

Universidade Estadual Paulista
Instituto de Biociência, Letras e Ciências Exatas
Campus de São José do Rio Preto

Dissertação de Mestrado

A influência do peso molecular do PEG na transição- Ψ multimolecular do DNA

Aluno- José Ésio Bessa Ramos Jr.

Orientador: João Ruggiero Neto

13 de Maio de 2004

São José do Rio Preto - SP

Índice

	Páginas
Introdução	1-8
Capítulo 1- Sobre o estudo dos cristais líquidos utilizando a técnica de dicroísmo circular(CD).	9-11
Capítulo 2- Sobre a inserção do DNA no estado disperso na solução do polímero flexível(PEG).	12-17
Capítulo 3- Sobre a inserção do DNA no estado condensado na so- lução do polímero flexível(PEG).	18-26
Capítulo 4- Materiais e métodos.	27-29
Capítulo 5- Resultados e discussão	30-44
Capítulo 6- Conclusões	45-46
Apêndice 1- A espectroscopia de dicroísmo circular e os cristais lí- quidos na mesofase colestérica.	47-51
Apêndice 2- Um modelo simples de dois estados para a transição-y do DNA.	52-53
Apêndice 3- A relação de Gibbs-Duhem e o estresse osmótico.	54-56
Referências Bibliográficas	

Aos meus queridos pais:
José Ésio Bessa Ramos e
Maria de Fátima N. Bessa Ramos.

“ Constrói-se uma ciência com fatos da
mesma forma que se constrói uma casa com

tijolos; mas, assim como um amontoado de tijolos não é uma casa, um amontoado de fatos não é uma ciência.”

Henri Poincaré, 1854-1912

INTRODUÇÃO

Numa célula humana diplóide, o comprimento de contorno(L) do DNA pode chegar a 1 metro, isso é, se esticarmos totalmente o material genético do núcleo da célula e medirmos sua extensão de uma ponta à outra, encontraremos um comprimento próximo ao valor acima referido. Surpreendentemente, a célula desenvolveu um mecanismo eficiente, em que essa quantidade enorme de material é “empacotada” e armazenada funcionalmente em dimensões da ordem de 10^{-6} m , que são as dimensões do núcleo celular (Grosberg e Khokhlov, 1997). Dessa forma, o DNA é levado de uma condição de baixa densidade numérica de segmentos da cadeia e elevado raio de giro (R_g) para uma forma compacta com R_g compatível com as dimensões do compartimento celular onde essa macromolécula fica armazenada e, de lá, comanda todo o maquinário celular.

O “problema” da armazenagem do material genético não fica restrito às células eucarióticas. Em bacteriófagos, vírus que infectam bactérias, existe uma situação semelhante e a figura 1 nos proporciona uma imagem clara das ordens de grandezas envolvidas no processo de condensação do DNA.

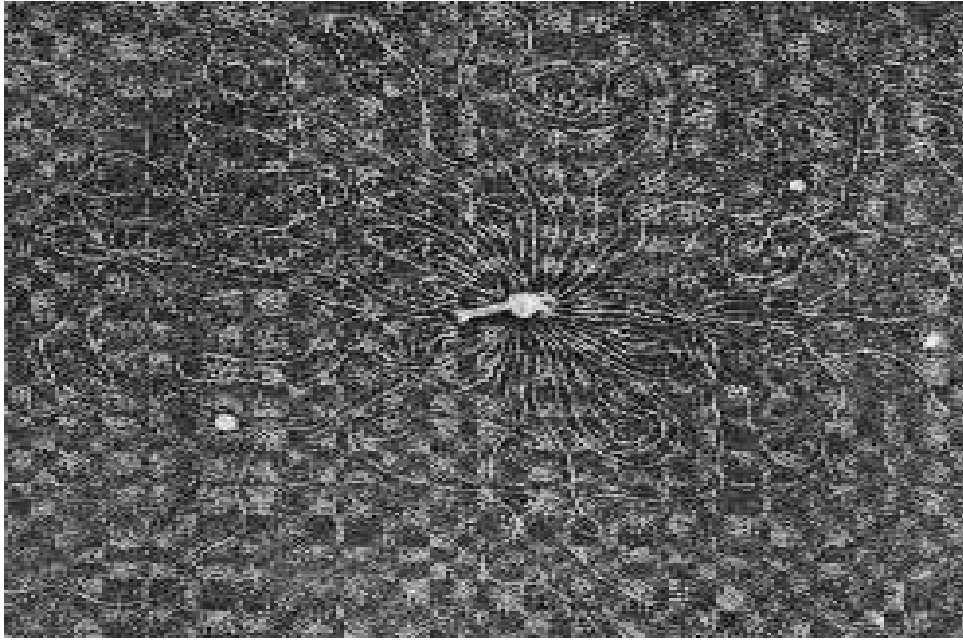


Figura 1- DNA de um fago que foi liberado do capsídio após um choque osmótico. (Figura retirada de Biochemistry, Voet, D., Voet, J.D., 2ª Edição- Editora J.Willey, Nova York. Pg 861).

Na figura 1, podemos observar o DNA de um bacteriófago (aparece na fotografia como um emaranhado filamentososo em volta do vírus) depois de sofrer um choque osmótico. Toda a molécula do DNA viral estava empacotada no capsídio, que aparece no centro da figura. A imagem sugere que o DNA deva passar por um drástico rearranjo conformacional para ser reintroduzido no interior do capsídio e acomodar-se em dimensões tão diminutas.

O processo de condensação do DNA pode, contudo, ser estudado de uma maneira simplificada *in vitro*. Em 1971, Lerman descobriu que o DNA de um fago sofre alterações consideráveis na sua conformação quando se encontra em solução aquosa e na presença de concentrações adequadas de polietilenoglicol (de maneira abreviada, PEG) e de sal (NaCl). Estudos de sedimentação levaram-no à conclusão de que o DNA havia sofrido uma transição de uma conformação estendida em solução para uma forma altamente compacta, com coeficiente de sedimentação próximo ao do próprio fago (Lerman, 1971).

Lerman determinou ainda valores críticos de concentração do polímero e do sal para que tal tipo de alteração hidrodinâmica ocorresse: abaixo de determinados valores críticos a transição não ocorria. Esses estudos centraram-se em torno de um tipo particular de condensação do DNA: um colapso intramolecular, no qual uma molécula única de DNA, de elevado peso molecular (da ordem de 160.000 pares de base), transita de uma forma estendida em solução para uma forma compacta, com uma redução drástica do volume ocupado em solução. Esse tipo de transição, que acontece na presença de concentrações adequadas de sal e polímero neutro, foi denominada transição-**psi**: transição induzida por polímero e sal (acrônimo para a designação inglesa: **polymer and salt induced transition** ou mais simplesmente **transição- ψ** (Lerman,1973). A figura 2 ilustra a mudança conformacional envolvida em tal tipo de transição (Fonte:<http://www.fenk.wau.nl/~devries/>) .

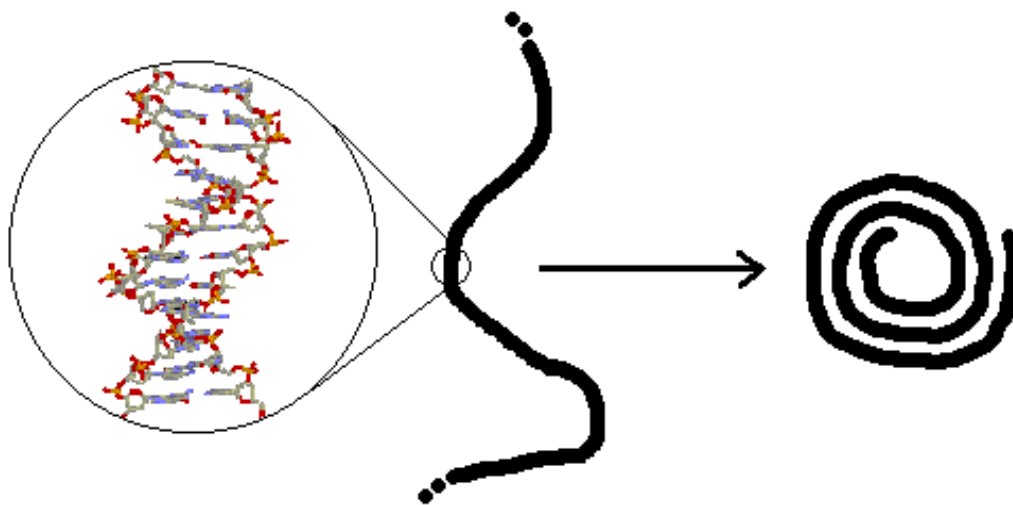


Figura 2- Ilustração da transição- ψ monomolecular para o DNA.

Já no seu trabalho original, Lerman conjecturou que esse tipo de alteração poderia ser entendida a partir da separação de fases entre o polímero indutor da condensação e o DNA. Essa separação aconteceria nos valores críticos de concentração do polímero e esse, uma vez excluído da região ocupada pelo DNA, executaria o trabalho de empacotar a molécula via pressão osmótica (Lerman,1971; Vasilevskaya et al,1995). A possibilidade de formação de complexo entre o polímero usado e o DNA foi excluída a partir de experimentos usando poliacrilato como agente indutor. Em condições nas quais esse polímero estava fortemente ionizado com uma carga líquida negativa, foram encontradas alterações semelhantes no DNA. Visto que a complexação entre o DNA (que possui carga negativa devido à presença dos grupos fosfato) e um outro polímero fortemente carregado com carga de mesmo sinal não parece possível, essa explicação parece injustificada.

A partir desses estudos iniciais, uma série de outros agentes indutores de condensação e de novas técnicas para estudá-la foram pesquisados. Dentre os agentes capazes de provocar condensação, descobriu-se que poliaminas de ocorrência natural (espermidina⁺³, espermina⁺⁴), o cátion inorgânico $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{+3}$ (hexaquocobalto III) e o íon bivalente Mn^{2+} podiam induzir a condensação do DNA em solução aquosa à temperatura ambiente (Bloomfield,V.A.,1996). Uma característica é comum a todos esses agentes químicos: sua carga positiva responsável pela blindagem da carga negativa dos grupos fosfatos do DNA. Dessa forma, a repulsão entre os segmentos de uma molécula de DNA é bastante atenuada, apesar de esse não ser o único fator responsável pelo processo de condensação. Os indutores de condensação, além de modificarem a interação eletrostática, promovem a condensação pela exclusão de volume acessível ao DNA, pela alteração da interação DNA-solvente, pela redução da atividade de água, por provocar distorção ou curvatura ao longo da dupla hélice ou ainda por uma cooperação de todos esses fatores.(Bloomfield, V. A.,1996)

Um novo conjunto de técnicas também foi desenvolvido desde então. Técnicas que detectam mudanças nas dimensões e na quiralidade do DNA em solução têm sido usadas para estudar esse processo, entre elas estão as várias formas de microscopia eletrônica, espalhamento de luz, viscosimetria, espectroscopia de dicroísmo linear e de dicroísmo circular (Bloomfield, V.A., 1996) e a microscopia de fluorescência, sendo que esta permite observar o colapso de uma molécula isolada de DNA (Minagawa et al, 1994).

No estudo desenvolvido neste trabalho, as dimensões das moléculas de DNA não favorecem colapsos monomoleculares (ou condensações internas), como ilustrado na figura 2. Ao contrário, os dados experimentais aqui apresentados e o modelo teórico utilizado para analisá-los dizem respeito à colapsos multimoleculares (ou condensações externas), nos quais várias moléculas de DNA se associam num tipo de ordem conhecida como líquido-cristalina, pois as moléculas de DNA dentro dessas estruturas não guardam um posicionamento fixo, como nos cristais ordinários, todavia não apresentam uma estrutura isotrópica como nos líquidos. Esse tipo de ordenamento gera propriedades ópticas que permitem verificar a anisotropia da amostra e assim proceder com um estudo sistemático das várias texturas líquido-cristalinas (Blumstein, A., 1978). A figura 3 ilustra o empacotamento do DNA após o colapso multimolecular ou condensação externa. Nessa figura, cada aresta das faces laterais do hexágono representa uma molécula de DNA, estando uma molécula central “presa” dentro da célula hexagonal. É importante ressaltar dois fatores: (1) em virtude da agitação térmica, as moléculas possuem ondulações (não representadas nessa figura) que têm como efeito líquido incrementar a repulsão eletrostática existente entre elas;

(2) os cristais-líquidos não possuem a ordem posicional (pelo menos as mesofases colestéricas) sugerida na figura, pelo contrário, as moléculas possuem uma larga liberdade translacional e flutuações conformacionais, podendo as moléculas passarem de uma célula hexagonal para outra (Podgornik et al,1995). A blindagem dos fosfatos pelos contra-íons e a pressão osmótica causada pelo polímero(PEG) mantém o arranjo da estrutura.

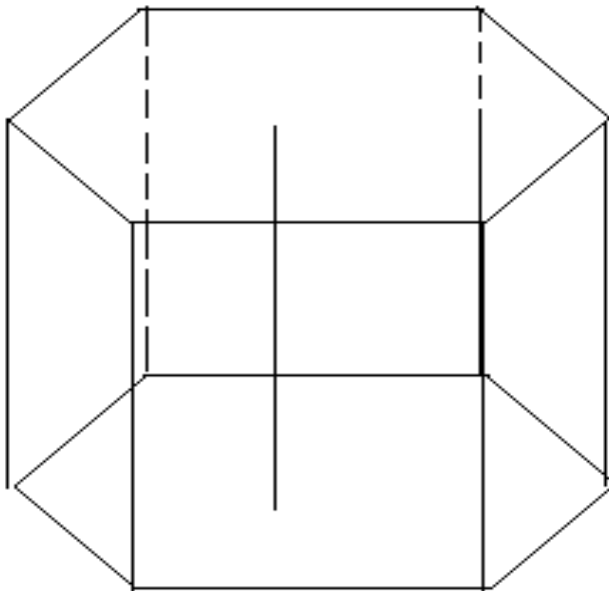


Figura 3- Arranjo hexagonal das moléculas de DNA após a condensação externa ou multimolecular.

Uma figura mais realística do posicionamento das moléculas de DNA na mesofase colestérica pode ser vista na figura 4. Nela são visíveis as flutuações conformacionais(ondulações) características dessa fase, embora a ordem orientacional característica desse regime não seja perceptível (é esse ordenamento orientacional que confere à estrutura condensada a anisotropia óptica que será discutida mais detalhadamente no capítulo seguinte).

