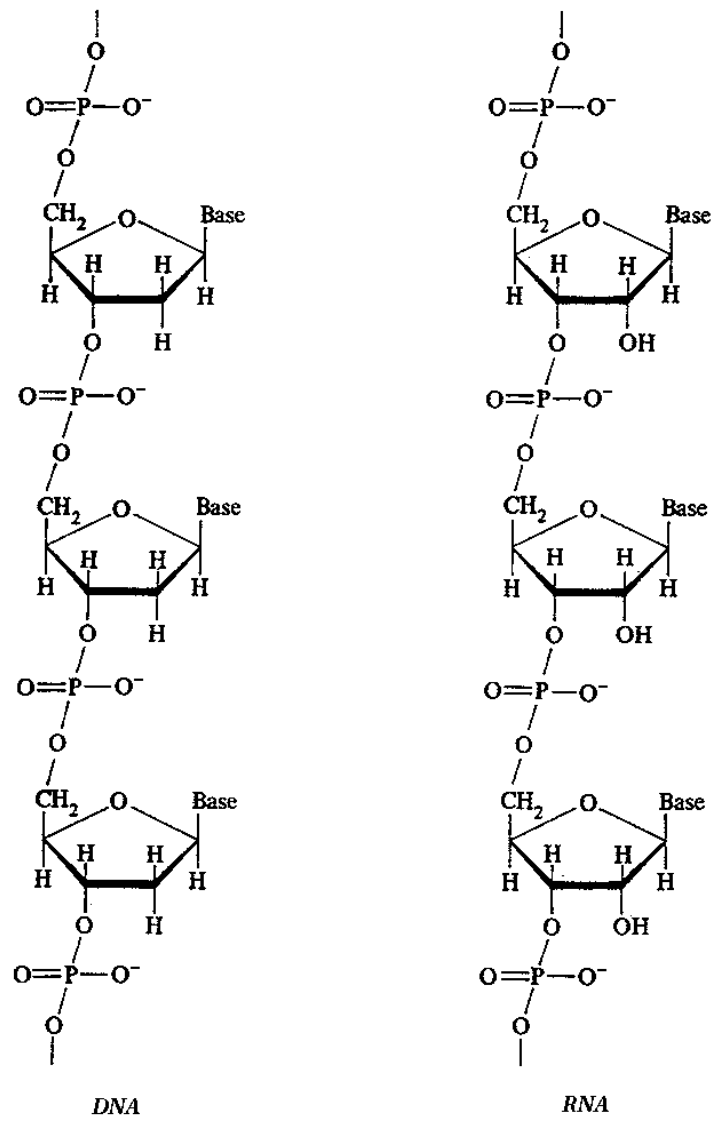


Figura 2.5: Fitas simples de DNA e RNA

## 2.3 A dupla hélice de DNA: O modelo de Watson e Crick

O *locus* da informação genética deve ter uma estrutura capaz de atender a três requisitos básicos:

- Capacidade de autoreplicação.
- Capacidade de codificar a ordem dos aminoácidos em uma proteína.
- Ser susceptível à mutações.

A estrutura proposta por Watson e Crick em 1953 [6] para o ácido desoxirribonucléico, desenvolvida a partir do método de construção de modelos tridimensionais reais em escala, baseado nas informações obtidas através de difração de raios X, além de ser capaz de se ajustar aos dados experimentais, foi a primeira capaz de atender a estes três requisitos básicos [7].

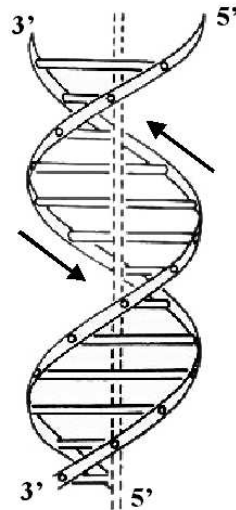


Figura 2.6: Dupla Hélice de DNA

No modelo de Watson e Crick, o DNA é formado por duas fitas poliméricas que se entrelaçam formando uma hélice (*figura 2.6*). As fitas correm em

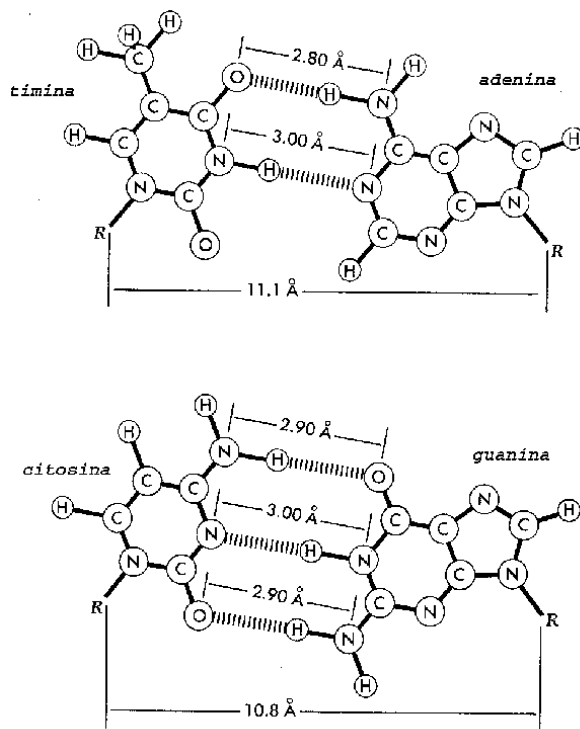


Figura 2.7: Emparelhamento das bases do DNA

sentidos opostos, o que dá à estrutura a simetria monoclínica observada nos padrões de difração.

As bases ficam confinadas ao interior da hélice, sendo que cada uma delas forma ligações de hidrogênio com uma das bases da outra fita, na posição correspondente. A formação das ligações de hidrogênio ocorre sempre entre uma purina e uma pirimidina. Entretanto, somente pares específicos são permitidos, de forma que uma *adenina* somente forma ligações de hidrogênio com uma *timina*, enquanto uma *guanina* somente forma tais ligações com uma *citosina*. Isto ocorre basicamente por duas razões simples. A primeira delas, que diz respeito à formação de pares *purina-pirimidina*, é que, de acordo com os padrões de difração de raios X, o diâmetro da dupla hélice é constante. Como purinas e pirimidinas tem tamanhos muito diferentes, pares *purina-purina* e *pirimidina-pirimidina* teriam diâmetros muito diferentes, o que faria

com que o diâmetro da dupla hélice variasse ao longo da sequência de bases. Já os pares *purina-pirimidina* têm o diâmetro praticamente idêntico, sendo, por exclusão, o único tipo de par possível. A segunda razão, que restringe os pares *purina-pirimidina* para A–T e G–C, é que cada base está presente praticamente somente em sua forma tautomérica mais comum (*cetona*). Tal restrição nas conformações das bases acaba por permitir a formação de ligações de hidrogênio somente da forma adenina–timina e guanina–citosina\* (*figura 2.7*). Este emparelhamento específico faz com que as duas fitas sejam sempre complementares uma à outra, permitindo que cada uma sirva de molde para reprodução da outra, viabilizando a autoreplicação.

O acesso às bases no interior da hélice, e, conseqüentemente, o acesso à informação genética, é feito através das brechas existentes entre os dois esqueletos de açúcar–fosfato das fitas, referidas como *ranhuras*<sup>†</sup>. O entrelaçamento entre as fitas ocorre de tal forma que a brecha entre seus esqueletos seja maior de um lado e menor do outro. Assim, as duas ranhuras que percorrem a dupla hélice, permitindo o acesso às bases no interior da estrutura, recebem o nome de ranhura maior e ranhura menor, de acordo com o espaçamento entre os esqueletos das fitas.

Modernamente, sabe-se que existem outras formas de DNA dupla hélice [8]. Entretanto, a forma mais comum nos organismos vivos é a que corresponde ao modelo original de Watson e Crick, conhecida como B-DNA. As outras formas mais comuns são o A-DNA, que é uma forma mais compacta e desidratada de B-DNA, e o Z-DNA, que tem o sentido de rotação da hélice invertido (*figura 2.8*).

Outra característica importante da molécula de DNA é sua flexibilidade. A fim de ser capaz de codificar a enorme quantidade de informação necessária à “construção” de um ser vivo, utilizando apenas um alfabeto de 4 letras, o

---

\*Mesmo antes da publicação do modelo de Watson e Crick, o trabalho de Chargaff *et al* [10] já apontava claramente que as bases presentes na constituição do DNA de várias espécies estavam sempre na proporção de 1:1 para A–T e 1:1 para G–C, independentemente, o que não acontecia com o RNA.

<sup>†</sup>Também chamadas de *sulcos*.



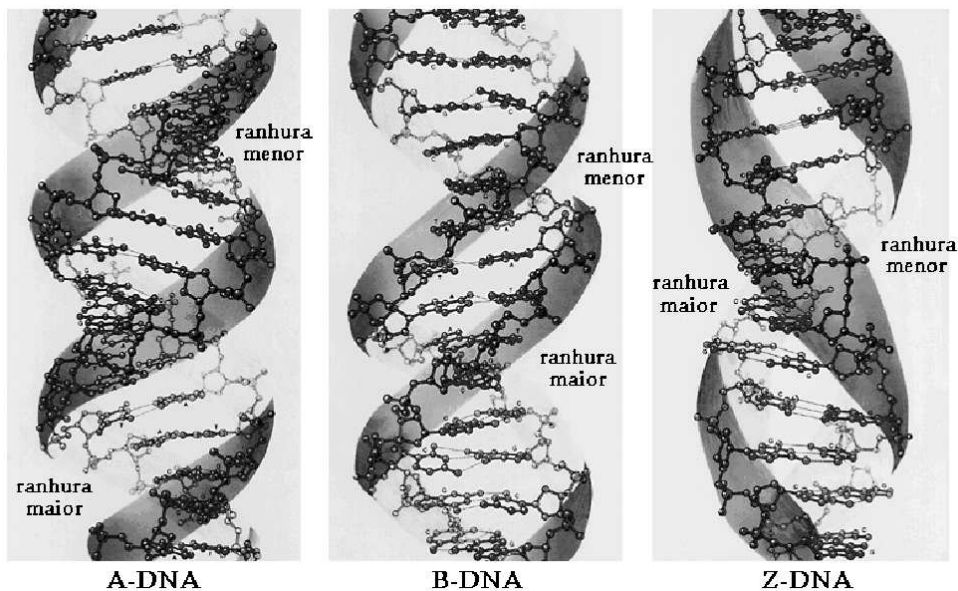


Figura 2.8: Formas mais comuns de DNA dupla hélice

Forma	A-DNA	B-DNA	Z-DNA
Distância entre os pb (pares de bases)	2.3Å	3.4Å	3.8Å
Diâmetro da hélice	25.5Å	23.7Å	18.4Å
Sentido de rotação	anti horário	anti horário	horário
Nº de pb por volta	11	10.4	12
Passo da hélice	25.3Å	35.4Å	45.6Å
Ângulo dos pb em relação à normal do eixo	19°	1°	9°
Ranhura maior	estreita e muito profunda	bem larga e bem profunda	chata
Ranhura menor	muito larga, rasa	estreita e bem profunda	muito estreita, profunda

Tabela 2.1: Parâmetros das formas A, B e Z de DNA

tamanho de uma cadeia linear de DNA chega a ser muitas milhares de vezes maior do que o tamanho da célula que a comporta. No caso humano, se todos os 46 cromossomos fossem conectados a fim de formar uma única cadeia de DNA, seu tamanho total seria de aproximadamente 2.3 metros. Assim sendo, a fim de caber dentro do núcleo celular, cujas dimensões são da ordem de  $1\mu m$ , a molécula de DNA é capaz de compactar-se, enovelando-se em torno de proteínas especiais, chamadas de *histonas*, formando as estruturas que conhecemos como cromossomos. Mesmo nos organismos mais simples, cujo código genético é significativamente menor, o DNA também deve ser capaz de assumir uma forma compacta, a fim de não ultrapassar o tamanho da célula. Alguns exemplos das dimensões lineares do DNA completo de alguns organismos vivos podem ser vistos na *tabela 2.2*.

<b>Organismo</b>	<b>Nº de pb (x 1000)</b>	<b>Comprimento (<math>\mu m</math>)</b>
SV40 (vírus)	5,1	1,7
<b>Fago <math>\lambda^{\ddagger}</math>(vírus)</b>	<b>48,5</b>	<b>16,5</b>
Fago T2 (vírus)	166	56
E. coli (bactéria)	4.639	1.577
Drosophila (inseto)	180.000	61.200
Homem (mamífero)	3.400.000	1.156.000
P. caudatum (protozoário)	8.600.000	2.924.000
Lírio (planta)	90.000.000	30.060.000

Tabela 2.2: Exemplos de cadeias haplóides completas de DNA

<sup>‡</sup>DNA utilizado nos experimentos.