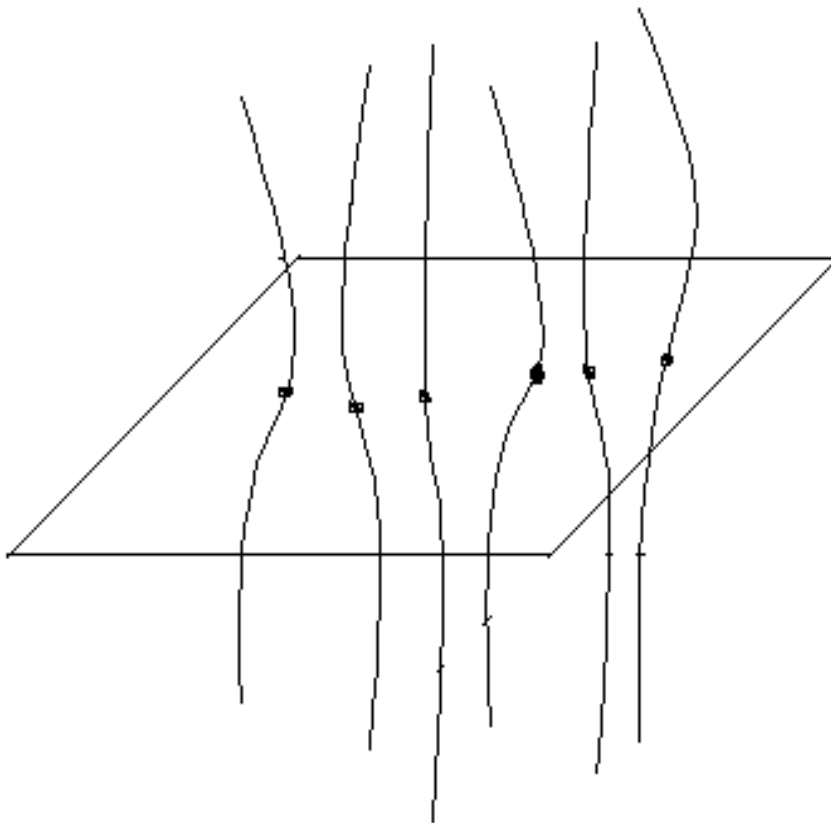


Figura 4-Flutuações conformacionais características da mesofase colestérica que impedem o ordenamento cristalino ordinário.

Na figura 4 percebe-se a ampla liberdade conformacional das cadeias de DNA dentro da estrutura condensada. Em regimes de alta densidade essa liberdade tende a ser reduzida. Medidas do espaçamento interaxial em amostras de DNA condensado sob diversos valores de pressão osmótica (portanto, em condensados de diferentes densidades) através de difração de raios-X permitem um mapeamento completo da energética da transição, i.e, construir gráficos da força aplicada contra a separação entre as moléculas de DNA (Rau.,1984; Rau et al., 1992; Podgornik et al,1995). Estudos teóricos que enfatizam às características geométricas dos condensados (Ubink et al., 1995) e estudos experimentais das diversas texturas líquido-cristalinas em diferentes regimes de concentração do DNA usando microscopia de polarização e microscopia eletrônica para sua caracterização foram realizados(Rill.,1986; Leforestier et al.,1997).

Poucos trabalhos, contudo, foram feitos no sentido de formalizar um modelo para a transição- ψ multimolecular do DNA, capazes de fornecer, por exemplo, a concentração crítica do polímero indutor da condensação em função da concentração do sal. Mais escassos ainda são os dados experimentais referentes aos diagramas de fase dessa transição.

O presente trabalho, portanto, tem como objetivo avaliar as concentrações críticas do polímero(PEG) indutor da condensação em função da concentração do sal NaCl, para transição- ψ multimolecular, ou seja, a construção dos diagramas de fase dessa transição, utilizando como técnica experimental básica a espectroscopia de dicroísmo circular e confrontá-los com um modelo teórico recentemente proposto para a transição- ψ .

Capítulo 1

Sobre o estudo dos cristais líquidos utilizando a técnica do Dicroísmo Circular(CD).

O estudo das macromoléculas biológicas por meio do CD consiste essencialmente em medir a diferença de absorvância entre os dois estados possíveis de polarização circular da luz, ou seja, entre os estados com polarização circular à direita e à esquerda (Apêndice 1). Usualmente, essa diferença é muito pequena, cerca de 0.001(van Holde, K. E.,1998); mas quando a macromolécula passa a fazer parte de um agregado que tem dimensões da ordem de grandeza do comprimento de onda da luz utilizada no experimento de dicroísmo, essa diferença pode ser de 10 à 1000 vezes maior que o CD da molécula dispersa (Bustamante et al, 1991). Uma outra alteração visível nesse espectro “anômalo” é o aparecimento de sinal de CD fora da região de absorção da molécula. A intensidade desse sinal pode chegar a uma fração considerável da intensidade do sinal dentro da banda de absorção.

Na figura 5 são mostrados os espectros de CD do DNA no estado disperso e no estado condensado. O espectro não conservativo, que possui área total, limitada pela curva, diferente de zero, corresponde ao espectro do DNA na fase condensada. O espectro conservativo, com picos de absorção centrados em 275 nm e 240 nm, representa o espectro de dicroísmo circular para o DNA na fase dispersa e na conformação canônica B como 10.4 pares de base por giro completo da dupla hélice.

A origem do sinal de CD fora da região de absorção se deve ao espalhamento preferencial de um dos estados de polarização da luz. Esse sinal anômalo está presente nos espectros de CD de agregados quirais de dimensões da ordem de grandeza do comprimento de onda da luz incidente e são eliminados do espectro quando se faz a correção devido ao espalhamento da luz. Já o sinal de CD dentro da região de absorção não pode ser corrigido levando-se em conta a luz espalhada (Keller et al, 1985).

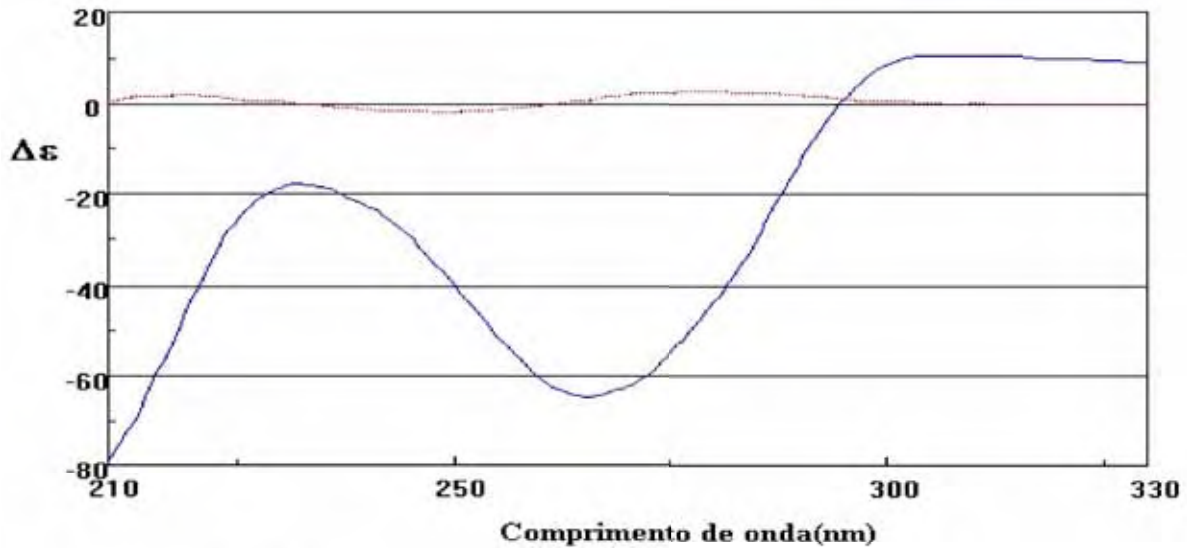


Figura 5: Espectros de CD do B-DNA na fase dispersa(curva marrom) e na fase- ψ (curva azul). A fase condensada foi obtida pela adição de PEG 8000 (15% em massa) e NaCl (0.5M).

Dessa forma, a diferença entre os coeficiente de extinção molar ($\Delta\epsilon = \epsilon_E - \epsilon_D$) deve ser escrita como: $\epsilon_E - \epsilon_D = a_E - a_D + e_E - e_D$, sendo $a_E - a_D$ a diferença entre os coeficientes de absorção para os dois estados de polarização da luz e $e_E - e_D$ a diferença entre os coeficientes de espalhamento. Esse termo é diferente de zero e é o responsável pelo sinal fora da região de absorção.

O espectro de CD com anomalia do tipo- ψ é característico dos cristais líquidos na mesofase colestérica, estruturas nas quais as moléculas do polímero não possuem ordem posicional cristalina, mas possuem uma ordem orientacional. A figura 6 ilustra a disposição das moléculas de DNA no interior do cristal líquido na mesofase colestérica. Diferentemente das estruturas smética e nemática, as moléculas do polímero nos cristais líquidos na mesofase colestérica possuem uma disposição peculiar que lhes confere uma propriedade ótica marcante: a absorção seletiva de um dos estados de polarização da luz circularmente polarizada(Blunstein, A., 1978).

Essa ordem orientacional é caracterizada pelo fato de o eixo central das moléculas mudar continuamente de direção dentro da amostra. Isso acarreta um giro em torno do eixo perpendicular ao eixo principal das moléculas, como ilustrado na figura 6. Se o passo dessa estrutura helicoidal (seria uma espécie de estrutura terciária para as moléculas de DNA: uma hélice intrínseca, fazendo parte de sua estrutura secundária e uma hélice supramolecular caracterizando “sua estrutura terciária”) coincide com o comprimento de onda da luz circularmente polarizada que atravessa a amostra, no mesmo sentido do giro do campo elétrico (para direita ou para a esquerda) e os cromóforos não oscilam independentemente uns dos outros, havendo um acoplamento entre eles, ocorrerá a absorção seletiva de uma das componentes da luz incidente, originando o fenômeno do dicroísmo circular do tipo- ψ (Apêndice 1).

Uma outra consequência da ordem orientacional nas mesofases colestéricas é a presença de birrefringência, ou seja, o índice de refração depende da direção dentro do condensado (Blunstein, A., 1978).

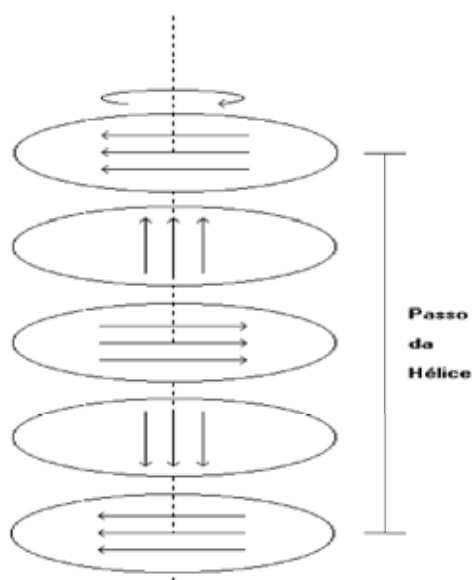


Figura 6- Disposição das moléculas de DNA no interior do cristal líquido na mesofase colestérica.

Capítulo 2

Sobre a inserção do DNA no estado disperso na solução do polímero flexível(PEG).

Recentemente, foi proposto um modelo para a formação de cristais líquidos de DNA na presença de sal monovalente e de um polímero flexível (de Vries, 2001). Seguindo a abordagem de de Vries, podemos obter o diagrama de fase da transição- ψ do DNA comparando as energias livres de inserção do DNA numa solução de polímero flexível. Mais especificamente, comparando as energias livres de transferência do DNA de uma solução diluída desse polímero (considerada como estado de referência para o cálculo do trabalho de inserção) para uma solução contendo o polímero flexível e o sal monovalente. **Dessa forma, o DNA pode ser inserido tanto na forma dispersa, quanto na forma condensada (fase $-\psi$)**

Quando as energias livres de Gibbs de inserção do DNA, nos seus dois estados conformacionais possíveis (disperso e condensado), na solução do polímero flexível forem iguais, estaremos dentro da região de transição, obtendo os valores críticos de concentração do polímero flexível (PEG) e do sal monovalente (NaCl). **Enfatizamos mais uma vez, o estado de referência para se calcular o trabalho realizado nos dois casos e uma solução diluída do polieletrólito.**

2.1- Sobre a inserção do DNA no estado disperso numa solução do polímero flexível:

A energia de inserção do DNA em seu estado disperso ou livre numa solução contendo PEG equivale ao trabalho para inserir um cilindro de raio a (raio do polieletrólito) e comprimento de contorno L numa solução diluída ou, eventualmente, semidiluída do polímero flexível. Em ambos os casos, o trabalho dominante é o trabalho osmótico:

$$F_{\text{ins}} \sim \Pi_{\text{osm}} a^2 L, \quad (1)$$

na qual Π_{osm} é a pressão osmótica da solução contendo o polímero flexível, a é o raio da molécula de DNA e L o seu comprimento de contorno. A energia livre por unidade de comprimento ($F_{\text{ins}} / L = f_{\text{ins}}$) será então:

$$f_{\text{ins}} \sim \Pi_{\text{osm}} a^2 \quad (2)$$

Esse é o trabalho realizado para depletar (afastar) as moléculas do polímero (PEG) do volume ocupado pelo DNA. Esse trabalho é completamente análogo à compressão das moléculas de um gás ideal por um pistão deslocando um volume igual ao volume da molécula de DNA (Van't Hoff, J.H., 1887). (Observação-Todas as energias livre serão referidas à unidade de comprimento).

O símbolo “ \sim ” significa dizer que a grandeza dependente, nesse caso, a energia livre, varia (escala) com a pressão osmótica de maneira linear e com o raio do DNA de maneira quadrática, ignorando-se assim os coeficientes numéricos que aparecem antes dessas variáveis.

Dessa forma, essas e todas as outras energias calculadas diferem do seu valor exato por um coeficiente numérico de ordem de grandeza unitária(de Gennes,1979).