# Capítulo 3

## O DNA como um Polímero

### 3.1 Moléculas Poliméricas

Moléculas poliméricas, ou simplesmente macromoléculas, são formadas quando as condições necessárias à adição de mais uma unidade (*monômero*) a uma cadeia é praticamente independente do tamanho atual da mesma. Por exemplo, as condições necessárias para sintetizar um composto  $[A] - [A]$  a partir de  $[A]$  podem ser muito diferentes das necessárias para transformar  $[A] - [A]$  em  $[A] - [A] - [A]$ . Se, entretanto, partimos de um composto  $[A]_n$  ( $[A] - [A] - [A] - \dots [A]_n$ ), as condições necessárias para ativar o processo  $[A]_n \rightarrow [A]_{n+1}$  podem ser praticamente idênticas às necessárias para ativar o processo  $[A]_{n+1} \rightarrow [A]_{n+2}$  e assim por diante. Neste caso, o processo de adição de monômeros pode continuar indefinidamente, dando origem a cadeias enormes que chamamos de polímeros.

Os polímeros podem ser classificados em dois tipos básicos: os extremamente flexíveis e os extremamente rígidos (*figura 3.1*). Naturalmente, a maioria dos casos são formas intermediárias, não sendo nem completamente flexíveis nem completamente rígidas.

Embora, a princípio, o tratamento de tais estruturas pareça ser complicado, isto não é inteiramente verdade. Como os polímeros são moléculas muito grandes, seu comportamento macroscópico é governado principalmente por

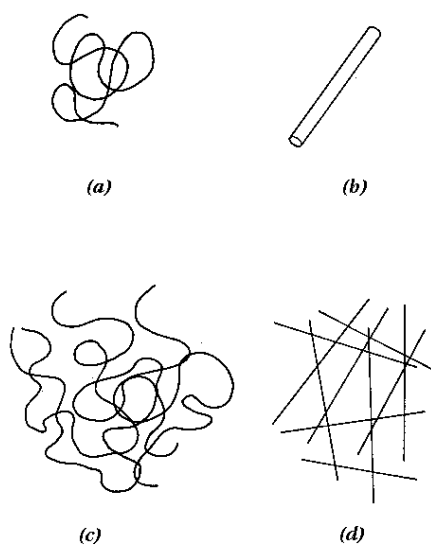


Figura 3.1: Tipos de polímeros: (a) flexível, (b) rígido, (c) e (d) suas soluções concentradas.

seus parâmetros de larga escala, como seu comprimento, independentemente do tipo de monômero. Por exemplo, suponhamos que temos duas soluções contendo monômeros de duas formas diferentes, como círculos e triângulos (*figura 3.2*). Como os monômeros estão separados, as propriedades de tais soluções, como a viscosidade, serão dependentes da forma de cada monômero, sendo, portanto, diferentes. Se, entretanto, os monômeros em cada solução forem polimerizados, formando uma molécula grande, a viscosidade das duas soluções diferirá por um valor da ordem de  $\frac{1}{\sqrt{N}}$ , onde  $N$  é o número de monômeros da cadeia [11].

Conforme exposto no capítulo 2, o DNA possui uma estrutura polimérica, onde a unidade monomérica é o nucleotídeo, ou mesmo cada par deles, no caso das hélices duplas. Desta maneira, uma vez que, no que diz respeito ao comportamento macroscópico de um polímero, o tipo de unidade monomérica tem pouca influência, podemos aplicar à molécula de DNA os mesmos princípios utilizados no estudo da dinâmica de polímeros, que é exatamente o que faremos daqui por diante.

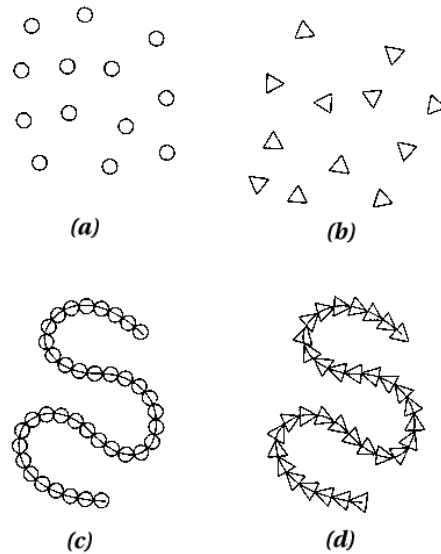


Figura 3.2: (a) monômeros circulares, (b) monômeros triangulares, (c) e (d) suas formas polimerizadas.

### 3.2 Origem da Elasticidade Entrópica: O Efeito da Flexibilidade e a Maximização da Entropia

Um polímero flexível, mas com um comprimento de contorno fixo e bem definido, como no caso de uma molécula de DNA, e que possui, inicialmente, uma forma retilínea, irá dobrar-se sobre si mesmo até atingir um estado que esteja em equilíbrio termodinâmico com o meio em que esteja imerso. Isto acontece devido aos choques com as partículas constituintes do meio que a molécula inicialmente experimenta ao longo de todo o seu comprimento. Devido à sua flexibilidade, flutuações na intensidade dos choques sofridos em uma dada direção fazem com que a porção atingida da molécula se mova, saindo da conformação retilínea original e expandindo-se nas demais dimensões disponíveis. Como o comprimento de contorno da molécula é fixo e bem definido, a movimentação dos segmentos internos faz com que suas extremidades se aproximem uma da outra. O processo continua até que a

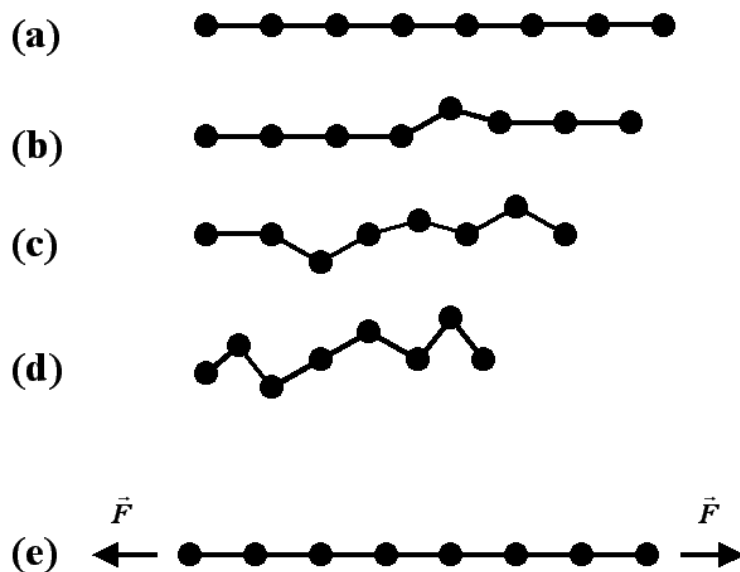


Figura 3.3: Elasticidade entrópica de um polímero: (a) - Molécula inicialmente estirada. (b)–(c) - Molécula sofrendo os efeitos dos choques com as partículas do meio em que está imersa. (d) - Molécula em uma conformação de equilíbrio. (e) - *Elasticidade Entrópica*: para manter a molécula estirada, é necessário aplicar uma força  $\vec{F}$  às suas extremidades.

molécula tenha atingido uma conformação tal que os choques não mais sejam capazes de alterar a posição média de suas extremidades, caracterizando o estado de equilíbrio. Para que as extremidades da molécula em questão sejam afastadas novamente, será necessária a aplicação de uma força  $\vec{F}$ , capaz de compensar o efeito dos choques com as partículas do meio (*figura 3.3*).

Efetivamente, como o que nos interessa verdadeiramente é estudar as características do polímero em si, o efeito dos choques com as partículas do meio, que depende não somente das características termodinâmicas do mesmo, mas principalmente da flexibilidade do polímero em questão, pode ser *embutido* na própria molécula, atribuindo-se à mesma certa *elasticidade entrópica*, cujo papel é o de manter a molécula em uma de suas conformações de equilíbrio, produzindo, para tal, uma força de recuo que atuará nas extremidades da mesma toda vez que a distância entre elas for maior do que a

permitida no conjunto das conformações de equilíbrio.

A origem entrópica do comportamento elástico da molécula polimérica fica mais evidente ao estudarmos sua entropia, dada por

$$S = k_b \ln \Omega, \quad (3.1)$$

onde  $\Omega$  representa o número de conformações acessíveis à molécula.

Quando a distância entre as extremidades da molécula é igual ao seu comprimento de contorno, ou seja, quando a molécula se encontra completamente estirada, só existe *uma única* conformação possível, que é aquela em que todos os segmentos da molécula se encontram sobre uma mesma linha reta. Neste caso,  $\Omega = 1$  e  $S = 0$ .

Quando a distância entre as extremidades da molécula é menor que seu comprimento de contorno, os segmentos internos podem se rearranjar em um certo número de conformações, que será tão maior quanto menor for a distância entre as extremidades da molécula. Neste caso, teremos  $\Omega \gg 1$  e o valor da entropia  $S$  irá crescer.

Como, pelo princípio da *entropia máxima*, um sistema atinge seu estado de equilíbrio somente quando a entropia  $S$  atinge seu valor máximo, para chegar ao estado de equilíbrio, a molécula irá maximizar o número de conformações possíveis para seus segmentos internos aproximando suas extremidades uma da outra.

A força entrópica de recuo que tende a aproximar as extremidades da molécula pode ser estimada a partir da energia livre do sistema

$$\mathcal{F} = -k_b T \ln Z, \quad (3.2)$$

onde  $Z$  representa a função de partição da energia da molécula.

No apêndice A exemplificamos como é possível estimar o valor da força entrópica de recuo  $F$  a partir da energia livre  $\mathcal{F}$ . Para tal, utilizamos o modelo FJC (*Freely Jointed Chain*) [11, 12, 13] discreto, no qual a molécula polimérica é formada por  $N$  segmentos de comprimento fixo  $b$  cujo ângulo de junção pode variar livremente entre  $-\pi$  e  $\pi$ .

### 3.3 O Modelo *WormLike Chain* (WLC)

Embora o modelo FJC descreva satisfatoriamente o comportamento elástico entrópico do DNA para conformações próximas ao estado de equilíbrio, o mesmo não é verdade para estiramentos maiores, longe do equilíbrio. Assim sendo, para descrever o comportamento elástico entrópico de uma molécula de DNA empregamos o modelo WLC [12, 13], que descreve satisfatoriamente o comportamento elástico entrópico do DNA tanto para estiramentos pequenos, próximos ao estado de equilíbrio, quanto para estiramentos grandes, próximos da conformação retilínea e, portanto, longe do equilíbrio.

No modelo WLC, uma molécula com comprimento de contorno fixo  $L$  e cuja conformação seja descrita por uma curva  $R(s)$ , com  $0 \leq s \leq L$ , tem sua energia dada por

$$E_{WLC} = \frac{k_b T}{2} \int_0^L A \left| \frac{\partial \hat{u}}{\partial s} \right|^2 ds - Fz, \quad (3.3)$$

onde  $\hat{u}(s)$  é um vetor unitário tangente à curva  $R(s)$

$$\hat{u}(s) = \frac{\partial R(s)}{\partial s}, \quad (3.4)$$

$F$  é a força necessária para manter a distância  $z$  entre as extremidades da molécula na conformação atual e  $A$  é o parâmetro definido como *comprimento de persistência*.

A função de partição da energia será então

$$Z = \int \exp \left[ -\frac{E_{WLC}}{k_b T} \right] d\hat{u} = \int \exp \left[ -\frac{1}{2} \int_0^L A \left| \frac{\partial \hat{u}}{\partial s} \right|^2 ds + \frac{Fz}{k_b T} \right] d\hat{u}. \quad (3.5)$$

O comprimento de persistência pode ser interpretado como uma medida do alcance de perturbações locais na conformação global da molécula, representando, de certa forma, uma espécie de *comprimento de correlação* da cadeia polimérica. Assim sendo, nos casos em que o valor de  $A$  for pequeno, comparativamente ao valor do comprimento de contorno  $L$  da molécula em questão, ( $A \ll L$ ), uma pequena alteração na posição de um ou de um pequeno grupo de monômeros (*perturbação local*) causará um efeito de alcance



limitado, que *persistirá* afetando os monômeros consequentes ao ponto de origem apenas até uma certa distância ( $A$ ). Como consequência, trechos da molécula podem ser movimentados uns em relação aos outros com relativa facilidade, caracterizando sua flexibilidade. Já no limite em que o valor de  $A$  for muito grande quando comparado ao valor de  $L$  ( $A \gg L$ ), o efeito de qualquer perturbação local na posição de qualquer monômero da cadeia será sentido por todos os outros, que tenderão a manter suas posições relativas inalteradas. Neste caso, teremos uma molécula *rígida*.

A partir da função de autocorrelação para  $\hat{u}(s)$ , que, segundo [11, 12] é dada por

$$\langle \hat{u}(s) \cdot \hat{u}(0) \rangle = \exp \left[ \frac{-s}{A} \right], \quad (3.6)$$

é possível calcular a distância quadrática média entre as duas extremidades da molécula polimérica para a conformação de equilíbrio nos limites flexível e rígido, obtendo (*apêndice B*)

- Limite flexível ( $A \ll L$ )

$$\langle R^2 \rangle \approx 2AL \quad (3.7)$$

- Limite rígido ( $A \gg L$ )

$$\langle R^2 \rangle \approx L^2 \quad (3.8)$$

### 3.4 A Força Entrópica de Recuo

O cálculo exato da energia  $E$  e da função de partição  $Z$  para o modelo WLC possui somente solução numérica, não sendo possível derivar uma expressão analítica explícita exata para a força entrópica de recuo da molécula, conforme feito no apêndice A para o modelo FJC. Entretanto, a partir do valor quadrático médio da distância entre as extremidades da molécula na conformação de equilíbrio e de aproximações feitas na expressão para a energia  $E$ , é possível desenvolver uma expressão aproximada para a força de recuo que tende a reconduzir a molécula de volta a uma conformação de equilíbrio.

A aproximação da força entrópica de recuo é feita em duas etapas distintas, sendo a primeira válida para pequenos estiramentos próximos à conformação de equilíbrio ( $z \approx \sqrt{\langle R^2 \rangle}$ ) e a segunda válida para estiramentos maiores, longe da conformação de equilíbrio ( $z \approx L$ ). As duas formulações, desenvolvidas separadamente, podem então ser combinadas em uma expressão única, válida em ambos os casos e que será a que utilizaremos no ajuste dos dados experimentais.

### 3.4.1 Estiramentos Próximos da Conformação de Equilíbrio

Para pequenos estiramentos próximos da conformação de equilíbrio, a força de recuo pode ser aproximada pela Lei de Hooke,

$$F = -kz, \quad (3.9)$$

onde a constante de força  $k$  é obtida a partir da equipartição da energia na conformação de equilíbrio,

$$\frac{3}{2}k_bT = \frac{1}{2}k \langle R^2 \rangle. \quad (3.10)$$

Assim, combinando (3.7) e (3.10), a constante de força  $k$  será dada por

$$k = \frac{3k_bT}{2AL}. \quad (3.11)$$

O força de recuo para pequenos estiramentos próximos à conformação de equilíbrio será então

$$F = -\frac{3k_bT}{2A} \frac{z}{L}. \quad (3.12)$$

Esta aproximação do valor da força entrópica de recuo para conformações próximas do equilíbrio tem exatamente a mesma forma da força derivada no apêndice A para o modelo FJC nas mesmas condições. Isto acontece devido ao fato de que para estados próximos do equilíbrio, ambos os modelos, FJC e WLC, prevêem um comportamento linear para a força entrópica de recuo que pode ser aproximado pela Lei de Hooke.

### 3.4.2 Estiramentos Longe da Conformação de Equilíbrio

Para estiramentos muito longos, que levam a molécula para uma conformação longe do equilíbrio, não é mais possível aproximar a força entrópica pela lei de Hooke. O processo alternativo para determinar a força entrópica de recuo para grandes estiramentos parte de (3.3).

No limite em que a força aplicada leva a molécula para uma conformação quase completamente estirada, ( $z \approx L$ ), o vetor tangente  $\hat{u}$  é quase paralelo à curva  $R(s)$ , que descreve a conformação da molécula. Desta forma, a componente de  $\hat{u}$  paralela à direção de estiramento,  $\vec{u}_z$ , além de ser bem maior que as demais, se mantém praticamente constante devido ao alto grau de estiramento da molécula. As componentes restantes de  $\hat{u}$ ,  $\vec{u}_x$  e  $\vec{u}_y$ , variam livremente dentro dos limites permitidos pela relação  $\hat{u} = \vec{u}_z + \vec{u}_x + \vec{u}_y$ .

Uma vez que  $|\hat{u}|^2 = |\vec{u}_z|^2 + |\vec{u}_x|^2 + |\vec{u}_y|^2 = |\vec{u}_z|^2 + |\vec{u}_\perp|^2 = 1$ , podemos escrever  $|\vec{u}_z|^2 = 1 - |\vec{u}_\perp|^2$ . Como  $|\vec{u}_\perp| \ll 1$ , fazemos a aproximação  $|\vec{u}_z| = 1 - \frac{|\vec{u}_\perp|^2}{2} + \mathcal{O}(|\vec{u}_\perp|^4)$ . Escrevendo ainda  $z = \int_0^L |\vec{u}_z| ds$ , (3.3) pode ser reescrita como

$$E_{WLC} = \frac{k_b T}{2} \int_0^L ds \left[ A \left| \frac{\partial \vec{u}_\perp}{\partial s} \right|^2 + \frac{F}{k_b T} |\vec{u}_\perp|^2 \right] - FL. \quad (3.13)$$

Definindo a transformada de Fourier  $\tilde{\vec{u}}_\perp(q) \equiv \int ds e^{iqs} \vec{u}_\perp(s)$ , a energia é desacoplada em modos normais

$$E = \frac{k_b T}{2} \int \frac{dq}{2\pi} \left[ Aq^2 + \frac{F}{k_b T} \right] |\tilde{\vec{u}}_\perp|^2 - FL. \quad (3.14)$$

O valor médio de  $|\vec{u}_\perp|^2$ , calculado a partir de (3.14) (*apêndice C*), é dado por

$$\langle |\vec{u}_\perp|^2 \rangle = \int \frac{dq}{2\pi} \langle |\tilde{\vec{u}}_\perp(q)|^2 \rangle = 2 \int \frac{dq}{2\pi} \frac{1}{\left( Aq^2 + \frac{F}{k_b T} \right)} = \sqrt{\frac{k_b T}{FA}}. \quad (3.15)$$

Assumindo que  $\frac{z}{L} \approx |\vec{u}_z|$ , temos

$$\frac{z}{L} = 1 - \frac{|\vec{u}_\perp|^2}{2} = 1 - \frac{1}{2} \sqrt{\frac{k_b T}{FA}}, \quad (3.16)$$

a partir da qual obtemos facilmente

$$F = \frac{k_b T}{A} \left[ \frac{1}{4} \frac{1}{\left(1 - \frac{z}{L}\right)^2} \right]. \quad (3.17)$$

### 3.4.3 Estiramentos Próximos e Longe da Conformação de Equilíbrio

Para construir uma expressão para a força entrópica de recuo de um polímero que seja válida tanto para pequenos quanto para grandes estiramentos, partimos de (3.17), inicialmente válida para grande estiramentos.

Para pequenos estiramentos, ( $z \sim 0$ ), o comportamento de (3.17) pode ser aproximado por sua expansão em série até primeira ordem

$$F = \frac{k_b T}{A} \left[ \frac{1}{4} + \frac{z}{2L} \right]. \quad (3.18)$$

Para que (3.18) tenha exatamente a mesma forma de (3.12), que é a expressão para a força de recuo para pequenos estiramentos, são acrescentadas a (3.17) duas pequenas correções, cujo efeito quando  $z \sim L$  é insignificante, resultando em uma expressão aproximada para a força entrópica de recuo válida tanto para pequenos quanto para grandes estiramentos [12, 13, 14, 15, 16]

$$F = \frac{k_b T}{A} \left[ \frac{z}{L} + \frac{1}{4 \left(1 - \frac{z}{L}\right)^2} - \frac{1}{4} \right]. \quad (3.19)$$

O comportamento da força entrópica de recuo está ilustrado no gráfico seguinte (*figura 3.4*)

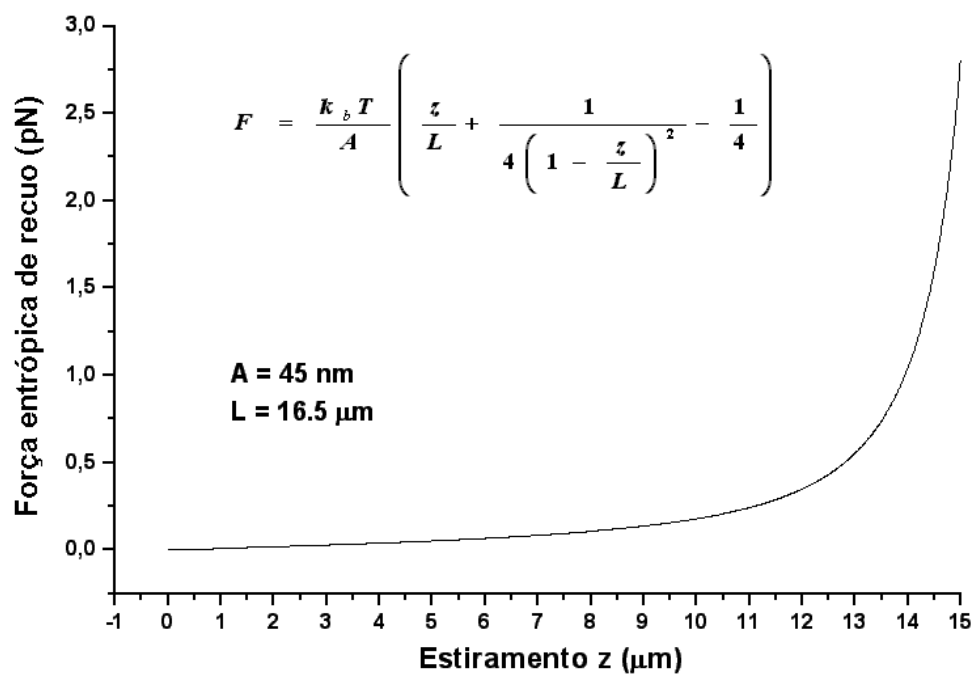


Figura 3.4: Comportamento da Força Entrópica de Recuo

## Capítulo 4

# Observação da Força Entrópica de Recuo do DNA

### 4.1 Requisitos Experimentais

Uma vez colocada em uma conformação fora do equilíbrio, para que uma molécula de DNA se mantenha estável, é necessária a aplicação de uma força  $\vec{F}$  às suas extremidades, a fim de contrabalancear a força entrópica de recuo. De outra forma, a molécula iniciaria o retorno gradual a uma conformação de equilíbrio assim que fosse removida desta condição.

Para que tal comportamento de recuo possa ser estudado, visando à obtenção de dados a partir dos quais seja possível caracterizar a elasticidade entrópica do DNA, são necessárias, além da capacidade de localização e manipulação de moléculas individuais, a capacidade de colocá-las fora da conformação de equilíbrio, através da aplicação de uma força de estiramento às suas extremidades, bem como a capacidade de registrar, com resolução temporal suficiente para caracterizar o movimento, o seu retorno a um estado de equilíbrio quando a força de estiramento é eliminada.

## 4.2 A Técnica Experimental

A técnica experimental utilizada para estudar o comportamento de recuo de moléculas de DNA previamente estiradas consiste em três etapas:

1. Preparação de amostras que contenham DNA em condições de ser manipulado individualmente.
2. Localização, estiramento e filmagem do recuo de moléculas individuais de DNA presentes nas amostras.
3. Análise digital de cada filmagem para extração da curva de recuo de cada molécula de DNA.

Devido ao seu diâmetro pequeno ( $d \sim 20\text{\AA}$ ), a visualização de moléculas isoladas de DNA em microscópios ópticos não é possível\*. Assim sendo, para que possam ser localizadas e manipuladas durante o experimento, usa-se um procedimento de preparação de amostras tal que as moléculas de DNA tenham suas extremidades conectadas eletrostaticamente à superfície de microesferas de poliestireno de  $3\mu m$  de diâmetro presentes na amostra, facilmente visualizáveis ao microscópio. O processo propicia condições para que ligações de mesma natureza aconteçam também entre a superfície de vidro da amostra e as moléculas de DNA. As moléculas a serem usadas durante o experimento serão as que tiverem uma de suas extremidades conectadas à superfície de uma microesfera e a outra conectada à superfície de vidro da amostra. Tal arranjo, análogo a um típico sistema *massa-mola*, onde a microesfera representa a massa, enquanto o DNA representa a mola (*figura 4.1*), possibilita, ao mesmo tempo, a localização e estiramento de moléculas de DNA isoladas.

A identificação de moléculas de DNA satisfazendo tais condições, bem como o estiramento das moléculas escolhidas para o experimento, é conse-

---

\*Em condições especiais, com a utilização de sondas fluorescentes e de um microscópio óptico equipado com aparato de fluorescência, a presença de moléculas de DNA pode ser detectada.

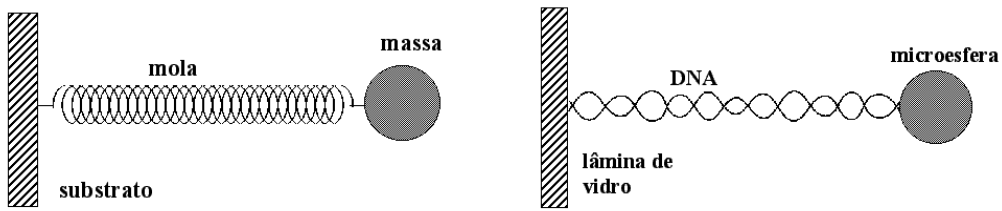


Figura 4.1: Analogia massa–mola  $\iff$  microesfera–DNA

guida através da manipulação das microesferas, empregando-se a técnica de pinçamento óptico [17], que permite não só testar cada microesfera para a presença de DNA, mas também avaliar se se trata somente de uma molécula isolada. O princípio de funcionamento, bem como a maneira com que a pinça é empregada no experimento, serão discutidos oportunamente.

## 4.3 Preparação das Amostras

### 4.3.1 Limpeza e Preparação das Lâminas

Na preparação das amostras são utilizadas lâminas de vidro<sup>†</sup> novas, cuidadosamente removidas da caixa e limpas com um pincel macio. Após a limpeza, cada lâmina recebe um anel de borracha, previamente limpo em banho ultrassônico com acetona durante 30 minutos e enxaguado em água deionizada. Para sua fixação na superfície da lâmina, a parte inferior de cada anel de borracha é cuidadosamente banhada em parafina derretida imediatamente antes de sua colocação sobre o centro da lâmina. Finalmente, cada lâmina preparada é aquecida por alguns segundos, para que a vedação de parafina na interface lâmina–anel de borracha seja otimizada.