O regime de concentração do polímero flexível pode ser tanto o diluído quando o semidiluído. Nesses dois casos a pressão osmótica da solução pode ser dada em função da fração em massa do polímero em solução.

Para o caso diluído:

$$\Pi_{osm} = (c/N) kT, \quad (3)$$

sendo c o número de monômeros por unidade de volume em solução, N o número de monômeros numa molécula do polímero flexível (índice de polimerização ou grau de polimerização, que é obtido dividindo-se o peso molecular do polímero pelo peso molecular de sua unidade repetitiva) e, portanto, c/N é o número de moléculas do polímero flexível por unidade de volume. Podemos reescrever a pressão osmótica em termos da fração do volume do polímero flexível, reconhecendo que

$$w \sim c l_k^3 \quad (4)$$

Dessa forma, a pressão osmótica em função da fração do volume do PEG:

$$\Pi_{osm} \sim (w/N \cdot l_k^3) kT, \quad (5)$$

na qual w é a fração do volume do polímero flexível e l_k é o segmento efetivo do polímero flexível(segmento de Kuhn).

A energia livre de inserção por unidade de comprimento de uma molécula de DNA em seu estado livre numa solução diluída do polímero flexível, portanto, escala com:

$$f_{ins} \sim (w \cdot a^2 / N l_k^3) kT. \quad (6)$$

Para o caso semidiluído, a pressão osmótica é dada por:

$$\Pi_{osm} = kT / \xi^3, \quad (7)$$

na qual ξ é o comprimento de correlação do polímero semi-flexível ($\xi = l_k w^{-3/4}$, sendo uma medida da distância média entre as cadeias entrelaçadas do PEG no regime semidiluído)

A energia livre de inserção do polieletrólito numa solução semidiluída do polímero flexível é dada por:

$$f_{ins} \sim (w^{9/4} a^2 / l_k^3) kT. \quad (8)$$

Os casos acima se referem à inserção do cilindro cujo raio a é muito maior que o raio de giro R_g do polímero flexível ($a \gg R_g$), de maneira que o DNA não pode penetrar o domínio do PEG.

Contudo, se $a \ll R_g$ o polieletrólito pode invadir o domínio do PEG, o que modifica consideravelmente as energias livres acima referidas.

Nos casos em que o raio do cilindro é muito menor do que as dimensões características do polímero flexível, ou seja, $a \ll R_g$, a energia de inserção pode ser calculada seguindo-se um raciocínio de de Gennes para a inserção de pequenas esferas de raio $a \ll R_g$ (de Gennes, 1979)

$$f_{ins} \sim (a / R_g)^{4/3} kT \quad (9)$$

sendo a é o raio da esfera.

O passo seguinte é considerar o cilindro como uma cadeia de pequenas esferas de raio a conectadas entre si. O número de esferas é dado por:

$$n = L/2a \quad (10)$$

Multiplicando-se a (Eq 9) pela (Eq 10), o que equivale a inserir n esferas completamente no interior do polímero flexível, obteremos a seguinte energia de inserção por unidade de comprimento para o cilindro de DNA :

$$f_{\text{ins}} \sim (a^{1/3} / R_g^{4/3}) kT \quad (11)$$

O valor final da energia de inserção é obtido multiplicando-se a equação anterior pela fração do volume do polímero flexível ($c R_g^3 / N$); logo:

$$f_{\text{ins}} \sim (a^{1/3} \cdot R_g^{5/3}) c kT / N \quad (12)$$

As considerações acima foram feitas para a inserção do polieletrólito na condição de que $a \ll R_g$, numa solução diluída do PEG.

Para o caso de uma solução semidiluída do polímero flexível, o comprimento de correlação ξ substitui o raio de giro na equação 11. Logo:

$$f_{\text{ins}} \sim a^{1/3} / \xi^{4/3} kT, \quad (13)$$

Em termos da fração do volume do polímero flexível $w \sim c l_k^3$, as eq. 12 e 13 são reescritas como :

$$f_{ins} \sim (w \cdot a^{1/3} / l_k^{4/3}) kT. \quad (14)$$

Uma fórmula de interpolação para a energia livre de inserção para proteínas globulares em polímeros semiflexíveis neutros foi recentemente proposta por Sear(Sear,1997). Seguindo o mesmo procedimento, a energia livre de inserção do DNA em um polímero flexível é dada pela soma dos dois regimes assintóticos expressos pelas equações 6,8 e 14 (regime diluído e regime semidiluído do polímero flexível).

Dessa forma:

$$f_{ins} \sim \mu_1 w + \mu_2 w^{9/4} \quad (15)$$

com as seguintes estimativas para os fatores pré-numéricos:

$$\mu_1 \sim a^{1/3} / l_k^{4/3} (1 + (a/l_k)^{5/3} / N) kT \quad (16)$$

$$\mu_2 \sim (a^2 / l_k^3) kT \quad (17)$$

Quando $w \rightarrow 0$, ou seja, quando estamos no regime diluído de concentração do polímero flexível, predomina na energia livre de inserção o primeiro termo da eq.15. No regime semidiluído (quando $w^* < w < 1$) predomina o segundo termo dessa equação.

Sobre a inserção do DNA no estado condensado na solução do polímero flexível(PEG).

A energia livre de inserção do condensado (considerando-se o mesmo estado de referência que a inserção do DNA em seu estado livre, ou seja, uma solução diluída do polieletrólito):

$$f_{ins} = f_{osm} + f_{emp} \quad (18)$$

Na equação anterior, a energia livre de inserção do condensado é separada em duas componentes:

- a) A componente osmótica (f_{osm}) de inserção do condensado na solução do polímero flexível (PEG), visto que o condensado, ao ser inserido, desloca as moléculas do soluto para que a sua estrutura possa ocupar aquele volume físico na solução.
- b) A componente de empacotamento ou de aproximação das moléculas do DNA dentro do condensado que é predominantemente eletrostática (f_{emp}).

A contribuição osmótica para a inserção do condensado é calculada analogamente à da inserção do DNA no estado livre feita no capítulo anterior, ou seja, a pressão osmótica vezes o volume da estrutura do condensado:

18

$$F_{osm} = \Pi_{osm} V_{condensado}, \quad (19)$$

na qual Π_{osm} é a pressão osmótica criada na solução devido à presença do polímero flexível (PEG) e $V_{condensado}$ é o volume do condensado de DNA.

Como já foi dito, a estrutura do condensado que é compatível com o espectro de CD do tipo- ψ , é a estrutura de cristal líquido, tendo as moléculas do condensado

os seus eixos dispostos paralelamente dentro do cristal. Somente dessa forma gera-se a diferença experimentalmente constatada entre as absorções da luz com polarização circular à direita e à esquerda.

O volume de cada célula da “estrutura cristalina” é então:

$$V_{\text{condensado}} = \mu_3 d^2 L \quad (20)$$

,na qual d é a distância eixo à eixo entre duas moléculas vizinhas de DNA dentro da estrutura do condensado, L é o comprimento de contorno da molécula de DNA e μ_3 é uma constante.

Sabe-se, por difração de raios-X, que a estrutura líquido–cristalina do DNA dentro do condensado é compatível com um arranjo hexagonal, estando as moléculas de DNA dispostas nos vértices do cristal de maneira que as suas cadeias sejam aproximadamente paralelas. Nesse caso, o valor de $\mu_3 = 3^{1/2} / 2$. A figura 3 ilustra o arranjo hexagonal das cadeias de DNA no interior do condensado.

A componente osmótica da energia livre de inserção do condensado na solução contendo o polímero flexível é (por unidade de comprimento) dada por:

$$f_{\text{osm}} = \mu_3 \Pi_{\text{osm}} d^2 \quad (21)$$

Utilizando-se a expressão empiricamente obtida por Parsegian (Parsegina et

al,1995) para a pressão osmótica em função do percentual em massa do polímero flexível, pode-se calcular o trabalho osmótico de inserção do condensado na solução contendo o polímero flexível. A expressão que ajusta os dados experimentais da pressão osmótica em função do percentual em massa do polímero flexível(PEG) tem a forma geral:

$$\log \Pi_{\text{osm}}[\text{Pa}] = \mathbf{a} + \mathbf{b} \cdot \mathbf{w}^c \quad (22)$$

sendo a, b e c coeficientes que dependem do peso molecular do polímero e w o seu **percentual em massa** na solução. A pressão osmótica escrita dessa forma é expressa em Newton / m²(Pascal).

Já a contribuição do trabalho de empacotamento para a energia livre das moléculas de DNA no estado ψ consiste em aproximar as cadeias de DNA dentro do condensado contra a repulsão eletrostática existente entre essas cadeias.

Como será visto posteriormente, as distâncias entre as cadeias de DNA dentro do condensado não permitem que as atmosferas iônicas se interpenetrem (“nonoverlapping”), o que justifica o uso do modelo de um poli-íon isolado. Para isso, é preciso conhecer o potencial eletrostático a uma distância d do eixo do

DNA. Utilizando a solução aproximada da equação de Poisson-Boltzmann para regiões bastante afastadas da distribuição de cargas, o potencial pode ser escrito :

$$V(d) = (2\pi) \xi_{\text{eff}}^2 Q^{-1} kT e^{-\kappa d} / (\kappa d)^{1/2} \quad (23)$$

Nessa expressão, d é a distância do eixo da hélice até o ponto onde se quer calcular o potencial, ξ_{eff} é a densidade de carga efetiva, Q é o comprimento de Bjerrum igual à e^2/ekT , κ^{-1} é o comprimento de Debye igual à $(8\pi Qn_s)^{-1/2}$, sendo n_s o valor da densidade numérica de contra-íons em solução.

À temperatura ambiente $Q \approx 0.7$ nm e $\kappa^{-1} \approx 0.3 n_s^{-1/2}$ nm, quando n_s é escrito em concentração molar. A densidade efetiva de carga ξ_{eff} (que é um parâmetro adimensional) é calculada usando a solução aproximada da equação de Poisson-Boltzmann em coordenadas cilíndricas (Philip e Wooding, 1969).

Listando os valores de ξ_{eff} para uma variada escala de concentrações do sal monovalente, de Vries (de Vries, 2001) encontrou uma equação polinomial de 3ª ordem que ajusta os valores obtidos de ξ_{eff} vs n_s :

$$\xi_{\text{eff}} = 1.95 + 30.0 n_s + 26.1 n_s^2 + 4.9 n_s^3 \quad (24)$$

sendo que n_s é a concentração molar do sal monovalente.

Para distâncias suficientemente maiores que o comprimento de Debye, as ondulações na rede devido à agitação térmica das cadeias de DNA devem contribuir para a repulsão eletrostáticas entre as cadeias (Podgornik et al, 1989;

Odijk, 1993;). Incluindo as ondulações da rede na equação do potencial eletrostático, a energia eletrostática por unidade de comprimento é escrita como:

$$f_{el} = (n_n/2)V(d) \left\{ e^{(\frac{1}{2}(ku)^2)} / (1 + \frac{1}{2} k u^2/d) \right\} \quad (25)$$

na qual u é o valor médio da amplitude das ondulações ao longo das cadeias de DNA e n_n é o número médio de primeiros vizinhos da cada cadeia do polieletrólito. A introdução das ondulações ao longo da rede líquido-cristalina tem como efeito incrementar a repulsão eletrostática existente entre as cadeias de DNA.

Como foi dito na introdução desse trabalho, o regime líquido-cristalino é caracterizado por ser um estado intermediário entre a fase sólida cristalina, com os átomos bem ordenados, ocupando posições bem definidas no interior da célula, não se afastando demasiado de suas posições médias, e a fase isotrópica líquida, com moléculas possuindo grande mobilidade translacional.

Por essa razão, os cristais-líquidos são mais adequadamente caracterizados como uma mesofase (fase intermediária). Tendo em vista essas considerações, o polieletrólito possui uma grande entropia configuracional; dessa forma as

ondulações na rede incrementam a repulsão eletrostática de maneira considerável.

O termo que é responsável pelas ondulações na rede e que corrige a repulsão eletrostática existente entre as cadeias dentro do cristal é :

$$f_{ent} = c kT/\lambda, \quad (26)$$

sendo λ o comprimento de onda característico das ondulações de uma cadeia semiflexível confinada e está relacionado com a amplitude das ondulações e o comprimento de persistência do DNA por $\lambda = u^{2/3} P^{1/3}$ sendo u a amplitude dessas ondulações e P o comprimento de persistência do DNA (Odijk,1983). A constante numérica c na eq.26 vale $3/2^{8/3}$.

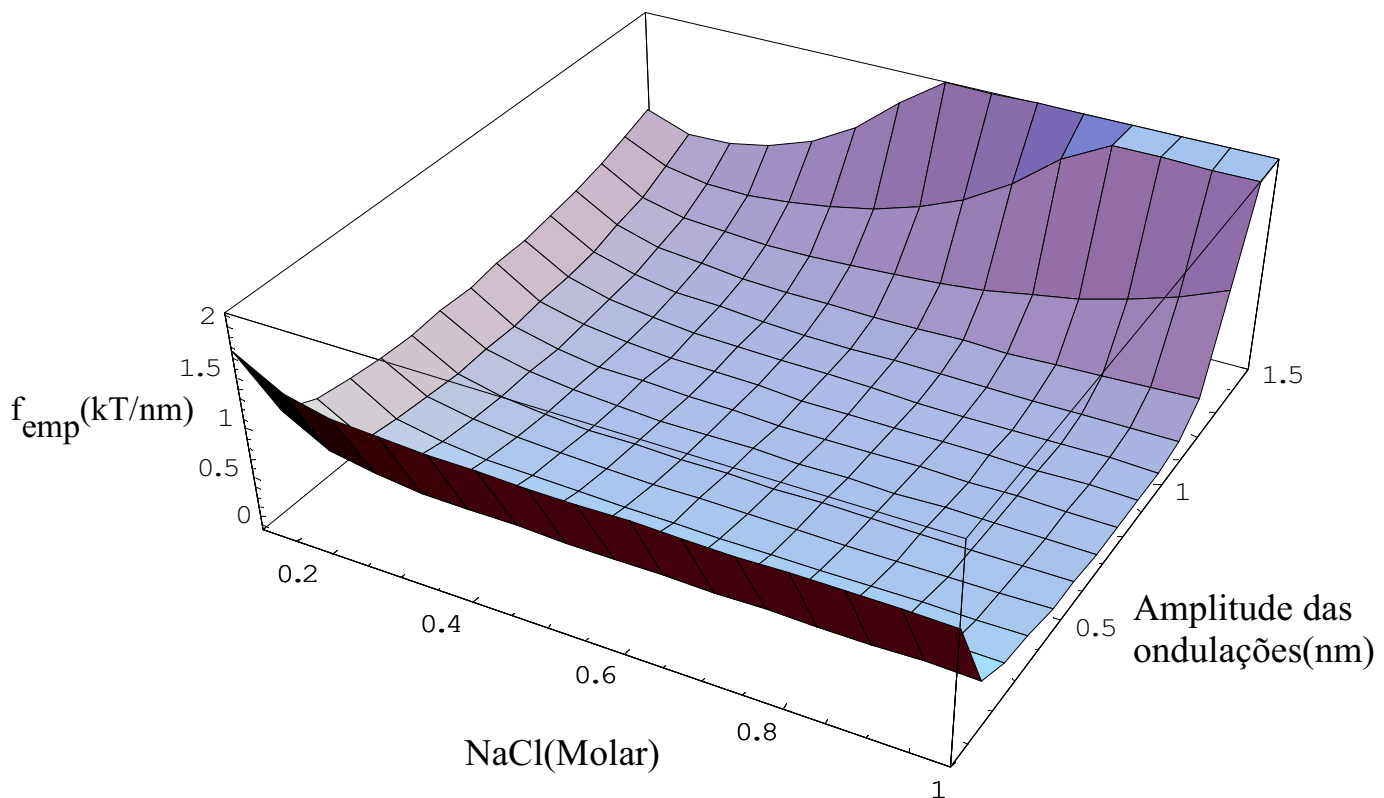


Figura 7- Variação da energia de empacotamento em função da concentração molar do NaCl e da amplitude média das oscilações(u).

O comprimento de persistência P do DNA vale aproximadamente 50 nm nas forças iônicas usadas nos experimentos. O valor da amplitude das ondulações é calculado a partir de uma minimização da contribuição total da solução do polímero flexível para a energia do condensado, ou seja, minimizando a função abaixo com relação a u :

$$f_{\text{emp}} = f_{\text{el}} + f_{\text{ent}} \quad (27)$$

A figura 7 mostra a variação da energia livre de empacotamento em função da amplitude das ondulações e em função da concentração molar do sal. O mínimo da energia se apresenta no intervalo $0.3 \text{ nm} < u < 0.8 \text{ nm}$.

A introdução do termo de ondulações na rede é significativa e pode aumentar em até uma ordem de grandeza a repulsão eletrostática entre as cadeias do DNA que é obtida a partir da solução da equação de Poisson-Boltzmann. (Odijk,1993). Medidas do espaçamento entre as cadeias de DNA sobre estresse osmótico obtidas por difração de raios-X permitem a determinação precisa da força em função da distância e mostram que a repulsão eletrostática unicamente não explica os valores das interações obtidos(Podgornik et al,1995).

Levando-se em conta, contudo, as perturbações que se propagam ao longo das cadeias de DNA e cujo resultado líquido é diminuir a distância média entre as cadeias e, portanto, aumentar a repulsão eletrostática entre elas, consegue-se chegar a valores próximos dos experimentalmente obtidos (Odijk,1993).

A pressão osmótica a que está submetida a estrutura líquido-cristalina pode ser expressa em função do espaçamento entre as moléculas de DNA no interior do cristal de acordo com a expressão (Odjik,1993):

$$\Pi_{lc}(d) = 2cKT/3^{3/2}(kd)u^{8/3}P^{1/3} \quad (28)$$

Igualando-se a equação 28 à equação 22 pode-se obter o espaçamento da rede em função da concentração do polímero flexível, ou seja,

$$\Pi_{lc} = \Pi_{osm} \quad (29)$$

visto que todos os outros valores que aparecem na equação 28 são conhecidos.

25

A transição(ou a curva de equilíbrio de fases) é obtida igualando-se a energia de transferência do DNA em seu estado livre à energia de transferência do DNA em seu estado condensado, ou seja, a energia por molécula de DNA na forma livre deve ser igual a energia por molécula de DNA no interior do condensado. Em outras palavras, assume-se a igualdade dos potenciais químicos dessas duas espécies em solução durante a transição de fase. Essa igualdade permite escrever a concentração do polímero flexível em função da concentração molar do sal:

$$\mu_1 w + \mu_2 w^{9/4} = f_{\text{empacotamento}} + \mu_3 \Pi_{osm} d^2 \quad (30)$$

Resolver a equação 30, ou seja, expressar $w = w(n_s)$, fornece os valores críticos da concentração do polímero flexível para a transição- ψ .

Capítulo 4

Materiais e Métodos

Todas as amostras foram preparadas utilizando-se polietilenoglicol(PEG) fornecido pela Fluka, sem passar por nenhum processo adicional de purificação. Durante o estudo, utilizou-se PEG com as seguintes massas moleculares: 2000, 3350, 6000 e 8000.

Utilizou-se ct-DNA (DNA de timo de bezerro) fornecido pela Pharmacia dissolvido numa solução de NaCl 100mM (nessa concentração de sal, uma fração diminuta do DNA se encontra desnaturada).O processo de preparação da solução polieletrólítica seguiu os seguintes passos: o DNA foi dissolvido na solução salina

e deixado em agitação mecânica leve por aproximadamente 24 horas à 15° C para a obtenção de uma solução homogênea, com moléculas de DNA distribuídas uniformemente em todo o volume da solução(mesmo depois de realizado esse processo, é importante observar a existência de zonas translúcidas na amostra, que eventualmente podem persistir e ali o DNA estará bem mais concentrado).

Depois de preparada a solução de DNA, essa foi sonificada utilizando-se um sonificador de ponta de imersão Virsonic (Virtis) na potência 3. O processo de sonificação consiste em mergulhar na solução de DNA um concentrador acústico que emite ondas de alta potência. Essas ondas, ao se propagarem dentro da solução aquosa, fragmentam o DNA em diversos tamanhos. A finalidade desse procedimento é exatamente essa: obter moléculas de DNA de tamanhos diferentes e determinados.

Separaram-se, então, alíquotas da solução de DNA para serem sonificadas em tempos diferentes, garantindo que cada amostra sonificada por um determinado intervalo de tempo terá moléculas de DNA com um peso médio específico. O processo de sonificação foi feito da seguinte forma: a amostra é sonificada durante etapas de 30 segundos seguidos, com intervalo de espera de 2 minutos entre uma etapa e outra, sendo que a amostra fica em contato térmico com um banho à 0° C. As alíquotas foram sonificadas, então, nos seguintes tempos totais e na potência 3 do sonificador: 1, 2, 3, 4 e 5 minutos. Utilizou-se a amostra sonificada durante 4 minutos nos experimentos desse trabalho (é importante ressaltar a polidispersão do DNA na amostra sonificada e que ela é inerente ao processo de sonificação) que tem aproximadamente 1.500 pares de base(Bustamante et al, 1991)

A preparação das amostras de PEG + solução de NaCl para a análise

espectroscópica deu-se como se segue:

- a) Inicialmente, prepara-se a solução de NaCl na concentração desejada a partir da solução estoque de 1M desse sal.
- b) Em seguida, PEG é dissolvido completamente na solução salina com a ajuda de um agitador mecânico para acelerar o processo de dissolução do PEG (espontaneamente, o processo de dissolução é muito lento, especialmente para PEG de massa molecular mais elevado)
- c) Por fim, acrescenta-se à solução o DNA sonificado com a ajuda de uma microseringa de tal forma que a sua concentração final é fixa em 40 μ M de fosfato em todas as amostras, podendo a concentração em massa do PEG (w) e a concentração molar do sal serem ajustadas de maneira a se obter os valores desejados.

- d) Deixam-se os tubos em agitação mecânica leve por 20 minutos. Em seguida, todas as amostras permanecem em repouso por aproximadamente 2 horas e logo depois os espectros de dicroísmo circular foram definitivamente medidos usando-se um o espectropolarímetro de dicroísmo circular Jasco-710 estando a amostra contida numa cubeta de quartzo de 0.5 cm de caminho ótico que é transparente à radiação UV.

Capítulo 5

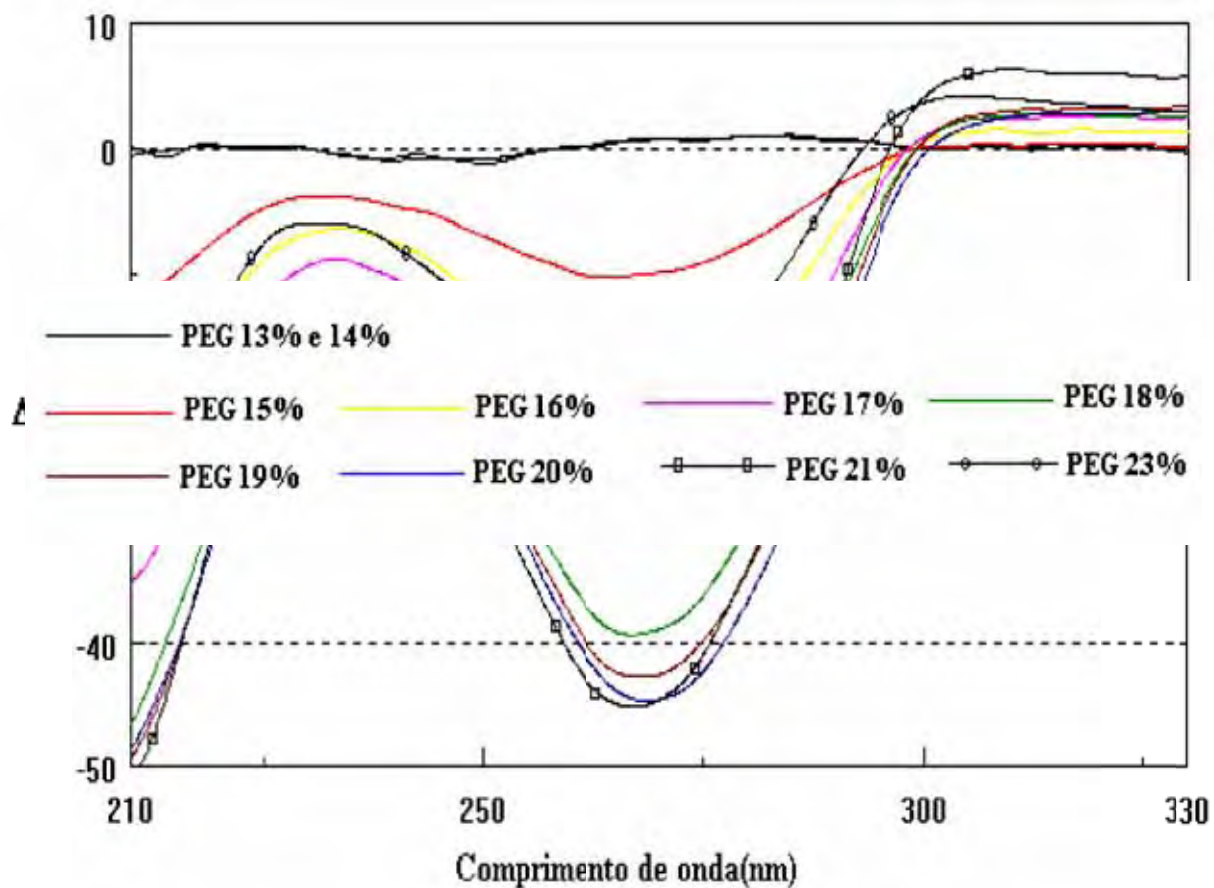
Resultados e discussão

Os espectros mostrados na figura 8 são relativos a uma solução de DNA 40mM em NaCl fixo na concentração de 180mM e PEG 8000 com concentração variando desde 13% até 23% em massa. Abaixo de 15 % de PEG podemos observar o espectro do DNA livre em solução, na conformação B, não havendo evidências de qualquer tipo de interação direta ou complexação entre o PEG e o DNA.

Quando a concentração atinge 15%, ocorre a separação das fases entre os dois

polímeros e, portanto, a transição do DNA da fase dispersa em solução para a fase ψ . Dessa forma, na concentração de 15% em massa do PEG 8000 e em 180 mM de NaCl ocorre a transição. Esse é um ponto do diagrama de fase: abaixo de 15% de PEG e 180 mM de NaCl o DNA se encontra livre ou disperso em solução. *Dessa forma, variando-se controladamente a concentração em massa do PEG e a concentração molar do NaCl é possível encontrar os valores críticos da concentração do PEG em função da concentração do sal capazes de induzir a transição.* Observa-se o caráter descontínuo da transição, não havendo nenhuma forma intermediária entre a fase dispersa e a fase condensada, analogamente ao que acontece nos colapsos monomoleculares estudados por Vasilevskaya (Vasilevskaya et al,1995). Como será visto posteriormente, contudo, uma ligeira modificação na estrutura secundária do DNA antecede a transição de fase.

Figura 8- Espectros de dicroísmo circular obtidos da titulação do DNA com PEG 8000 em NaCl 180 mM.



Em concentrações mais elevadas de PEG, a intensidade do sinal de dicroísmo continua aumentando em virtude do maior empacotamento das cadeias de DNA dentro do condensado devido ao aumento da pressão osmótica. Uma pressão osmótica mais elevada impõe restrições ao movimento das cadeias de DNA no condensado e aumenta a densidade de cromóforos, conseqüentemente o sinal também se intensifica (Apêndice 1).

Se os dipólos responsáveis pela absorção da luz circularmente polarizada estiverem mais “acoplados” em virtude da redução dos graus de liberdade configuracional devido ao acréscimo da pressão osmótica que força a aproximação entre as cadeias de DNA, o sinal será mais intenso. Quando as fases já estão separadas, um aumento subsequente na concentração em massa do PEG, mantendo constante a força iônica da solução, eleva a pressão osmótica e ela executa o trabalho de empacotamento das moléculas de DNA dentro da estrutura do condensado, por isso o sinal se intensifica.

Em torno de 21% em massa do PEG ocorre a saturação da intensidade do sinal. Um ligeiro aumento subsequente da pressão osmótica não modifica significativamente o estado de empacotamento das cadeias de DNA dentro da estrutura do condensado. Em torno de 23% ,contudo, o sinal decresce indicando um descolapso da estrutura, ou seja, os dois polímeros voltam a ser miscíveis (desagregação).