### 4.3.2 Preparação da Solução de DNA

O passo seguinte na preparação das amostras consiste na preparação da solução que contém o DNA. Em um minitubo estéril são adicionados  $170\mu\text{l}$  de

<sup>†</sup>VWR micro cover glasses cat.# 48393 220.



PBS (*Phosphate Buffer Solution*)<sup>‡</sup> pH 6. A seguir, são adicionados  $225\mu\text{l}$  de uma solução contendo microesferas de poliestireno<sup>§</sup> ( $d \sim 3\mu\text{m}$ ) e PBS pH 6, na proporção de  $\frac{1\mu\text{l}}{1.4\text{ml}}$ . O minitubo é então suavemente agitado para homogeneização da solução. Esta será a solução *Mix*.

A seguir, são adicionados  $5\mu\text{l}$  da solução *stock* de DNA<sup>¶</sup>, previamente aquecida em banho térmico a  $62^\circ\text{C}$  durante 5 minutos, ao *Mix*. O minitubo é novamente suavemente homogeneizado e deixado em repouso durante cerca de 20 minutos. De acordo com [15], durante este período há a formação das conexões entre as microesferas e as moléculas de DNA. A ligação é atribuída ao efeito do baixo pH da solução, que facilita a adsorção do DNA em superfícies hidrofóbicas. Nestas condições, o DNA se liga às superfícies preferencialmente pelas extremidades [12, 18].

### 4.3.3 Finalização da Amostra

Na última fase do processo de preparação de amostras, o conteúdo do minitubo é dividido entre as lâminas previamente preparadas. A quantidade de lâminas depende do volume de solução preparado. Tipicamente, para as quantidades indicadas no protocolo de preparação de solução, que totaliza  $400\mu\text{l}$ , são usadas 2 ou 3 lâminas, dependendo do diâmetro dos anéis de borracha utilizados. A seguir, cada anel de borracha deve ser coberto cuidadosamente com outra lâmina, previamente limpa e cortada em dimensões menores (*figura 4.2*). O preenchimento das células (anéis de borracha) deve ser feito cuidadosamente, de forma a evitar que a solução transborde com a colocação da lâmina de cobertura ou que haja formação de bolhas de ar dentro da célula.

Com cada célula devidamente coberta, as amostras devem ficar em repouso por um período de 4 a 24 horas, durante o qual tanto microesferas quanto

---

<sup>‡</sup>A composição das PBS usadas na preparação de amostras é dada na *tabela 4.1*.

<sup>§</sup>Polybead Polystyrene  $3.0\mu\text{m}$  microspheres cat.# 17134.  $\rho = 1.05\text{g/ml}$ ,  $n = 1.6$ .

<sup>¶</sup>New England Biolabs Lambda DNA cat.# N3011S. Este DNA, que é extraído do vírus bacteriófago do tipo  $\lambda$ , tem 48.502 pb, medindo cerca de  $16.5\mu\text{m}$ .

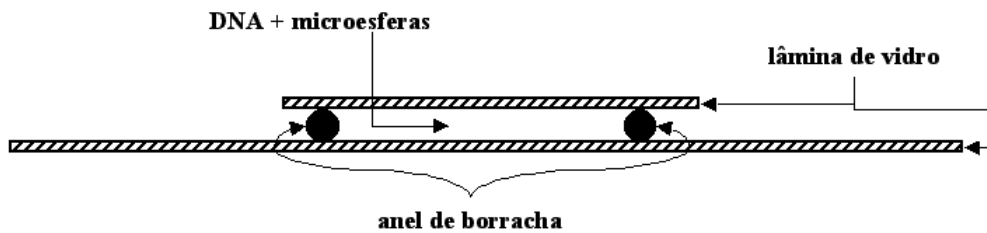


Figura 4.2: Amostra preparada

DNA estarão aderindo à superfície de vidro das lâminas. Quanto maior o repouso, maior a chance de encontrar bons pares microesfera-DNA.

Após o período de repouso, as células devem ser cuidadosamente abertas e gentilmente limpas com PBS pH 7.4. Este procedimento visa à remoção do excesso de microesferas livres na amostra e o restabelecimento do pH ideal para o DNA. O processo deve ser feito com extremo cuidado, evitando-se remover todo o líquido da célula de uma só vez. Deve-se remover boa parte da solução, completando, a seguir, o volume removido com PBS pH 7.4. O processo deve ser repetido pelo menos 4 vezes.

PBS	pH 6.0	pH 7.4
$NaCl$	140 mM	140 mM
$Na_2HPO_4$	8.5 mM	2.0 mM
$NaH_2PO_4$	1.5 mM	8.0 mM

Tabela 4.1: Composição das PBS utilizadas na preparação de amostras

Completada a limpeza, pode-se adicionar outros agentes para estudo de sua interação com o DNA. A célula deve então ser fechada, observando-se os mesmos cuidados anteriores. Caso sejam incluídos outros agentes nesta fase, deve-se aguardar o tempo recomendado para sua ação. As amostras estarão então prontas para serem utilizadas.

Concluído o processo de preparação de amostras, a maior parte das microesferas estará aderida à superfície da amostra ou então flutuando livremente na solução. Uma fração delas, porém, estará flutuando próxima à superfície

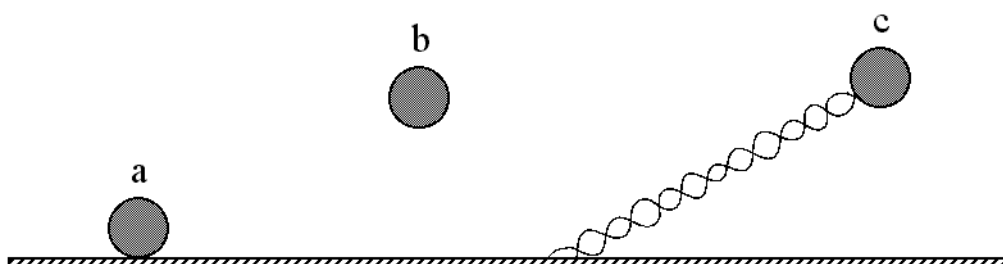


Figura 4.3: Microesferas em uma amostra pronta: a) *microesfera presa à superfície da amostra*; b) *microesfera flutuando livre na solução*; c) *microesfera presa à superfície da amostra através de uma molécula de DNA*

Solução n <sup>o</sup>	1	2	3	4	5*
<b>Microesferas + PBS</b>	150 $\mu$ l	150 $\mu$ l	300 $\mu$ l	250 $\mu$ l	225 $\mu$ l
<b>PBS</b>	640 $\mu$ l	245 $\mu$ l	95 $\mu$ l	145 $\mu$ l	170 $\mu$ l
<b>Volume Total (+DNA)</b>	800 $\mu$ l	400 $\mu$ l	400 $\mu$ l	400 $\mu$ l	400 $\mu$ l
<b>Resultado</b> (n <sup>o</sup> de microesferas)	<i>fraco</i>	<i>fraco</i>	<i>exagerado</i>	<i>bom</i>	<i>bom</i>

Tabela 4.2: Exemplos de soluções testadas na preparação de amostras

da lâmina, cada microesfera ligada a uma ou mais moléculas de DNA fixas na superfície da amostra, formando sistemas microesfera-DNA (*figura 4.3*).

A frequência de ocorrência de tais sistemas está relacionada com o tempo de repouso e também com a quantidade total de microesferas com que a amostra foi preparada. A adição excessiva de microesferas, embora cause um aumento na ocorrência de sistemas microesfera-DNA, acaba por gerar um número tão elevado de microesferas presas à superfície da amostra que não há como puxar livremente as microesferas com DNA. Durante os experimentos, variações na concentração de microesferas foram testadas, levando às quantidades indicadas na preparação da solução de DNA. Algumas das variações testadas podem ser vistas na *tabela 4.2*. O resultado indicado se refere à quantidade total de microesferas presentes na amostra.

\*Este foi o tipo de solução adotado como padrão.

## 4.4 Localização, Estiramento e Filmagem do Recuo do DNA

### 4.4.1 A Montagem Experimental

A montagem experimental (*figura 4.4*) consiste de um microscópio óptico invertido *Nikon*<sup>†</sup> associado a um laser infravermelho e acoplado a um sistema de câmaras CCD. O feixe do laser incidente no microscópio é focalizado a alguns *micra* da superfície da amostra com o auxílio de uma objetiva, criando a pinça óptica que permite a manipulação das microesferas.

### 4.4.2 A Pinça Óptica

Nos últimos anos, a técnica de micromanipulação de objetivos através do uso de um feixe de luz laser, comumente referida como a técnica da *pinça óptica*, desenvolvida desde a década de 70 [17], vem sendo cada vez mais utilizada no estudo de problemas biológicos, na medida em que permite a manipulação de células e outros organismos vivos, e também seus componentes, como organelas celulares ou mesmo moléculas individuais, como no caso do DNA, de maneira precisa e individual, mantendo as características fisiológicas inalteradas [19].

#### Funcionamento Básico

Uma pinça óptica consiste basicamente de um feixe de laser, com perfil gaussiano, focalizado através de uma lente ou objetiva<sup>‡</sup>. O mecanismo de pinçamento pode ser entendido, de forma simplificada, aplicando-se a conservação do momento linear ao sistema laser-objeto pinçado (*figura 4.5*).

---

<sup>†</sup>Nikon Eclipse TE300. Este modelo de microscópio possui óptica corrigida no infinito, permitindo que elementos ópticos diversos possam ser inseridos antes da objetiva sem alterar a focalização da mesma, facilitando a montagem da pinça óptica.

<sup>‡</sup>Por este motivo as pinças ópticas são geralmente montadas a partir de um microscópio óptico, o que também auxilia na visualização dos objetos a serem manipulados.

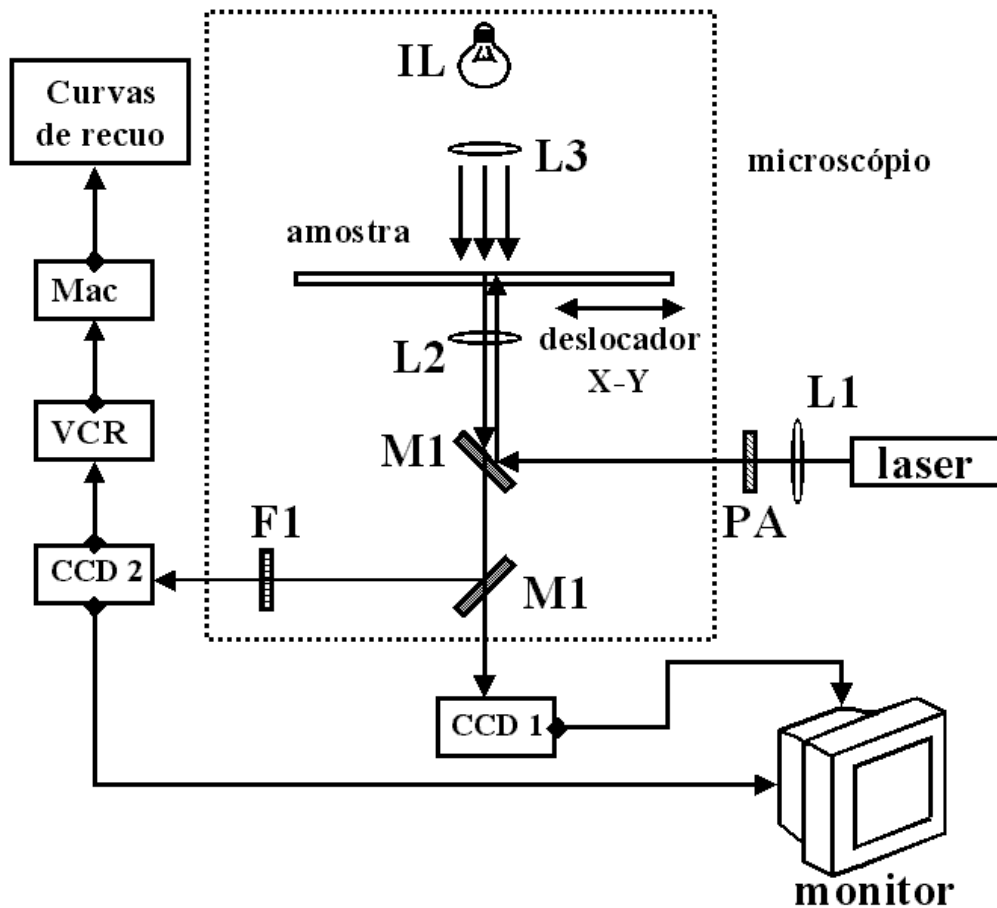


Figura 4.4: Esquema da Montagem Experimental

- **laser:** SDL 5422  $\lambda \sim 832nm$
- **L1:** Objetiva 20x
- **M1:** Espelho 50%
- **IL:** Iluminação
- **PA:** Prisma Anamórfico
- **L2:** Objetiva Nikon 100x 1.4 na
- **L3:** Condensador
- **F1:** Filtro infravermelho

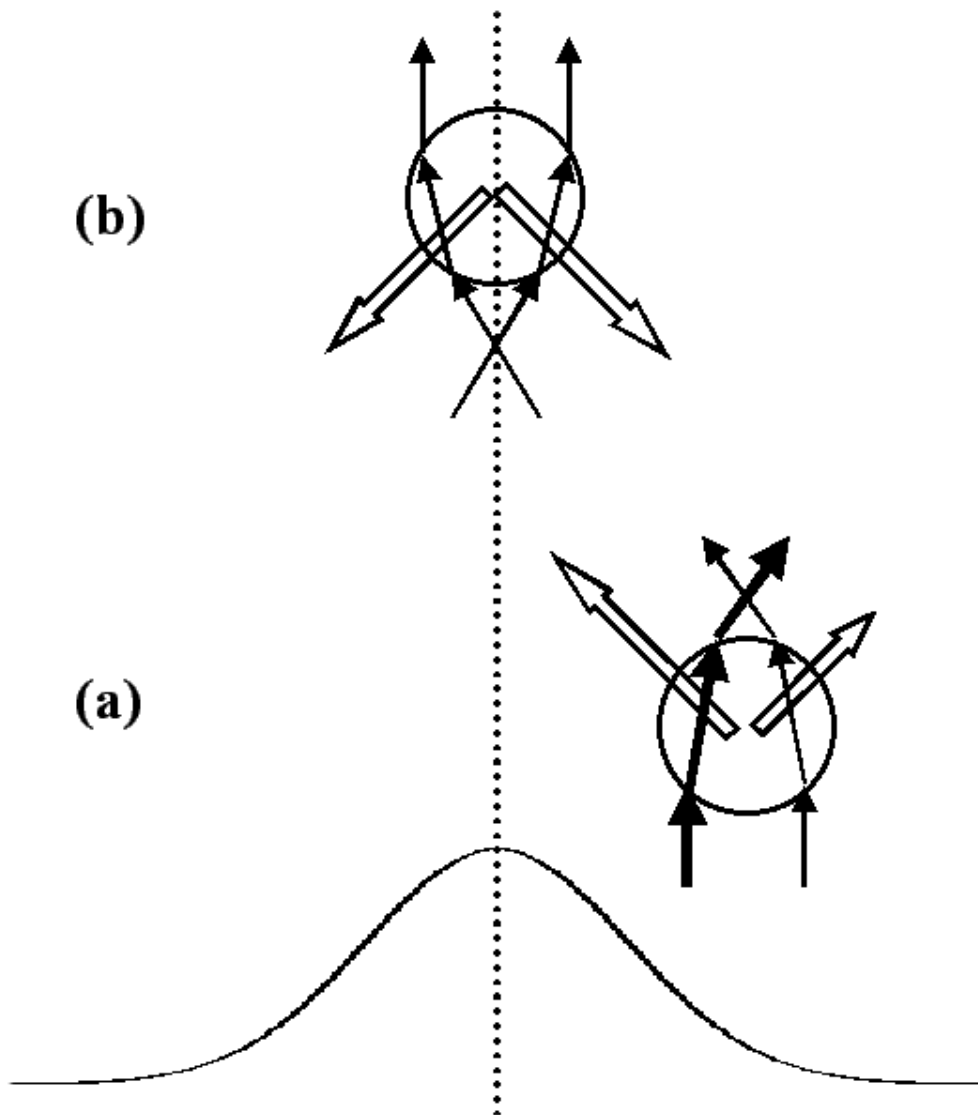


Figura 4.5: Princípio do Pinçamento Óptico: (a) - Um objeto ao alcance do laser, mas fora do eixo do feixe, refrata o laser (*setas sólidas*). A conservação do momento linear do sistema laser-objeto faz com que o objeto sofra uma força (*setas abertas*). A diferença de intensidade devida ao perfil do laser faz com que o objeto seja puxado em direção do eixo do feixe e empurrado para o foco. (b) - Uma vez posicionado no eixo do feixe, ao passar pelo foco, o objeto experimenta uma força que tende a puxá-lo de volta. Como resultado final o objeto é estabilizado sobre o eixo do feixe, em uma posição ligeiramente posterior ao foco, onde a pressão de radiação e a força de empuxo da pinça se contrabalançam.

A força da pinça depende da intensidade e da frequência do laser utilizado. Deve-se ter em mente, porém, a natureza do material a ser manipulado ao se escolher tanto o tipo do laser quanto a intensidade incidente, a fim de evitar possíveis danos às amostras. No nosso caso, assim como na maioria das pinças utilizadas para manipulação de material biológico, utilizamos um laser infravermelho, a uma potência incidente de aproximadamente  $1mW$ , que gera uma força de pinçamento da ordem de  $1pN$ . Arranjos experimentais semelhantes [14, 15, 20] podem chegar a forças da ordem de  $50pN$ .

### O Papel de Pinça Óptica no Experimento

A pinça óptica desempenha um papel fundamental da realização de nossos experimentos. É a partir do comportamento das microesferas de poliestireno capturadas e manipuladas, uma a uma, com a pinça que somos capazes de determinar quais microesferas contém DNA nas condições ideais ao experimento. A cada vez que uma microesfera é capturada pela pinça, o estágio do microscópio, que contém a amostra, é movimentado no plano X-Y. A movimentação da amostra é feita empregando deslocadores piezoelétricos que permitem uma precisão submicrométrica mesmo quando operados manualmente. Se a microesfera em questão estiver ligada à superfície da amostra através de uma molécula de DNA, após o estágio ter sido deslocado de uma distância máxima de  $2L$ , a microesfera deverá escapar da pinça, que não tem força suficiente para causar deformações reais ao DNA<sup>§</sup> e nem arrancá-lo da superfície da amostra ou da microesfera. Para comprovar se se trata somente de uma única molécula de DNA e também para assegurar que não há obstruções na superfície da amostra e confirmar a amplitude do deslocamento diametral  $2L$ , a movimentação da amostra é feita repetidas vezes em direções diferentes, buscando observar o padrão de simetria circular em torno do ponto estimado de fixação do DNA na lâmina (*figura 4.6*).

---

<sup>§</sup>Segundo [21], a força necessária para estirar uma molécula de DNA a um comprimento maior do que  $L$  (*overstretching*), é da ordem de  $60pN$ .

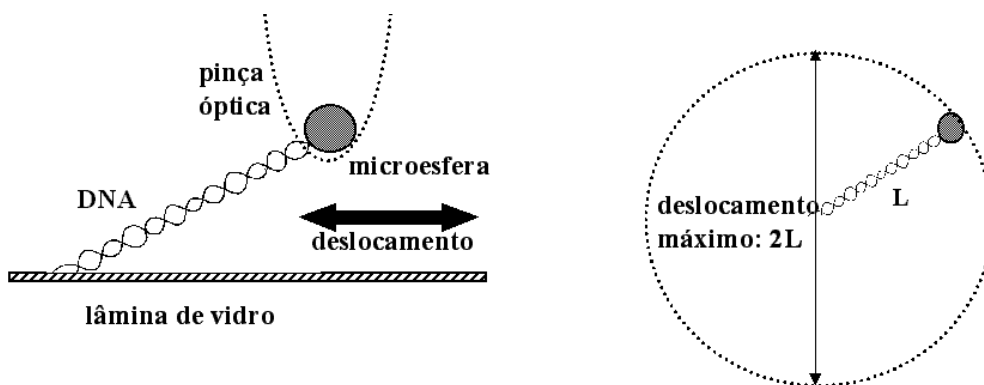


Figura 4.6: Pinçamento de um sistema microesfera-DNA

### 4.4.3 O Sistema de Vídeomicroscopia

Conforme pode ser visto no esquema da montagem experimental (*figura 4.4*), o experimento emprega duas câmaras CCD<sup>¶</sup> conectadas ao microscópio onde está montada a pinça óptica. A imagem da CCD 1 é usada na condução e controle do experimento, uma vez que através dela é possível visualizar o ponto em que o feixe de laser infravermelho está focalizado na amostra. Já a imagem da CCD 2, onde não é possível ver o laser, é empregada na análise do recuo das microesferas.

Todo o procedimento de pinçamento das microesferas, verificação da existência e das condições do DNA, bem como a determinação do ponto de estiramento máximo, encontrado a partir da mudança no padrão de imagem do laser quando a microesfera começa a se afastar do eixo do feixe, é feito com base nas imagens da CCD 1. Uma vez selecionada uma microesfera que satisfaça os requisitos do experimento, as imagens da CCD 2, conectada a um VCR<sup>||</sup>, começam a ser gravadas. A microesfera selecionada é pinçada e mais uma vez deslocada sobre o diâmetro de sua área de movimentação (*figura 4.6*), em pelo menos 2 direções. A seguir ela é colocada na posição de estiramento máximo. Alguns instantes depois, o laser é interrompido,

<sup>¶</sup>Dage-MTI CCD (640x480).

<sup>||</sup>Sony Hi8 model EVO9650.



liberando a microesfera, que recua ao ser puxada pelo DNA que retorna a uma configuração de equilíbrio. Diversos recuos, em diferentes direções, são filmados para cada microesfera selecionada.

## 4.5 Extração das Curvas de Recuo

### 4.5.1 O Método de Análise de Imagens

As imagens coletadas através da CCD 2 conectada ao microscópio são separadas em trechos, cada qual contendo um único recuo. Cada trecho é analisado, quadro a quadro, por computador, com o auxílio do software *Image 1.62*\*\*.

Antes do início da análise do recuo, o trecho inicial da gravação, onde a microesfera é deslocada sobre o diâmetro  $2L$  de sua área de movimentação, é utilizado para determinar o comprimento  $L$  do DNA.

A análise do recuo é iniciada com a captura do primeiro quadro do trecho em questão, que é então reduzido de seu formato original, em tons de cinza, para o formato binário, em preto e branco. Desta forma, qualquer objeto presente na imagem original, no caso, a microesfera, é destacado em preto, enquanto o restante da imagem fica em branco (*figura 4.7*). A partir desta

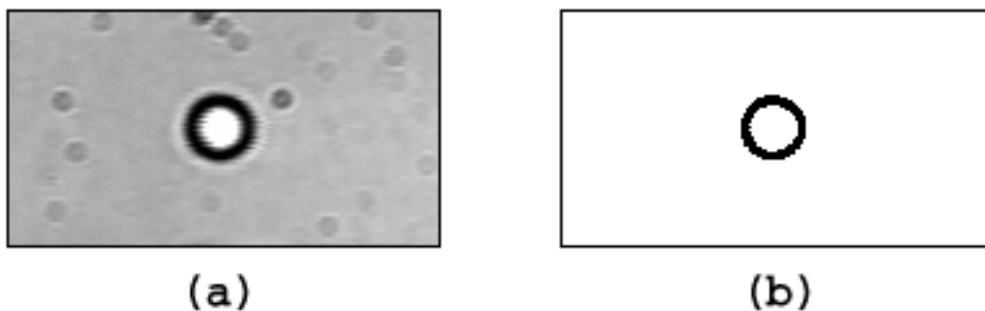


Figura 4.7: Tratamento das imagens de recuo: (a) formato original (tons de cinza). (b) formato binário (P & B).

---

\*\*O NIH Image é um software de domínio público para o processamento e análise de imagens. Informações adicionais, bem como o próprio software, podem ser obtidas em <http://rsb.info.nih.gov/nih-image>.

imagem reduzida, o software *Image* é capaz de determinar as coordenadas do centro de massa da microesfera, que, juntamente com índice de tempo do quadro analisado, constitui o produto da análise de cada quadro.

O processo é repetido para cada quadro, individualmente, até o final de cada trecho selecionado. Como resultado final, obtém-se uma sequência de pontos indexados temporalmente que representa o movimento de recuo da microesfera, puxada pelo DNA. Cada curva de recuo pode então ser comparada com o modelo teórico. Uma idéia geral da curva gerada no processo pode ser concebida observando-se a posição de uma microesfera em recuo a intervalos de tempo regulares (*figura 4.8*).