Na figura 9 estão mostrados os valores de $-(\Delta\epsilon - \Delta\epsilon_d)$ em 272 nm, sendo $\Delta\epsilon$ o valor medido da elipticidade (em escala arbitrária) e $\Delta\epsilon_d$ o valor da elipticidade do DNA no estado disperso naquele comprimento de onda em cada valor da concentração percentual em massa do PEG 8000. Nesse gráfico podemos observar a variação da intensidade do sinal em cada ponto da titulação.

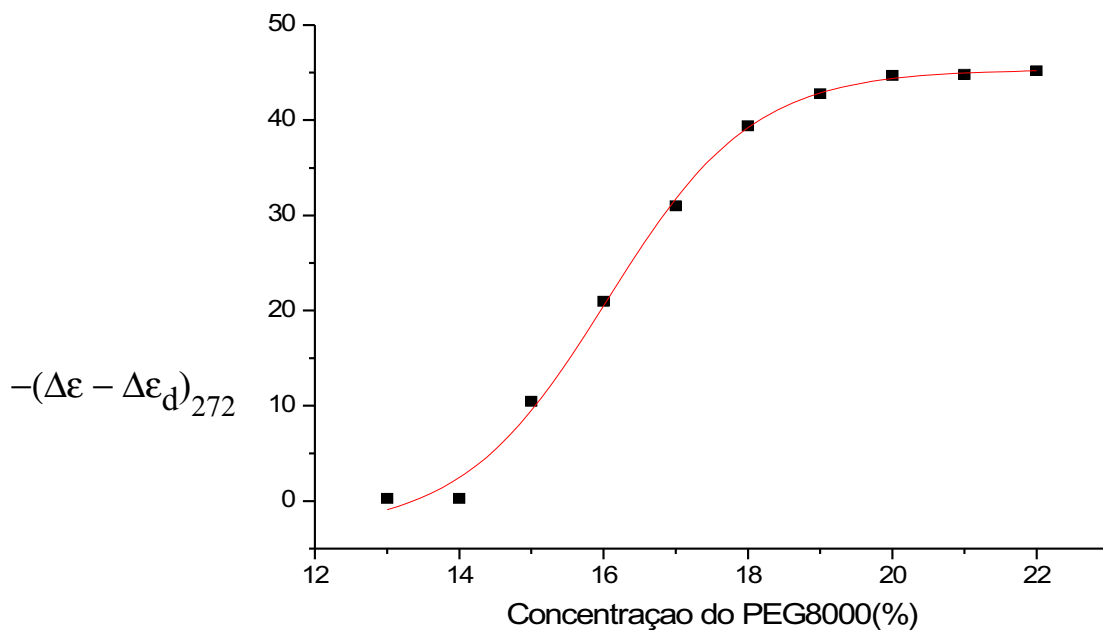


Figura 9- Variação de $-(\Delta\epsilon - \Delta\epsilon_d)_{272}$ em função da concentração percentual em massa do PEG 8000 com a concentração molar do NaCl fixa em 180 mM.

Observa-se, então, que a variação de $-(\Delta\epsilon - \Delta\epsilon_d)_{272}$ com a concentração percentual do PEG 8000 é sigmoide, tendendo a um limite de saturação com o aumento da concentração do PEG.

Os espectros da figura 10 são relativos à titulação do DNA em PEG 2000, mantendo-se a concentração do NaCl fixa em 320mM e nessas condições ocorre o aparecimento da fase- ψ em 15% de PEG 2000.

Dessa forma, observamos que diminuindo o grau de polimerização (N) do PEG, é necessária uma maior quantidade de NaCl para induzir a transição do DNA da fase dispersa para a fase condensada.

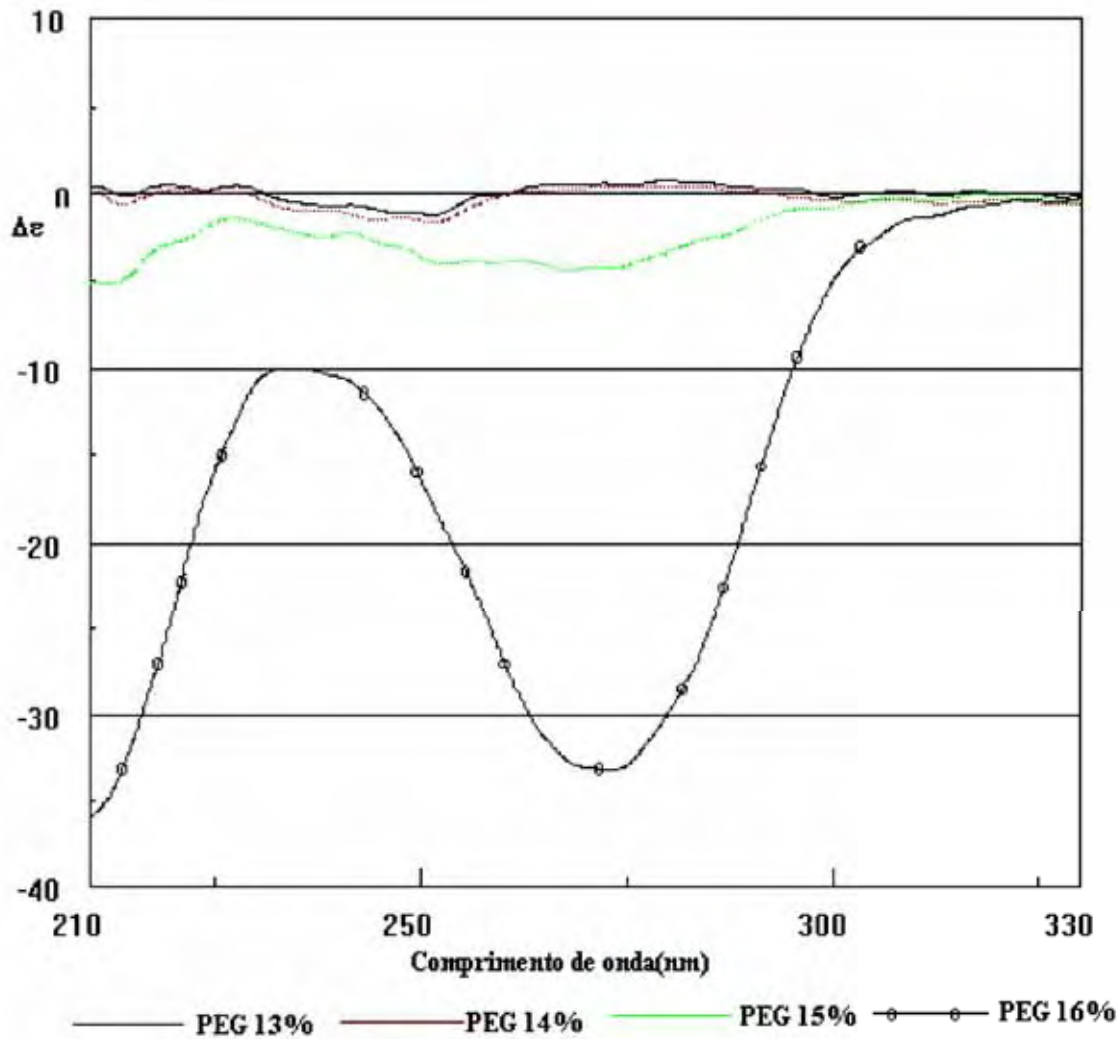


Figura 10- Espectros de dicroísmo circular obtidos da titulação do DNA com PEG 2000 em NaCl 320mM, com PEG variando de 13% à 16%.

Sendo assim, é possível encontrar os valores críticos de NaCl (w_{crit}) e PEG (w_{crit}) para que a transição se efetue. Com isso, pode-se construir o diagrama de fase para a transição $-\psi$ do DNA para os diversos pesos moleculares do polímero flexível. Nos gráficos apresentados nas figuras 11 e 12 são mostrados diagramas de fase (w

(%) em função da concentração molar do NaCl) obtidos para o PEG 8000 e para o PEG 2000. Em toda a região acima da curva o DNA está na fase condensada. Na região delimitada pela curva e pelos eixos cartesianos o DNA está na fase condensada. Sobre a curva as duas fases coexistem em equilíbrio.

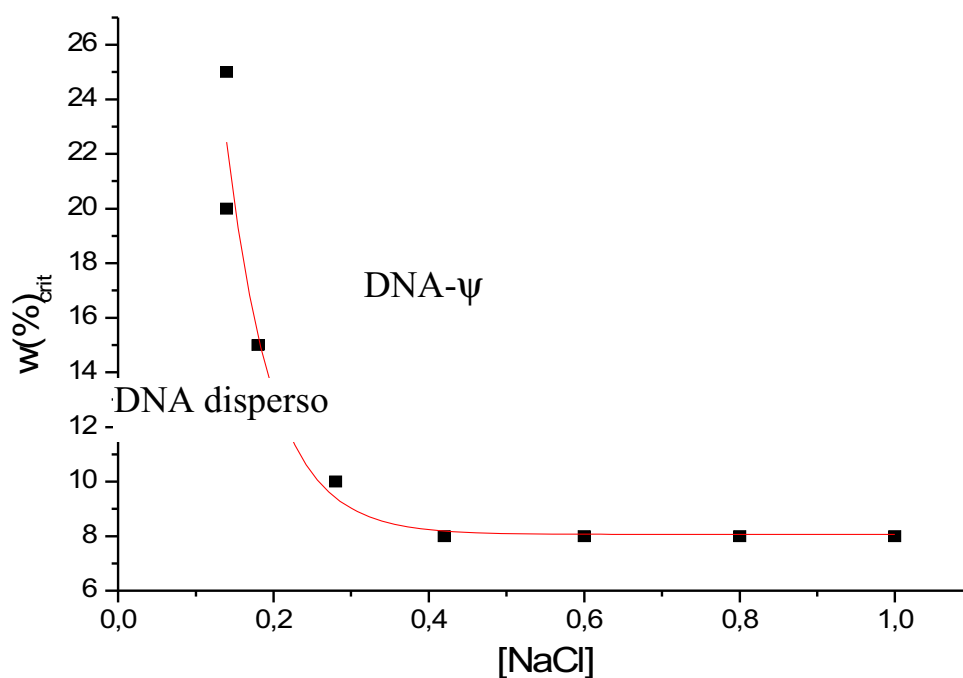


Figura 11- Diagrama de fase obtido para a transição- ψ multimolecular do DNA em PEG 8000. A concentração do PEG 8000 está expressa em percentual da massa da solução(w) e a concentração do NaCl em unidade molar.

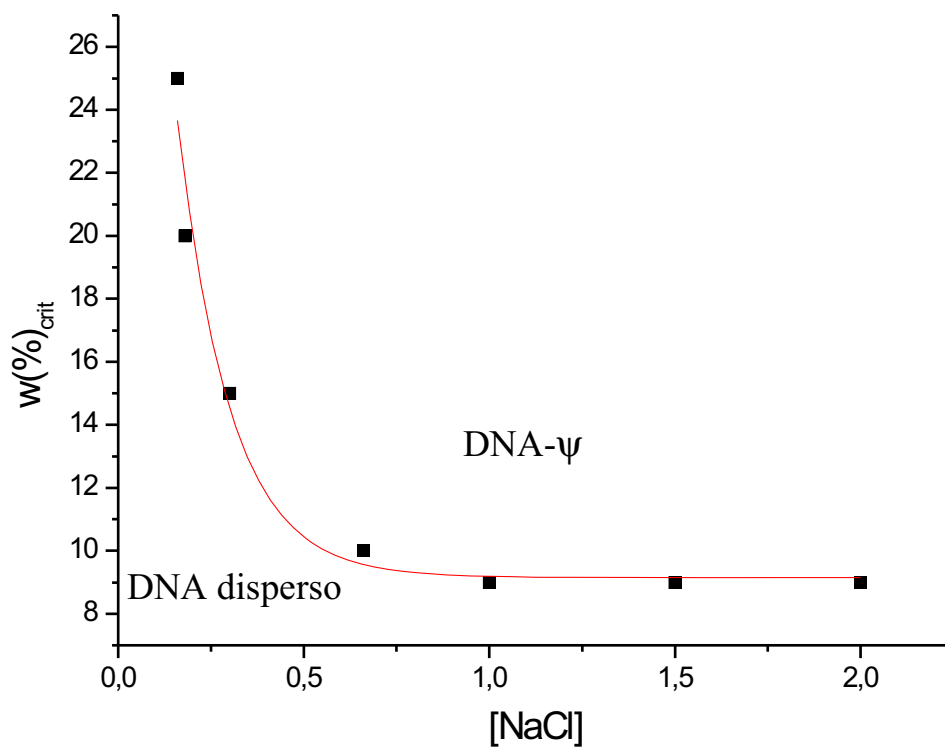


Figura 12 - Diagrama de fase obtido para a transição- ψ multimolecular do DNA em PEG 2000. A concentração do PEG 2000 está expressa em percentual da massa da solução(w) e a concentração do NaCl em unidade molar.

Pela análise dos diagramas de fase acima podemos constatar dois regimes distintos para a transição- ψ :

1- Em elevada concentração do polímero flexível, a transição se efetua em valores quase independentes da concentração do sal.

2- Em elevada força iônica, a concentração crítica do polímero flexível é independente da concentração do sal.

Na figura 13, os diagramas de fase para a transição- ψ do DNA em PEG 8000 e PEG 2000 estão dispostos no mesmo sistema de eixos, incluindo pontos isolados para essa transição em PEG 6000 e PEG 3350. Podemos observar, dessa forma, o deslocamento da curva de equilíbrio de fase em função do grau de polimerização N do polímero flexível (PEG).