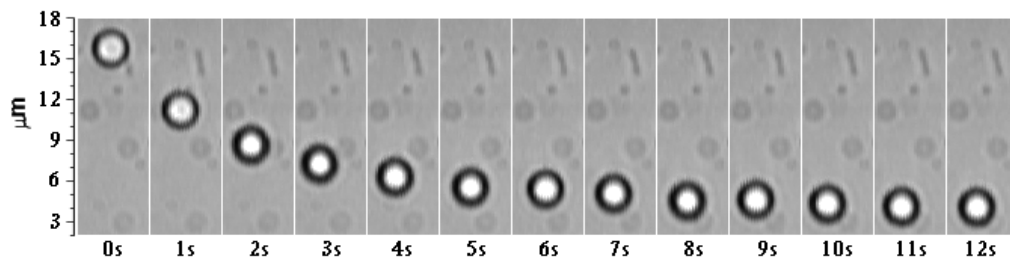


Figura 4.8: Sequência de imagens de uma microesfera em recuo

# Capítulo 5

## O Modelo para o Ajuste dos Dados

### 5.1 A Equação do Movimento de Recuo

O processo de recuo do DNA, quando este está puxando uma microesfera, é quase estático [15]. Isto acontece porque o tempo de recuo do sistema microesfera-DNA ( $\sim 3s$ ) é muito maior do que o tempo necessário para que o DNA atinja um estado de equilíbrio ( $\sim 0.1s$ ). Desta forma, durante o recuo, o DNA está passando somente por estados estirados de equilíbrio. Como a inércia do sistema é desprezível, em cada estado estirado de equilíbrio, a força de recuo do DNA é contraposta pela força de arraste de Stokes, que atua sobre a microesfera. Assim sendo, o processo de recuo do sistema microesfera-DNA deve obedecer

$$\vec{F}_{DNA} = -\vec{F}_{Stokes} = -6\pi\eta r \vec{v}, \quad (5.1)$$

onde  $\eta$  é a viscosidade do meio,  $r$  é o raio da microesfera e  $v$  é a velocidade de recuo. Substituindo a expressão para  $\vec{F}_{DNA}$  de nosso modelo, dada por (3.19), temos

$$\frac{k_b T}{A} \left[ \frac{z}{L} + \frac{1}{4 \left(1 - \frac{z}{L}\right)^2} - \frac{1}{4} \right] = -6\pi\eta r \frac{dz}{dt}. \quad (5.2)$$

Uma vez que

$$D = \frac{k_b T}{\gamma} = \frac{k_b T}{6\pi\eta r} \quad (5.3)$$

representa o coeficiente de difusão da microesfera no meio, o resultado final para o comportamento do sistema é

$$\frac{dz}{dt} = -\frac{D}{A} \left[ \frac{z}{L} + \frac{1}{4\left(1 - \frac{z}{L}\right)^2} - \frac{1}{4} \right]. \quad (5.4)$$

Infelizmente, não é possível encontrar uma solução explícita  $z(t)$  para (5.4). Desta forma, os dados experimentais, colhidos na forma de uma curva de recuo  $z(t)$  devem ser diferenciados para que possam ser ajustados de acordo com (5.4). A diferenciação é feita de maneira discretizada, tomando-se a diferença entre 2 pontos consecutivos na curva  $z(t)$  e dividindo o resultado pelo incremento de tempo, que é sempre igual a  $\frac{1}{30}s$ , equivalente a exatamente um quadro no filme de recuo. Entretanto, como seria de se esperar, o ruído experimental faz com que os dados resultantes da derivação da curva de recuo original tenham uma grande dispersão (*figura 5.1*). Assim sendo, antes da derivação, a curva original  $z(t)$  é suavizada, diminuindo consideravelmente a dispersão e produzindo uma curva com bem menos ruído para o ajuste de parâmetros (*figura 5.2*).

## 5.2 Polímeros Ideais *versus* Polímeros Reais

Até agora estivemos considerando apenas cadeias poliméricas ideais, cuja distribuição para a distância *ponta-a-ponta*  $z$  é uma gaussiana centrada em zero. Assim sendo, no equilíbrio,  $\langle z \rangle = 0$  e a força entrópica de recuo se torna nula, exatamente como previsto em (3.19). Entretanto, a observação experimental mostra que o movimento de recuo é interrompido antes que  $z$  atinja o valor zero, conforme pode ser visto na *figura 5.1a*. Isto acontece devido ao fato de que embora, no equilíbrio,  $\langle z \rangle = 0$ , a distância quadrática média *ponta-a-ponta*  $\langle z^2 \rangle$  tem um valor não nulo, permitindo definir um valor

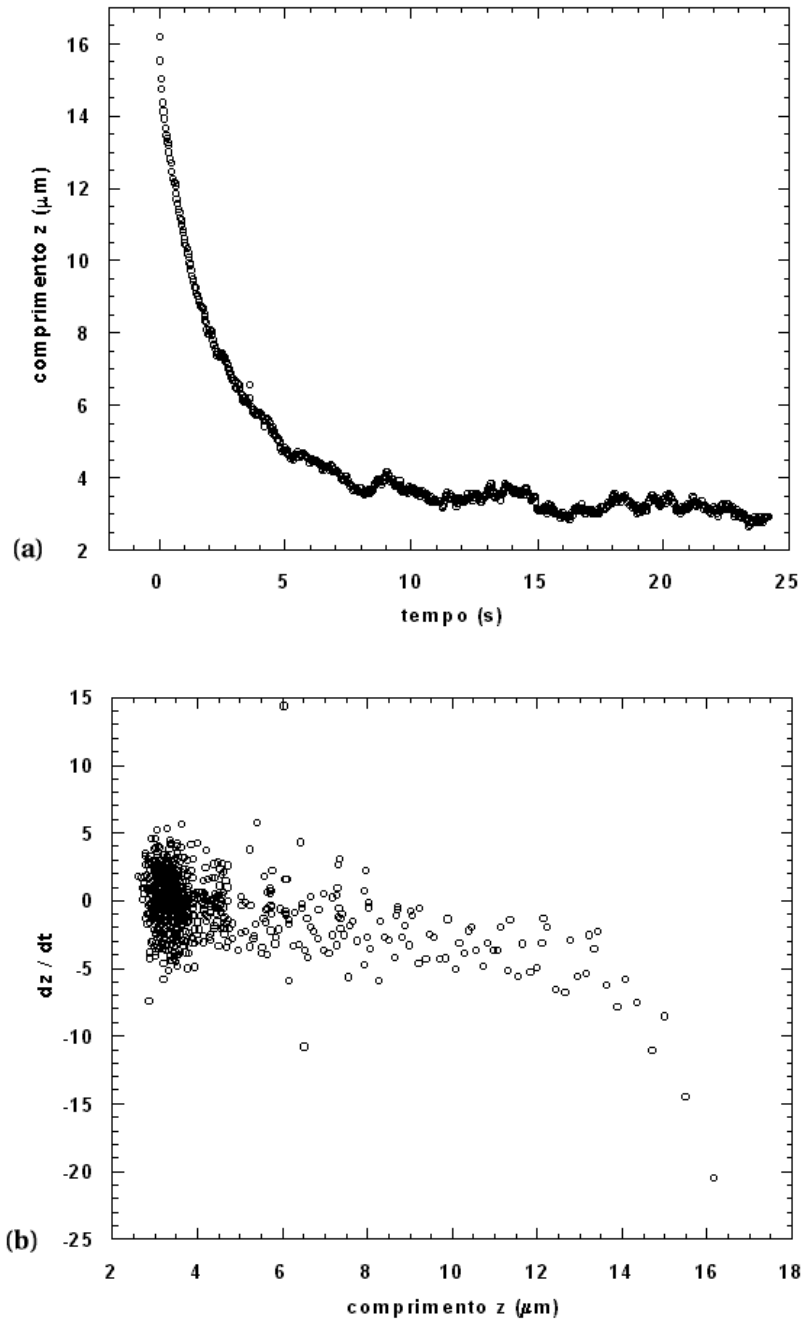


Figura 5.1: Curva de recuo  $z(t)$  (a) e sua derivada  $\frac{dz}{dt}$  (b).

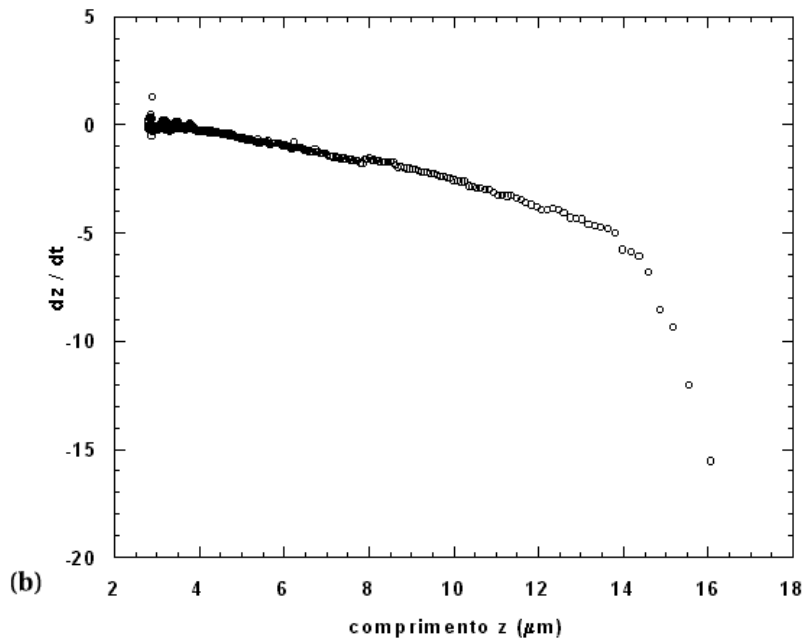
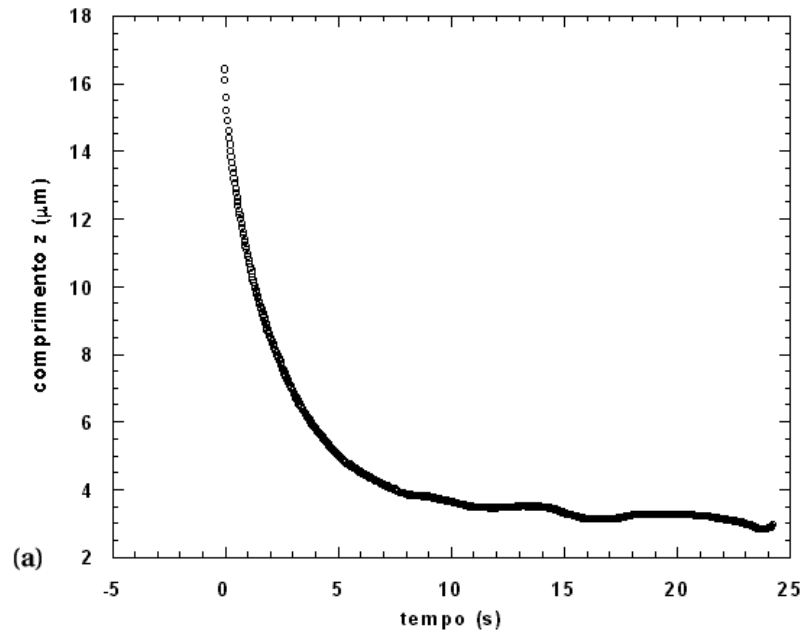


Figura 5.2: Curva de recuo suavizada  $z(t)$  (a) e sua derivada  $\frac{dz}{dt}$  (b).

*efetivo não nulo*  $z_0 = \sqrt{\langle z^2 \rangle}$ , que pode ser interpretado como o comprimento de equilíbrio da molécula, onde a força entrópica de recuo se anula.

Assim sendo, no ajuste dos dados experimentais, devemos levar em conta o valor  $z_0$ , introduzindo-o na expressão para o movimento de recuo do DNA, que agora terá a forma

$$\frac{dz}{dt} = -\frac{D}{A} \left[ \frac{(z - z_0)}{L} + \frac{1}{4 \left( 1 - \frac{(z - z_0)}{L} \right)^2} - \frac{1}{4} \right]. \quad (5.5)$$

Para uma cadeia gaussiana ideal, imersa no espaço tridimensional, temos [11, 12, 22]

$$z_0 = \sqrt{Nb^2} = \sqrt{2AL} \approx 1.2\mu m, \quad (5.6)$$

onde, no limite contínuo,  $Nb = L$  e  $b = 2A$ , com  $L = 16.5\mu m$  e  $A = 45$  nm.

Para um polímero real, onde o número de conformações acessíveis à molécula é menor devido ao efeito da exclusão de volume, que impede que monômeros não consecutivos se aproximem muito, a distribuição de  $z$  não é mais gaussiana e também não está mais concentrada em torno de zero. Neste caso, o valor típico de  $z_0$  será aproximadamente [22]

$$z_0 \approx bN^\nu. \quad (5.7)$$

onde  $\nu = \frac{3}{2+d}$  e  $d$  é dimensão do espaço disponível às conformações da molécula.

Devido à proximidade da superfície da amostra durante os experimentos de recuo, que tende a diminuir o espaço disponível para o recuo da molécula, o valor de  $z_0$  deve ficar entre os valores estimados a partir de (5.7) para  $d = 3$  e  $d = 2$ , ou seja

$$2.1\mu m \leq z_0 \leq 4.5\mu m. \quad (5.8)$$

### 5.3 O Efeito da Proximidade da Superfície Sobre o Coeficiente de Difusão D

A relação de Stokes-Einstein para o coeficiente de difusão livre de uma partícula em um fluido (5.3) é válida quando se pode aproximar a velocidade de escoamento do fluido na superfície da partícula por zero, ao mesmo tempo em que se mantém um valor constante  $v_0$  longe da partícula em todas as direções. A proximidade de uma fronteira ou qualquer obstáculo ao fluxo de fluido nas proximidades da partícula altera sensivelmente o valor do coeficiente de difusão, conforme observado em [23, 24].

Para uma partícula esférica de raio  $r$ , próxima a uma superfície, o novo valor do coeficiente de difusão paralelo à superfície é dado, de acordo com [23], por

$$D_{//} = D_0 \left[ 1 - \frac{9}{16} \left( \frac{r}{h} \right) + \frac{1}{8} \left( \frac{r}{h} \right)^3 - \frac{45}{254} \left( \frac{r}{h} \right)^4 - \frac{1}{16} \left( \frac{r}{h} \right)^5 \right]. \quad (5.9)$$

onde  $h$  representa a altura do centro da partícula em relação à superfície em questão e  $D_0$  representa o coeficiente de difusão livre, dado por (5.3).

No caso das microesferas empregadas no experimento, cujo raio é da ordem de  $1.4\mu m$ , o comportamento previsto para o coeficiente de difusão pode ser observado no gráfico seguinte (*figura 5.3*).