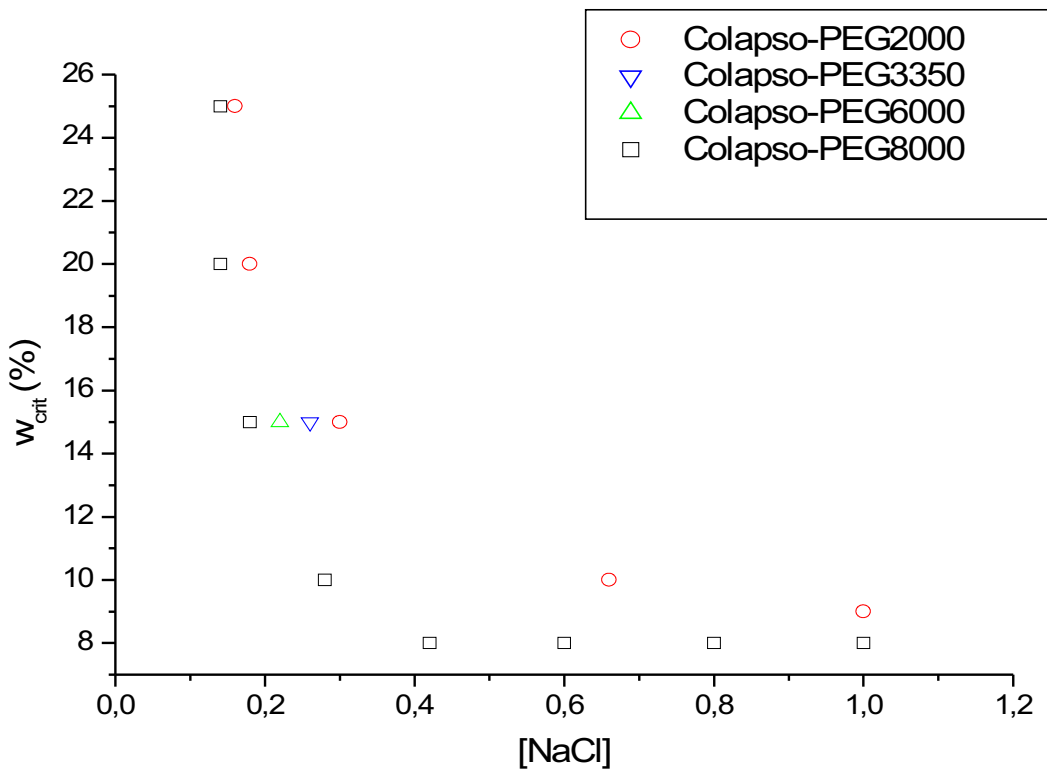


Figura 13-Pontos experimentais obtidos para a concentração crítica do PEG 2000 e PEG 8000 (concentração expressa em percentual da massa da solução) capaz de induzir a transição- ψ e pontos isolados para a concentração crítica do PEG 6000 e para o PEG 3350.

Observa-se que para se obter a transição na mesma força iônica ou no mesmo percentual em massa do polímero flexível, é necessária uma maior concentração desse polímero ou uma maior força iônica, respectivamente, para o PEG 2000 do que para o PEG8000.

Como foi dito anteriormente, em determinadas concentrações críticas ocorre o descolapso da estrutura. Na figura 14 é mostrado o diagrama de fase para o descolapso do DNA em PEG 8000, ou seja, a passagem do DNA da fase condensada para a fase dispersa. O processo de descolapso é visível espectroscopicamente pela diminuição da intensidade do sinal de dicroísmo (Apêndice 1).

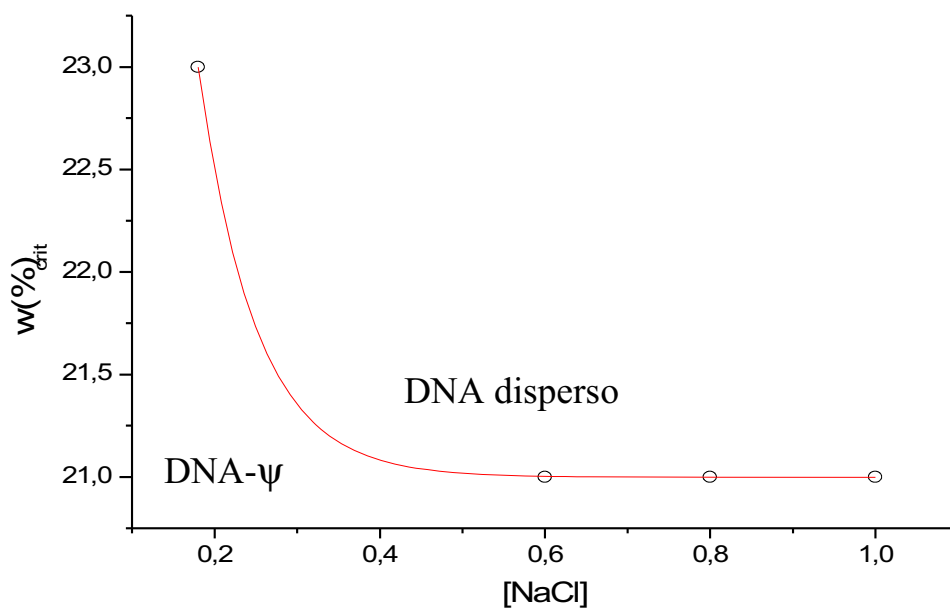


Figura 14 - Diagrama de fase para o descolapso do DNA em PEG 8000. A concentração do PEG está expressa em percentual da massa da solução e a concentração do NaCl em unidades molares.

Observamos que o descolapso ocorre tanto em força iônica elevada, quanto em baixas concentrações de NaCl, embora seja necessária uma maior concentração do polímero flexível. Em pontos abaixo da curva, o DNA se encontra totalmente na fase condensada. Em pontos acima da curva, o DNA se encontra na fase livre. Sobre a curva existe o equilíbrio entre as duas fases.

No gráfico da figura 15 estão mostrados os valores do potencial químico DNA em função da pressão osmótica. Esses valores foram obtidos a partir da figura 9 e da equação 22 (Apêndice 2). A inclinação da reta que melhor ajusta os pontos do gráfico é -0.055 .

Como $\partial(-RT\ln K_{eq})/\partial P_{osm} = V_{\text{água}}$, ou seja, a variação do potencial químico da macromolécula com a pressão osmótica à temperatura e à pressão hidrostática constante é igual ao volume do solvente deslocado durante a reação, $0.055 \text{ m}^3 / \text{mol}$ é a variação da água de hidratação por mol de moléculas de DNA no curso da reação (Apêndice 3).

Essa é, portanto, a variação de volume que o DNA sofre desde a separação de fase, que ocorre por volta de 15% em PEG8000 até 21% quando o sinal satura, indicando que todo o DNA passou da fase livre para a fase condensada. É importante observar que está implicitamente admitido um modelo simples de dois estados em equilíbrio em todas as considerações precedentes.

O valor médio do trabalho realizado para empacotar as moléculas de DNA dentro da estrutura do condensado, ou seja, aproximar as cadeias de DNA contra a repulsão eletrostática existente pode ser calculado pelo produto do volume deslocado pelo valor médio da pressão osmótica durante o curso da reação. O valor médio da pressão osmótica ao longo da reação é dado por:

$$\Pi^{OSM} = \int_b^a f(w)dw / 6 \quad (31)$$

sendo que $f(w) = \log \Pi_{osm}[\text{Pa}] = a + b \cdot w^c$. Para o PEG 8000 os coeficientes a, b e c valem respectivamente 2.96, 0.95 e 0.36. O valor da Eq 31 é aproximadamente $4.36 \cdot 10^5$ Pa.

O valor médio do trabalho de empacotamento ($\langle W \rangle$) para um mol de moléculas de DNA com o percentual em massa do polímero flexível variando de 15% a 21%, portanto, com o PEG não tendo mais acesso “à água de hidratação do DNA” pode ser calculado pelo produto do volume de água deslocado “durante a reação” pelo valor médio da pressão osmótica:

$$\langle W \rangle = 4.36 \cdot 10^5 \text{ Pa} \times (0.055 \text{ m}^3/\text{mol.}) \approx 2.10^4 \text{ Joules/mol.}$$

Considerando que a ordem de grandeza do comprimento de contorno L das moléculas de DNA usadas nos experimentos é de 10^2 nm e ainda que cada célula unitária do condensado contém 6 moléculas de DNA (assumindo o arranjo hexagonal), teremos a seguinte energia de empacotamento média ($\langle E_{emp} \rangle$) por nanômetro:

$$\langle E_{emp} \rangle \approx 2 \times 10^{-21} \text{ Joules / nm ou } 0.48 \text{ kT/nm}$$

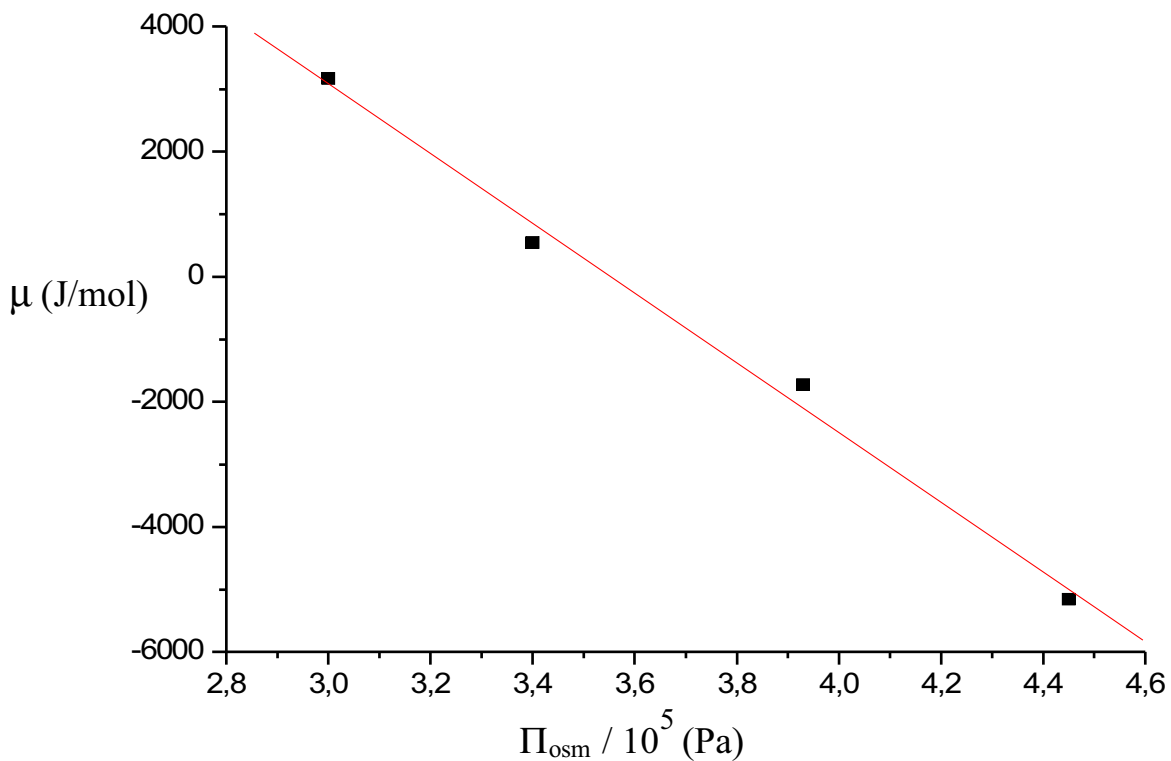


Figura 15-Variação do potencial químico padrão do DNA em função da pressão osmótica para titulação do DNA em PEG 8000 (concentração do NaCl fixa em 180mM).

5.1- Sobre a modificação na estrutura secundária do DNA :

Os espectros mostrados na figura 16 são relativos a titulação do DNA com NaCl, em 15% de PEG 6000 em 160, 180 e 200mM de NaCl. Em 200mM de sal podemos perceber o afastamento do espectro com relação à estrutura B do DNA com 10.4 pares de base por giro completo da hélice.

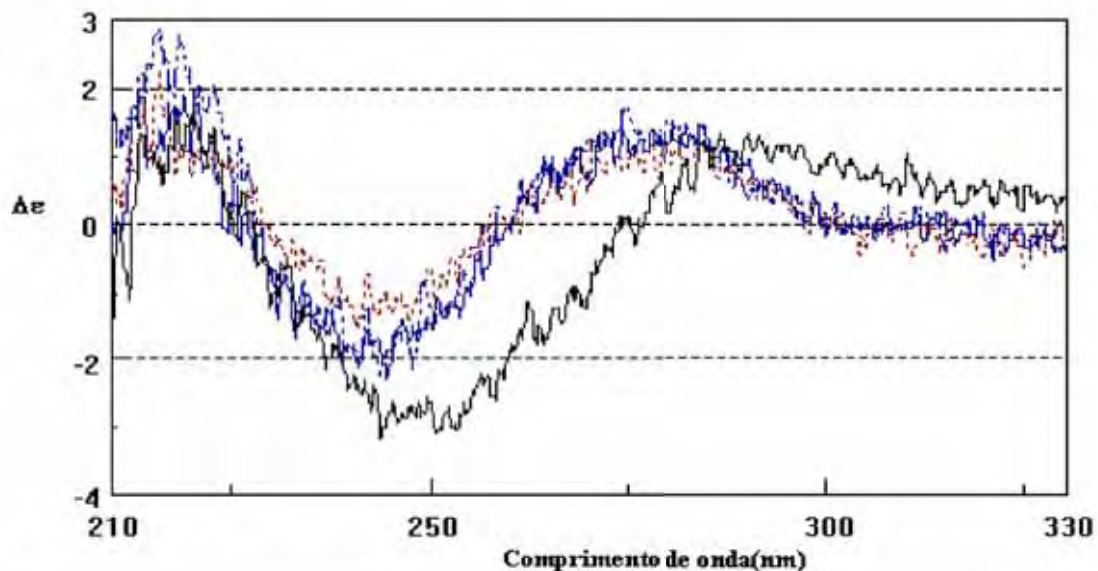


Figura 16- Alteração na estrutura secundária do DNA nas vizinhanças da transição- Ψ .

Quando a hélice passa a ter 10.2 pares de base por volta, então o máximo em 275 nm desaparece. O espectro representado pela curva preta da figura 16 é o espectro de CD do DNA em 200mM de NaCl, imediatamente antes de ocorrer a transição-Y.

Vemos que, essencialmente, o máximo em 275nm desapareceu, analogamente ao que acontece com o DNA em concentrações elevadas de metanol ou com o DNA empacotado em torno das histonas no núcleo celular (Rodger e Nordén,1997; van Holde,K.E.,1998). Esse estado do DNA é estável, não havendo qualquer modificação do espectro até 24 horas depois de preparada a amostra, sendo uma conformação que é sempre encontrada (desde que o incremento na titulação seja suficientemente pequeno, em torno de 20mM) nas imediações das concentrações críticas.