Quando a microesfera se encontra muito próxima à superfície da amostra, a queda no valor do coeficiente de difusão, causada pelo aumento na força de arraste de Stokes, além de dificultar o movimento de recuo, aumenta a chance de aderência da microesfera à superfície da amostra durante a realização do experimento. Assim sendo, o processo de estiramento e também o recuo são sempre realizados a uma altura  $h$  em relação à superfície da lâmina, o que introduz as correções discutidas a seguir.



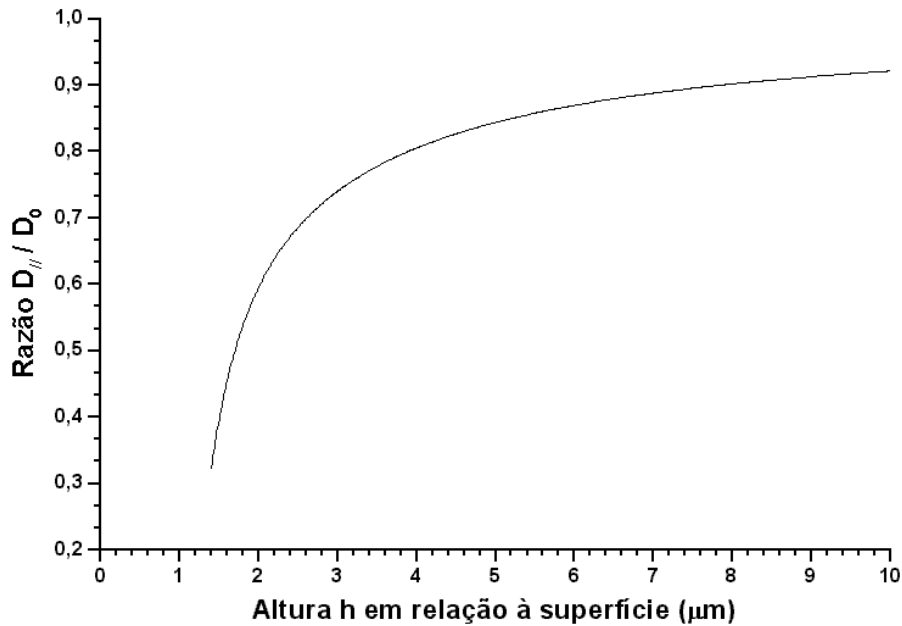


Figura 5.3: Variação do coeficiente de difusão  $D$  com a altura.  $D_0$  representa o coeficiente de difusão livre e  $h$  representa a altura do centro da microesfera em relação à superfície da amostra.

## 5.4 Correções para Altura $h > 0$

Imediatamente após o laser ter sido interrompido e o DNA iniciar o processo de recuo, arrastando com ele a microesfera, a situação do sistema microesfera-DNA pode ser descrita pelo diagrama a seguir (*figura 5.4*).

Dada a limitação da montagem experimental, que somente permite o registro do deslocamento horizontal da microesfera, os valores de  $h$  usados nos experimentos foram sempre 3 ou 5  $\mu\text{m}$ , garantindo que o movimento de recuo fosse predominantemente horizontal. Entretanto, o movimento vertical da microesfera deve ser levado em conta, uma vez que a variação de  $h$  durante o recuo afeta o valor do coeficiente de difusão, conforme (5.9).

Para o ajuste dos dados, é assumido que o movimento de recuo acontece com  $\theta$  constante. O valor de  $\theta$ , calculado para cada sistema DNA-microesfera a partir dos valores de  $L$  e  $h$ , é usado para corrigir a curva de recuo horizon-

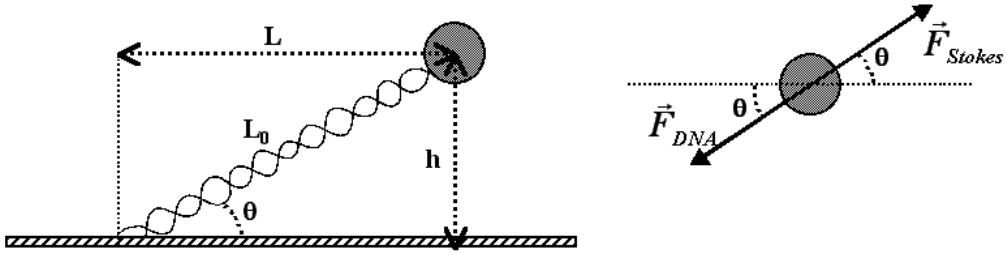


Figura 5.4: Situação de um sistema microesfera-DNA imediatamente após o início do recuo.  $L$  representa a projeção horizontal do comprimento do DNA, obtida pelo sistema de vídeo,  $L_0$  representa o comprimento de contorno do DNA,  $\theta$  é o ângulo entre o DNA e a superfície da amostra e  $h$  representa a altura do centro da microesfera em relação à superfície da amostra.

tal, aproximando-a da curva real. A correção é feita dividindo-se os dados experimentais originais pelo  $\cos \theta$ . Uma vez que o DNA está aderido à superfície da microesfera, após a correção em relação a  $\theta$ , a curva de recuo deve ainda sofrer uma translação de  $-1.4\mu m$ , eliminando a contribuição do raio da microesfera ao comprimento do DNA. A curva de recuo estará então pronta para ser ajustada de acordo com o modelo teórico.

Durante o ajuste, o valor de  $D$  é corrigido a cada ponto, cada novo valor sendo calculado a partir da altura atual da microesfera, dada por

$$h = \frac{h_0(z + 1.4)}{L_0 + 1.4}. \quad (5.10)$$

onde  $h_0$  é a altura de onde a microesfera inicia o recuo.

A expressão final utilizada para o ajuste dos dados é dada por

$$\frac{dz}{dt} = -\frac{D(h)}{A} \left[ \frac{(z - z_0)}{L_0} + \frac{1}{4 \left( 1 - \frac{(z - z_0)}{L_0} \right)^2} - \frac{1}{4} \right] \quad (5.11)$$

onde  $D(h)$  é dado por (5.9) e  $h$  por (5.10).

## 5.5 Parâmetros Ajustados

As curvas de recuo corrigidas são ajustadas de acordo com (5.11). São passados como parâmetros de ajuste o valor do comprimento de persistência  $A$  e o valor do comprimento de equilíbrio  $z_0$  de cada molécula de DNA.

São mantidos fixos o valor do comprimento de contorno  $L_0$  de cada molécula de DNA, calculado a partir da correção, pelo ângulo  $\theta$ , do valor máximo de deslocamento horizontal  $L$  obtido previamente ao recuo, e o valor do coeficiente de difusão livre  $D_0$ , calculado a partir de (5.3) com  $T = 23^\circ C$ ,  $\eta = 0.9325 \cdot 10^{-5} Kg/m \cdot s^*$  e  $r = 1.4\mu m$ , dando como resultado

$$\underline{D_0 = 0.166\mu m^2/s}$$

---

\*Valor extraído do CRC Handbook of Chemistry and Physics, 69th Edition, p.F-40.

# Capítulo 6

## Resultados

Os experimentos foram realizados usando DNA puro e complexos de DNA + brometo de etídio. Os resultados obtidos em cada caso são apresentados e discutidos a seguir.

### 6.1 DNA Puro

Os resultados típicos obtidos para amostras contendo DNA puro podem ser observados na *tabela 6.1*, abaixo.

$h(\mu m)$	$A(nm)$	$z_0(\mu m)$	$L_0(\mu m)$
3	41	3.2	13.0
3	43	2.3	13.3
5	44	1.9	13.5
3	42	2.9	13.5
5	40	3.1	16.6
5	48	2.1	16.6
3	45	3.4	16.6
3	49	3.4	21.1
3	45	4.2	24.0

Tabela 6.1: Comprimentos de persistência obtidos para DNA puro

O valor médio do comprimento de persistência obtido para o DNA puro foi:

$$\underline{\underline{A = 44 \pm 3 \text{ nm}}}$$

O valor médio encontrado está perfeitamente de acordo com os valores típicos reportados na literatura, que variam de 39 a 53 nm, dependendo da força iônica do meio empregado. Para o meio utilizado nos experimentos (*PBS 10 mM pH 7.4, Na<sup>+</sup> 150 mM*), o valor típico da literatura é de 43 nm.

Durante os experimentos, foram medidos valores de  $L_0$  menores e maiores do que o valor esperado para uma molécula única de DNA de *fago λ*, em torno de  $16.5\mu\text{m}$ . No caso dos valores de  $L_0$  menores do que  $16.5\mu\text{m}$ , a princípio poderia ser levantada a hipótese de se tratar de mais de uma molécula de DNA aderida à superfície da microesfera, o que viria a prejudicar tanto a medida do comprimento  $L_0$  do DNA quanto o recuo da microesfera. Entretanto, a semelhança, tanto no comportamento de recuo quanto no ajuste dos parâmetros, entre as moléculas que apresentaram comprimentos menores e as que apresentaram o tamanho correto nos leva a acreditar na existência, na solução *stock* de DNA, de fragmentos menores que  $16.5\mu\text{m}$ . Como se trata de moléculas de DNA sob exatamente as mesmas condições, seu comportamento elástico entrópico deveria ser compatível, exatamente como observado nos experimentos. Já no caso dos valores de  $L_0$  maiores do que  $16.5\mu\text{m}$ , não foi possível justificar a discrepância nos valores de  $L_0$  medidos. Ainda assim, caso a dispersão da solução *stock* de DNA, não fornecida pelo fabricante, ou mesmo a formação de ligações entre fragmentos e moléculas inteiras de DNA, seja suficiente para explicar a existência de moléculas com o comprimento de contorno maior que  $16.5\mu\text{m}$ , seu comportamento pode ser explicado pelo mesmo argumento empregado no caso fragmentos menores.

## 6.2 DNA + Brometo de Etídio

O brometo de etídio é um agente fluorescente que possui alta afinidade por moléculas de DNA, sendo largamente utilizado para sua detecção. Por ser

um composto intercalante às bases do DNA, se posicionando entre os pares de bases ao longo de toda a molécula, seu efeito esperado seria o aumento do comprimento de persistência, à medida em que ao ocupar o espaço entre os pares de bases, o brometo de etídio contribuiria para tornar toda a estrutura mais rígida.

Os resultados típicos obtidos para amostras contendo DNA + brometo de etídio podem ser observados na *tabela 6.2*, abaixo.

$h(\mu m)$	$A(nm)$	$z_0(\mu m)$	$L_0(\mu m)$
5	143	2.3	16.8
5	121	2.2	16.8
3	157	2.0	16.8
3	125	2.5	16.8
5	149	2.1	18.7
3	123	3.1	18.7
3	160	3.3	19.7
3	134	2.3	19.7

Tabela 6.2: Comprimentos de persistência obtidos para complexos de DNA + brometo de etídio

O valor médio do comprimento de persistência obtido para complexos de DNA + brometo de etídio foi:

$$A = 139 \pm 15 \text{ nm}$$

O valor médio encontrado indica que a rigidez da molécula de DNA aumentou por um fator da ordem de 3. Este é um resultado inédito na literatura e que confirma as expectativas iniciais.

Uma comparação entre os comportamentos de recuo e os ajustes de parâmetros entre uma amostra contendo DNA puro e outra contendo complexos de DNA + brometo de etídio pode ser vista nos gráficos seguintes (*figura 6.1*).

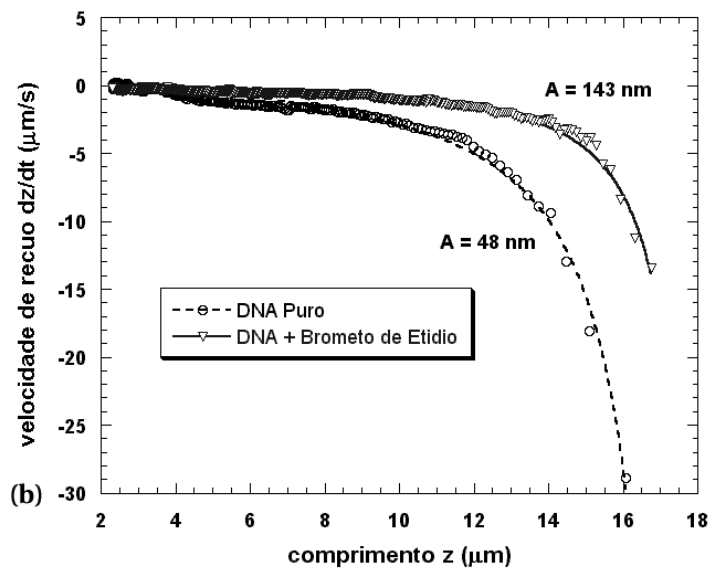
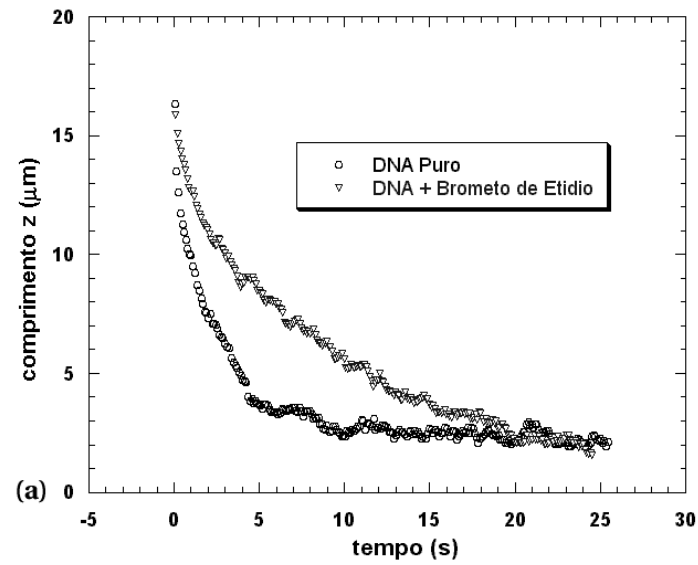


Figura 6.1: Comparação DNA puro *versus* DNA + brometo de etídio: (a) - comportamento de recuo; (b) - ajuste ao modelo teórico.