Dessa forma, parece muito provável que a estrutura secundária do DNA dentro do condensado seja ligeiramente diferente da sua estrutura livre em solução, estando a dupla hélice um pouco mais “parafusada.”

5.2- Sobre os coeficientes numéricos da teoria de de Vries que ajustam os resultados experimentais.

Na figura 17 estão os pontos experimentais de condensação do DNA em PEG 8000 e a curva teórica obtida a partir da solução da equação 30. Os coeficientes numéricos que melhor ajustam a curva são $\mu_1 = 2.7kT/nm$ e $\mu_2 = 102kT/nm$.

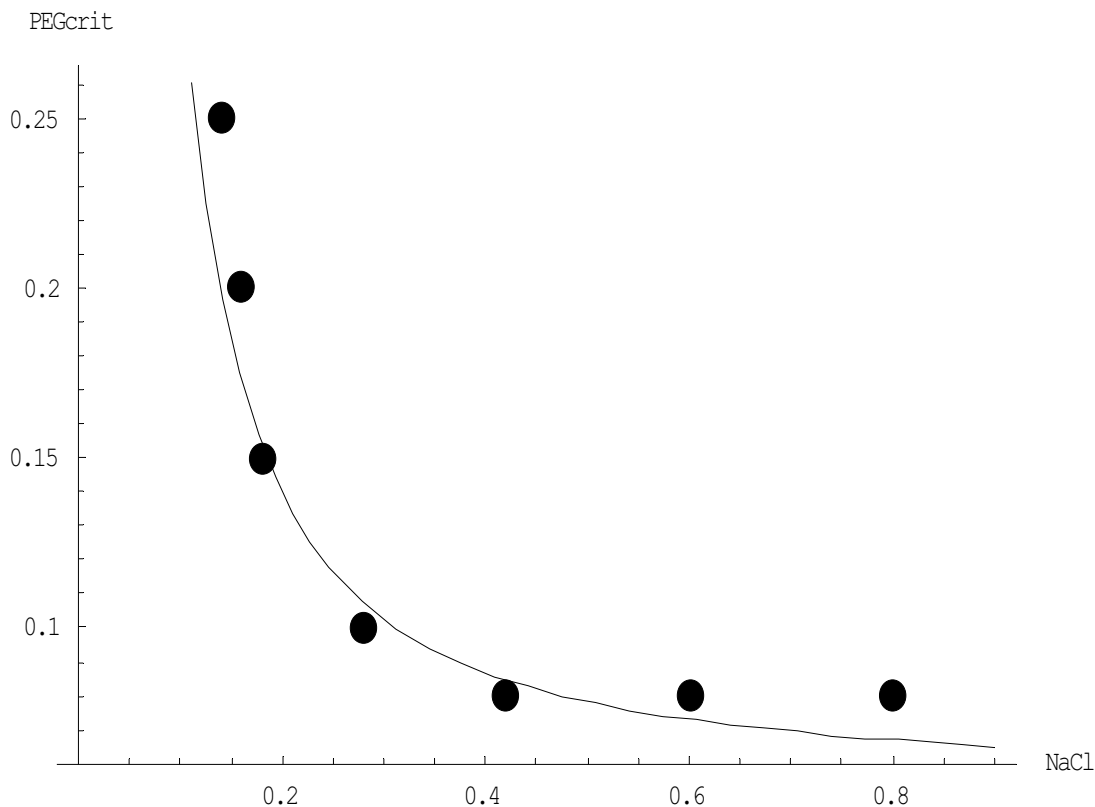


Figura 17- Comparação entre o modelo teórico (curva contínua) e os resultados experimentais para o colapso do DNA em PEG8000.(Obs-PEG8000 em fração da massa da solução e NaCl em concentração molar).

Na figura18 estão os pontos experimentais de condensação do DNA em PEG

2000 e a curva teórica obtida a partir da solução da equação 30. Os coeficientes numéricos que melhor ajustam a curva são $\mu_1 = 1.2kT/nm$ $\mu_2 = 100kT/nm$.

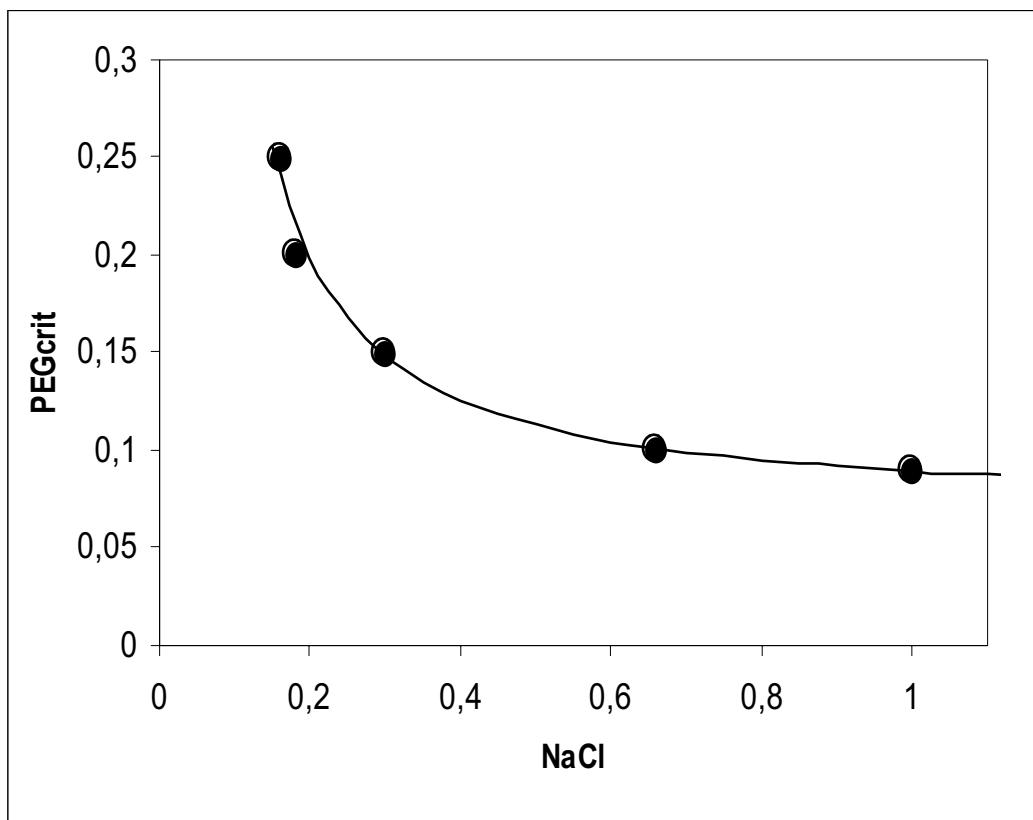


Figura 18- Comparação entre o modelo teórico (curva contínua) e os resultados experimentais para o colapso do DNA em PEG2000. (Obs- PEG em fração da massa da solução e NaCl em concentração molar).

Observa-se que o coeficiente m_2 praticamente não depende do grau de polimerização N do PEG, de acordo com a equação 17, enquanto o coeficiente m_1 deve ser reduzido (por um fator de 0.44) para ajustar os dados experimentais, em desacordo com a equação 16. Essa prevê um aumento de μ_1 com a redução do N .

Conclusões:

A análise geral dos resultados experimentais deixa clara as seguintes conclusões:

1- A concentração crítica do polímero flexível diminui com o aumento da força iônica e com o aumento do grau de polimerização do polímero flexível, resultados idênticos aos obtidos por Vasilevskaya em colapsos monomoleculares com moléculas de DNA de 50nm de comprimento de contorno (Vasilevskaya et al,1995).

2- O processo de descolapso também é verificado em condensados multimoleculares, com PEG de vários pesos moleculares (8000 a 2000), e não está restrito aos altos índices de polimerização, como inferiu Vasilevskaya de seus experimentos e também acontece em elevadas concentrações do sal, fato que deve ter uma explicação qualitativa natural a partir do modelo de de Vries (de Vries,2001).

3- A introdução do termo de ondulações ao longo das cadeias de DNA no interior do condensado incrementa a repulsão eletrostática. Esse fator permite obter valores críticos de concentração do polímero flexível para a transição- γ em elevada força iônica em melhor acordo com os resultados experimentais do que aqueles que derivam do modelo proposto por Vasilevskaya (Vasilevskaya et al,1995) para a transição- ψ monomolecular do DNA. O modelo proposto por de Vries (de Vries,2001), na verdade, consegue prever o diagrama de fase da transição- ψ monomolecular e multimolecular do DNA com razoável precisão.

4- A estrutura secundária do DNA dentro do condensado difere ligeiramente de sua estrutura dispersa em solução, estando a dupla hélice um pouco mais “parafusada”(10.2 pares de base por volta ao invés de 10.4 pares de base).

5- O modelo simples de dois estados em equilíbrio termodinâmico usado para calcular a energia de empacotamento fornece números da mesma ordem de

grandeza dos encontrados no trabalho de de Vries ($\sim 10^{-1}$ kT/nm) para o trabalho realizado pelo polímero flexível para empacotar as moléculas de DNA dentro do condensado. Isso, contudo, não é um indício incontestável de que o fenômeno aqui abordado (abaixamento da qualidade do solvente produzindo a separação de fase entre dois polímeros num sistema ternário) possa ser tratado por essa via.

6- O modelo de de Vries prevê que o coeficiente numérico m_1 escala com o inverso do índice de polimerização, ou seja, $m_1 \sim 1/N$. Observa-se, contudo, que esse coeficiente deve diminuir para ajustar os pontos do diagrama de fase da transição- ψ do DNA em PEG 2000 com relação ao diagrama de fase em PEG 8000. Faz-se então necessário, um maior entendimento teórico do processo de condensação multimolecular do DNA em vista dos dados experimentais aqui apresentados.

Apêndice 1

Um modelo simples de dois estados para a transição- ψ do DNA.

A análise teórica dos espectros de titulação (figura 8) baseia-se num modelo de

dois estados em equilíbrio termodinâmico para as moléculas de DNA em solução. Assumiremos, então, que em solução existem apenas duas espécies óticamente ativas: o DNA na fase dispersa (DNA_d) e o DNA na fase condensada e opticamente distinta da fase dispersa (DNA_ψ). Partindo disso, podemos escrever que :

$$\Delta A_{\text{Total}} = \Delta A_{\text{DNA}_d} + \Delta A_{\text{DNA}_\psi} \quad (1)$$

Essa equação relaciona a absorção diferencial total da solução com a absorção diferencial de cada uma das duas espécies óticamente distintas presentes. Utilizando a lei de Beer-Lambert para a absorção diferencial total e para a absorção diferencial de cada espécie pode-se escrever a equação 1 como:

$$\begin{aligned} \{[\text{DNA}_d] + [\text{DNA}_\psi]\} \Delta \epsilon l &= [\text{DNA}_d] \Delta \epsilon_d l + [\text{DNA}_\psi] \Delta \epsilon_\psi l \\ [\text{DNA}_d] (\Delta \epsilon - \Delta \epsilon_d) &= [\text{DNA}_\psi] (\Delta \epsilon_\psi - \Delta \epsilon) \\ [\text{DNA}_\psi] / [\text{DNA}_d] &= (\Delta \epsilon - \Delta \epsilon_d) / (\Delta \epsilon_\psi - \Delta \epsilon) = K_{\text{eq}} \quad (2) \end{aligned}$$

47

Portanto, a constante de equilíbrio da reação pode ser escrita em função das elipticidades $(\Delta \epsilon - \Delta \epsilon_d) / (\Delta \epsilon_\psi - \Delta \epsilon)$ das 2 espécies em solução.

A equação 2 pode ser analisada mais facilmente se forem mostrados num gráfico os valores de $\Delta \epsilon - \Delta \epsilon_d$, ou seja, o valor medido da elipticidade em um dado ponto da titulação menos o valor da elipticidade do DNA na fase dispersa $\Delta \epsilon_d$, contra o agente físico-químico que promove a transição, no caso desse trabalho, a pressão osmótica. Isso está ilustrado na figura 1.

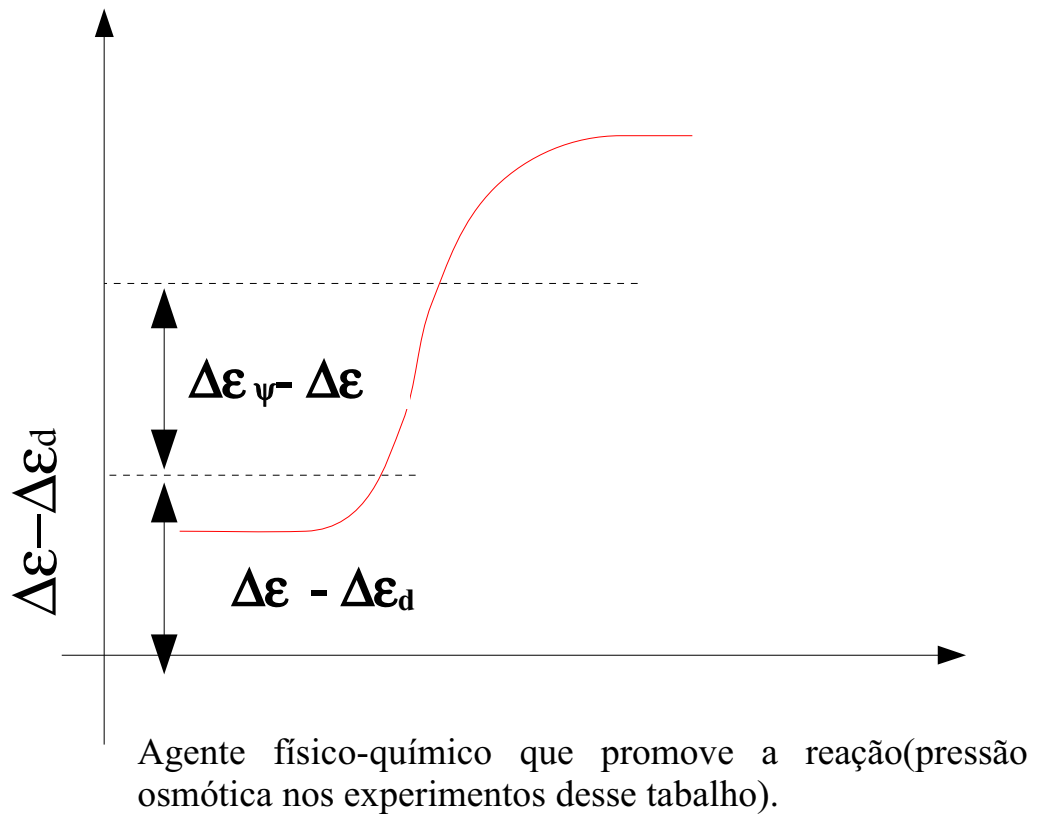


Figura 1- Variação da elipticidade em função da pressão osmótica.