# Capítulo 7

## Conclusão

Nesta dissertação combinamos as técnicas de pinçamento óptico e de vídeomicroscopia para estudar o comportamento elástico entrópico de moléculas de DNA de *fagos*  $\lambda$ , realizando experimentos com uma única molécula por vez.

A concordância entre os valores de comprimento de persistência para o DNA puro obtidos nos experimentos e os valores encontrados na literatura atual, obtidos através do emprego de outros métodos experimentais, permite concluir que o método desenvolvido neste trabalho pode ser aplicado com sucesso ao estudo das propriedades elásticas entrópicas de uma única molécula de DNA.

A obtenção de valores do comprimento de persistência para complexos de DNA + brometo de etídio, que constitui, no melhor de nosso conhecimento, medida inédita, é um exemplo de que o método empregado nesta dissertação também pode ser utilizado no estudo do efeito sobre as propriedades elásticas entrópicas do DNA causados por substâncias que interajam diretamente com sua estrutura, tais como proteínas, drogas experimentais e outros compostos, abrindo perspectivas para possíveis trabalhos futuros.



# Apêndice A

## Cálculo Explícito de F para o Modelo FJC

No modelo FJC discreto, a molécula polimérica é formada pela junção de  $N$  segmentos de comprimento fixo  $b$ . Cada segmento é livre para se posicionar em qualquer direção, independentemente da orientação dos segmentos anterior e posterior. A energia de uma configuração é dada por

$$E_{FJC} = -Fb \sum_{i=1}^N \hat{t}_i \cdot \hat{z}, \quad (\text{A.1})$$

onde  $F$  representa a força necessária para manter a configuração atual,  $\hat{t}_i$  representa a direção do  $i$ -ésimo segmento e  $\hat{z}$  representa a direção de estiramento da molécula. Como  $\hat{t}_i$  e  $\hat{z}$  são unitários, (A.1) pode ser reescrita como

$$E_{FJC} = -Fb \sum_{i=1}^N \cos \theta_i, \quad (\text{A.2})$$

onde  $\theta_i$  é o ângulo entre o  $i$ -ésimo segmento e a direção de estiramento  $\hat{z}$ .

$Z$  será então

$$\begin{aligned} Z &= \sum_{\hat{t}_i} \exp\left(\frac{-E_{FJC}}{k_b T}\right) = \sum_{\hat{t}_i} \prod_{i=1}^N \exp\left(\frac{Fb \cos \theta_i}{k_b T}\right) \\ &= \left[ \int d\Omega \exp\left(\frac{Fb \cos \theta}{k_b T}\right) \right]^N = \left[ \frac{2\pi k_b T}{Fb} \sinh \frac{Fb}{k_b T} \right]^N. \end{aligned} \quad (\text{A.3})$$

A energia livre  $\mathcal{F}$  será

$$\mathcal{F} = -k_b T N \ln \left[ \frac{2\pi k_b T}{Fb} \sinh \frac{Fb}{k_b T} \right]. \quad (\text{A.4})$$

O valor de  $F$  pode ser obtido calculando-se  $-\frac{\partial \mathcal{F}}{\partial F}$ , que equivale ao estiramento  $z$  para um dado valor de  $F$ .

$$z = -\frac{\partial \mathcal{F}}{\partial F} = Nb \left[ \coth \frac{Fb}{k_b T} - \frac{k_b T}{Fb} \right] \quad (\text{A.5})$$

Para conformações próximas ao equilíbrio,  $F \rightarrow 0$ . Expandindo (A.5) em série em torno de  $F = 0$  temos

$$z = \frac{Nb^2}{3k_b T} F + \mathcal{O}(F^3) \quad (\text{A.6})$$

No limite contínuo, onde  $Nb = L$  e  $Nb^2 = \langle R^2 \rangle = 2AL$ ,  $F$  pode ser escrita como

$$F = \frac{3k_b T}{2A} \frac{z}{L} \quad (\text{A.7})$$

## Apêndice B

# Cálculo de $\langle R^2 \rangle$ na Configuração de Equilíbrio

A função de autocorrelação para  $\hat{u}(s)$  é dada por

$$\langle \hat{u}(s) \cdot \hat{u}(0) \rangle = \exp \left[ \frac{-s}{A} \right]. \quad (\text{B.1})$$

O valor de  $\langle R^2 \rangle$  na configuração de equilíbrio é calculado a partir de (B.1), avaliada nas extremidades da molécula.

$$\begin{aligned} \langle R^2 \rangle &= \langle (R(L) - R(0))^2 \rangle = \int_0^L ds \int_0^L ds' \langle \hat{u}(s) \cdot \hat{u}(0) \rangle \\ &= 2 \int_0^L ds \int_0^s ds' \exp \left( -\frac{(s-s')}{A} \right) = 2AL - 2A^2 \left[ 1 - \exp \left( \frac{-L}{A} \right) \right] \end{aligned} \quad (\text{B.2})$$

Se  $(L \gg A)$ ,  $\exp \left( \frac{-L}{A} \right) \rightarrow 0$  e

$$\langle R^2 \rangle \approx 2AL \quad (\text{B.3})$$

Se  $(L \ll A)$ ,  $\exp \left( \frac{-L}{A} \right) \rightarrow 1 - L/A + L^2/2A^2 - \mathcal{O}(L/A)^3$  e

$$\langle R^2 \rangle \approx L^2 \quad (\text{B.4})$$

## Apêndice C

### Cálculo do Valor Médio de $|\vec{u}_\perp|^2$

A energia de cada modo normal é dada por

$$E = \frac{k_b T}{2} \left( Aq^2 + \frac{F}{k_b T} \right) |\tilde{u}_i(q)|^2. \quad (\text{C.1})$$

O valor médio de  $|\tilde{u}_i(q)|^2$  para cada modo é calculado a partir da energia E e da função de partição Z, dada por

$$\begin{aligned} Z &= \int \exp\left(-\frac{E}{k_b T}\right) d|\tilde{u}_i| = \int \exp\left[-\frac{1}{2} \left( Aq^2 + \frac{F}{k_b T} \right) |\tilde{u}_i|^2\right] d|\tilde{u}_i| \\ &= \sqrt{\frac{2\pi k_b T}{Aq^2 k_b T + F}}. \end{aligned} \quad (\text{C.2})$$

$$\begin{aligned} \langle |\tilde{u}_i(q)|^2 \rangle &= \frac{\int |\tilde{u}_i|^2 \exp\left(-\frac{E}{k_b T}\right) d|\tilde{u}_i|}{Z} = \frac{\int |\tilde{u}_i|^2 \exp\left(-\frac{E}{k_b T}\right) d|\tilde{u}_i|}{\sqrt{\frac{2\pi k_b T}{Aq^2 k_b T + F}}} \\ &= \frac{\int |\tilde{u}_i|^2 \exp\left[-\frac{1}{2} \left( Aq^2 + \frac{F}{k_b T} \right) |\tilde{u}_i|^2\right] d|\tilde{u}_i|}{\sqrt{\frac{2\pi k_b T}{Aq^2 k_b T + F}}} = \frac{k_b T}{Aq^2 k_b T + F} \end{aligned} \quad (\text{C.3})$$

O valor médio de  $|\vec{u}_\perp|^2$  pode ser então calculado integrando-se o valor médio de  $|\tilde{u}_i(q)|^2$  sobre todos os modos e multiplicando o resultado por um

fator 2, que corresponde às duas componentes ( $\hat{x}$  e  $\hat{y}$ ) de  $\vec{u}_\perp$ . Desta forma, obtemos finalmente

$$\langle |\vec{u}_\perp|^2 \rangle = 2 \int \frac{dq}{2\pi} \langle |\tilde{u}_i(q)|^2 \rangle = 2 \int \frac{dq}{2\pi} \left( \frac{k_b T}{Aq^2 k_b T + F} \right) = \sqrt{\frac{k_b T}{FA}}. \quad (\text{C.4})$$

# Bibliografia

- [1] MIRSKY, A.E. *The Discovery of DNA*. Scientific American, 218, 78-88, 1968.
- [2] FRUTON, J.S. *Molecules and Life: Historical Essays on the Interplay of Chemistry and Biology*. Wiley-Interscience, New York, 1972.
- [3] AVERY, O.T., MACLEOD, C.M., MCCARTY, M. *Induction of Transformation by a Deoxyribonucleic Acid Fraction Isolated from Pneumococcus Type III*. Journal of Experimental Medicine, 79, 137-158, 1944.
- [4] GRIFFITH, F. *The Significance of Pneumococcal Types*. Journal of Hygiene, 27, 141-144, 1928.
- [5] HERSHEY, A.D., CHASE, M. *Independent Functions of Viral Protein and Nucleic Acid in Growth of Bacteriophage*. Journal of General Physiology, 36, 39-56, 1952.
- [6] WATSON, J.D., CRICK, F.H.C. *Molecular Structure of Nucleic Acids; A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid*. Nature, 171, 737-738, 1953.
- [7] WATSON, J.D., CRICK, F.H.C. *Genetical Implications of the Structure of Deoxyribonucleic Acid*. Nature, 171, 964-967, 1953.
- [8] STRYER, L. *Biochemistry* W.H. Freeman and Company, New York, 4th edition - 1995. Chapters 4, 5, 31, 33 and 34.
- [9] LEVENE, P.A., BASS, L.W. *Nucleic Acids*. American Chemical Society Monograph Series, New York: Chemical Catalog Company, 1931.

- [10] CHARGAFF, E., VISCHER, E.M., DONIGER, R., GREEN, C., MISANI, F. *The Composition of the Desoxypentose Nucleic Acids of Thymus and Spleen*. Journal of Biological Chemistry, 177, 405-416, 1949.
- [11] DOI, M., EDWARDS, S.F. *The Theory of Polymer Dynamics*. Oxford University Press, New York, 1986. Chapters 1, 2 (*sections 2.1-2.2*) and 8 (*section 8.8*).
- [12] STRICK, T., ALLEMAND, J.-F., CROQUETTE, V., BENSIMON, D. *Twisting and Stretching Single DNA Molecules*. Progress in Biophysics & Molecular Biology, 74, 115-140, 2000.
- [13] MARKO, J.F., SIGGIA, E.D. *Stretching DNA*. Macromolecules, 28, 8759-8770, 1995.
- [14] WANG, M.D., YIN, H., LANDICK, R., GELLES, J., BLOCK, S.M. *Stretching DNA With Optical Tweezers*. Biophysical Journal, 72, 1335-1346, 1997.
- [15] SHIVASHANKAR, G.V., FEINGOLD, M., KRICHEVSKY, O., LIBCHABER, A.J. *RecA Polymerization on Double-Stranded DNA by Using Single-Molecule Manipulation: The Role of ATP Hydrolysis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 7916-7921, 1999.
- [16] BUSTAMANTE, C., MARKO, J.F., SIGGIA, E.D. *Entropic Elasticity of  $\lambda$ -phage DNA*. Science, 265, 1599-1600, 1994.
- [17] ASHKIN, A. *Optical Trapping and Manipulation of Neutral Particles Using Lasers*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 4853-4860, 1997.
- [18] ALLEMAND, J.-F., BENSIMON, D., JULLIEN, L., BENSIMON, A., CROQUETTE, V. *pH-Dependent Specific Binding and Combing of DNA*. Biophysical Journal, 73, 2064-2070, 1997.
- [19] BERNS, M.W. *Laser Scissors and Tweezers*. Scientific American, 278, 52-57, 1998.

- [20] SHIVASHANKAR, G.V., STOLOVITZKY, G., LIBCHABER, A.J. *Backscattering from a Tethered Bead as a Probe of DNA Flexibility.* Applied Physics Letters, 73, 3, 291-293, 1998.
- [21] SMITH, S.B., CUI, Y., BUSTAMANTE, C. *Overstretching B-DNA: The Elastic Response of Individual Double-Stranded and Single-Stranded DNA Molecules.* Science, 271, 795-799, 1996.
- [22] DE GENNES, P.-G. *Scaling Concepts in Polymer Physics.* Cornell University Press, 4th print - 1991. Chapter I, (*sections I.1 and I.2*).
- [23] FEITOSA, M.I.M., MESQUITA, O.N. *Wall-drag Effect on Diffusion of Colloidal Particles Near Surfaces: A Photon Correlation Study.* Physical Review A, 44, 10, 6677-6685, 1991.
- [24] FAUCHEUX, L.P., LIBCHABER, A.J. *Confined Brownian Motion.* Physical Review E, 49, 6, 5158-5163, 1994.