Apêndice 2

A espectroscopia de dicroísmo circular e os cristais líquidos na mesofase colestérica.

A técnica de espectroscopia de dicroísmo circular (CD) consiste fundamentalmente na medida da absorção seletiva de um dos estados de polarização da luz circularmente polarizada (figura 1), ou seja:

$DA = A_E - A_D$, sendo A_E a absorção da luz circularmente polarizada à

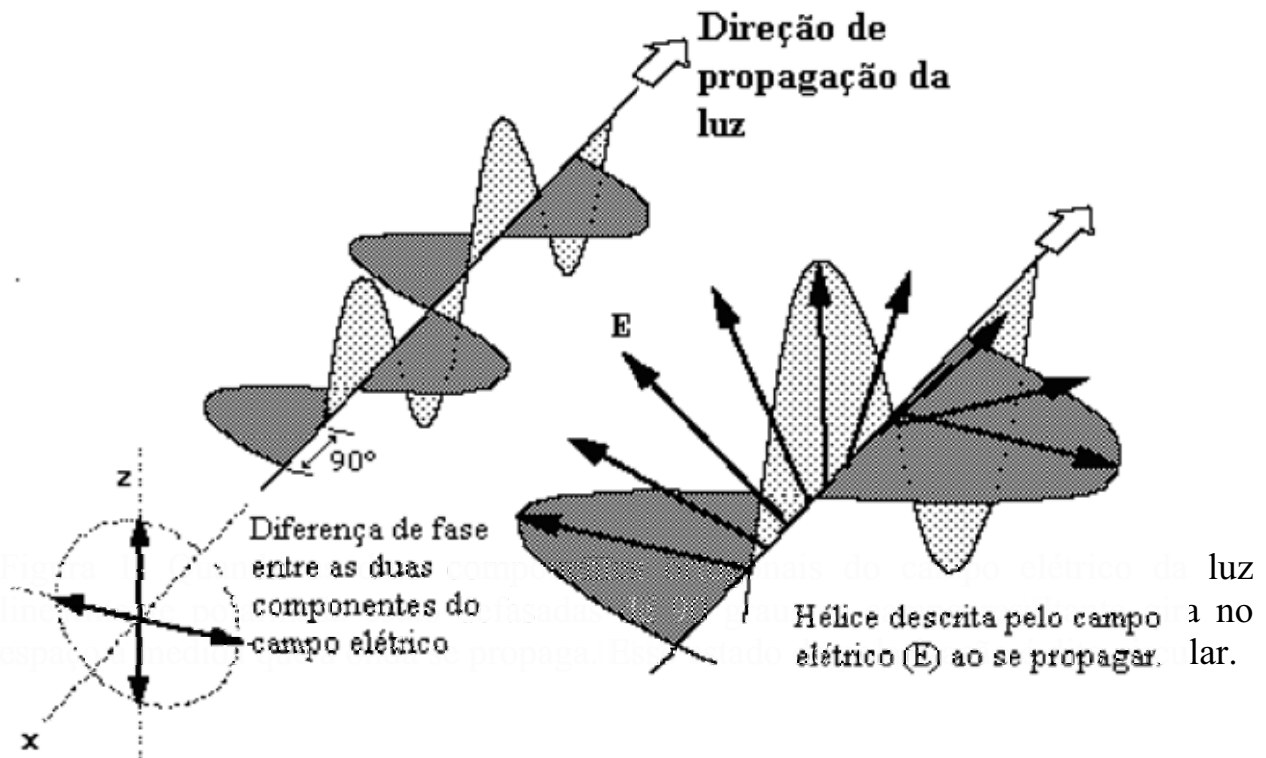
esquerda e A_D a absorção da luz circularmente polarizada à direita. Dessa forma, podemos escrever a lei de Beer-Lambert para a absorção de cada um dos estados de polarização da luz e a absorção diferencial DA é escrita como:

$$DA = (e_E C \cdot l - e_D C \cdot l) = \Delta e C l$$

sendo Δe a diferença entre os coeficientes de extinção $e_E - e_D$, C a concentração da espécie opticamente ativa e l a espessura da amostra atravessada pela luz. Se a concentração da espécie for medida em unidades molares e o caminho ótico em centímetros, então Δe é expresso em $\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

A absorção seletiva é o resultado da distribuição assimétrica dos cromóforos no interior da molécula. Dessa forma, como o CD é uma técnica que detecta alterações na distribuição dos cromóforos, a espectroscopia de dicroísmo circular é ideal para se estudar as mudanças conformacionais na molécula quando ela interage com outra molécula (interação macromolécula-ligante) ou mudanças conformacionais induzidas por alterações físico-químicas do meio onde a macromolécula está (pH, temperatura, pressão osmótica, etc).

Como foi visto, então, o dicroísmo circular pode ser usado sempre que se quiser seguir alterações estruturais numa macromolécula. No caso da transição- γ as mudanças conformacionais se dão de maneira marcante (as intensidades do sinal de dicroísmo encontradas nos espectros de agregados do tipo- γ não encontram contrapartida em nenhum outro tipo de macromolécula biológica) e evidenciam o alto grau de assimetria presente nessas estruturas (Keller et al, 1985).



Na figura 1 é mostrada a disposição do vetor campo elétrico a medida que a onda propaga. Observamos que o campo elétrico gira com amplitude constante. Na verdade, esse vetor descreve uma hélice no espaço. Partindo da equação de onda que descreve a propagação de cada uma das componentes ortogonais do campo elétrico, podemos escrever que (Hecht, E.,1991):

50

$$E_z(x,t) = E_0 \cos(kx - \omega t) \mathbf{k} \quad (1)$$

$$E_y(x,t) = E_0 \cos(kx - \omega t \pm \pi/2) \mathbf{j} \quad (2)$$

As equações 1 e 2 descrevem a propagação do campo elétrico ao longo do eixo x do sistema de eixos cartesianos mostrados na figura 1. Nessas equações, k representa o número de onda ($2\pi/\lambda$, sendo λ o comprimento de onda), ω é a frequência angular da onda ($\omega = 2\pi/T$, sendo T o período da onda), E_0 a amplitude do campo elétrico e \mathbf{k} e \mathbf{j} vetores unitário ao longo dos eixos z e y. O fator $\pm \pi/2$ que aparece no

argumento de E_y representa a diferença de fase entre as as duas componentes e é responsável pelo estado de polarização circular.

A equação 2 pode ser reescrita como:

$$E_y = \pm E_0 \sin(kx - \omega t) \mathbf{j} \quad (3)$$

A onda resultante é obtida somando-se as duas componentes ortogonais, ou seja, somando-se a equação 1 e a equação 3:

$$\mathbf{E} = E_z + E_y \quad (4)$$

Dessa forma, a onda resultante será descrita por:

$$\mathbf{E} = E_0 [\cos(kx - \omega t) \mathbf{k} \pm \sin(kx - \omega t) \mathbf{j}] \quad (5)$$

Como foi dito no capítulo 1 desse trabalho, a disposição das moléculas do polímero no interior das mesofases colestéricas é tal que o eixo dessas moléculas gira continuamente no interior do cristal líquido como ilustrado na figura 6.

O fato de a disposição dos dipólos no interior do cristal coincidir com a disposição do campo elétrico no espaço é um dos motivos de um espectro de CD tão intenso como o dessas estruturas de cristal líquido (Keller et al, 1985).

Em experimentos com filmes de DNA, preparados a partir de uma solução desse polímero depositada entre duas lâminas de quartzo sendo, em seguida, uma delas girada com relação a outra, encontraram-se espectros com intensidades e perfis análogos aos encontrados nos espectros do tipo-y.

Invertendo-se o sentido da rotação aplicada sobre a placa, o sinal também era invertido. Se as placas eram, em seguida, aleatoriamente giradas uma contra a outra, reestabelecia-se o espectro de CD da molécula dispersa em solução (Maestre et al, 1980). Esse experimento sugere que o sinal anômalo observado nos condensados do tipo-y é produzido por um ordenamento supramolecular.

Pode-se considerar explicitamente que se o passo da hélice da estrutura colestérica coincidir com o comprimento de onda λ da onda incidente, haverá absorção seletiva de uma das componentes da luz circularmente polarizada, ou ainda,

haverá discriminação quiral(Keller et al, 1985).

Considere-se a seguinte distribuição espacial de dipolos:

$$\mathbf{u}_i = m(\cos 2\pi x_i/P \mathbf{k} \pm \sin 2\pi x_i/P \mathbf{j}) \quad (6),$$

na qual \mathbf{u}_i representa o momento de dipólo no ponto x_i do eixo do cristal líquido, m é o módulo do momento de dipólo(considerado o mesmo para todos os dipólos), P é o passo da hélice do cristal como ilustrado na figura 6.

Quando $P = \lambda$, ou seja, quando o passo do arranjo supramolecular coincidir com o comprimento de onda da luz incidente, a forma da distribuição espacial dos dipólos é exatamente a mesma do campo elétrico descrito pela equação 5. Isso acarreta a absorção diferenciada das componentes direita e esquerda da luz incidente(Keller et al, 1985). Esse é um fator puramente geométrico e que contribui independentemente para a discriminação quiral observada nos espectros de dicroísmo circular das estruturas condensadas multimoleculares do tipo- γ .

O outro fator que contribui para o sinal de dicroísmo anômalo diz respeito à resposta coletiva dos dipólos presentes no agregado, em contraposição a absorção localizada como aquela encontrada na molécula dispersa.

O mecanismo de interação da radiação com agregados de dimensões da ordem de grandeza do comprimento de onda da luz incidente foi descrito por Keller e colaboradores(Keller et al,1985).

52

Nesse modelo, quando o agregado possui uma densidade mínima de cromóforos (~ 1 por nm^3) e uma forma tridimensional, origina-se um efeito de “quiralidade em larga escala” entre os dipólos do agregado, sendo que dipólos localizados em pontos distantes não podem mais serem considerados osciladores independentes.

A resposta deslocalizada dos dipólos ao campo incidente acontece pelo fato de o agregado ser suficientemente denso e permitir que os dipólos interajam entre si, de maneira que, ou uma redução do momento de dipólo de cada cromóforo ou uma redução na densidade do agregado reduz o termo de acoplamento entre eles,

produzindo uma redução ou eventualmente o desaparecimento da discriminação quiral. Esse fato é observado pela redução do espectro de CD e deve ser entendido como o descolapso da estrutura(Keller et al, 1985).

Apêndice 3

A relação de Gibbs-Duhem e o estresse osmótico

A relação de Gibbs-Duhem é uma relação geral imposta pelo princípio da conservação da energia às modificações dos potenciais químicos dos componentes de uma mistura e é escrita como:

$$\sum dm_i N_i = 0 \text{ à pressão hidrostática e temperatura constante.}$$

O seu significado é claro: o potencial químico de um componente de uma mistura não pode sofrer alteração independentemente dos potenciais químicos dos demais componentes. Numa solução contendo DNA, água e outros osmólitos (PEG, por exemplo) a relação de Gibbs-Duhem impõe que a seguinte equação deva ser satisfeita:

$$dm_{\text{DNA}} = -N_a dm_{\text{água}} - N_{\text{PEG}} dm_{\text{PEG}} \quad (1)$$

Nessa equação, m é o potencial químico da espécie indicada pelo subscrito, N_a é o número de moles de moléculas de água associadas a 1 mol da macromolécula e N_{PEG} é o número de moles de moléculas do PEG associadas a 1 mol da macromolécula.

Suponhamos que a macromolécula em solução exista em apenas dois estados: um estado disperso e um estado condensado. Representando o DNA no estado disperso por DNA_d e o DNA condensado por DNA_y podemos escrever que, para a adição do soluto (PEG), os potenciais químicos das duas espécies do DNA se modificam da seguinte forma:

54

$$dm_{\text{DNA}_y} = -N_{ay} dm_{\text{água}} - N_{\text{PEG}_y} dm_{\text{PEG}} \quad (2)$$

$$dm_{\text{DNA}_d} = -N_{ad} dm_{\text{água}} - N_{\text{PEG}_d} dm_{\text{PEG}} \quad (3)$$

Subtraindo a equação 2 da equação 3 teremos:

$$dm_{\text{DNA}_d} - dm_{\text{DNA}_y} = DN_a dm_{\text{água}} - DN_{\text{PEG}} dm_{\text{PEG}} \rightarrow$$

$$dm_{\text{DNA}} = -DN_a dm_{\text{água}} - DN_{\text{PEG}} dm_{\text{PEG}} \quad (4)$$

A equação (4) relaciona a variação do potencial químico do DNA (dm_{DNA}) com a variação do potencial químico dos outros componentes da solução. Para o “bulk” da solução, ou seja, para a solução que banha a macromolécula, podemos escrever uma segunda relação de Gibbs-Duhem:

$$n_a dm_{\text{água}} + n_{\text{PEG}} dm_{\text{PEG}} = 0 \quad (5)$$

No “bulk” da solução estão presentes apenas moléculas de água e do polímero. Dessa forma, a variação do potencial químico da água está relacionada à variação do potencial químico do soluto pela equação:

$$dm_{\text{PEG}} = - (n_a / n_{\text{PEG}}) dm_{\text{água}} \quad (6)$$

Sendo assim, não se pode alterar o potencial químico do soluto(PEG) sem que seja alterado o potencial químico da água no bulk da solução. Substituindo a equação (6) na equação (4) teremos:

$$\begin{aligned} dm_{\text{DNA}} &= - DN_a dm_{\text{água}} + DN_{\text{PEG}} (n_a / n_{\text{PEG}}) dm_{\text{água}} \rightarrow \\ - dm_{\text{DNA}} &= DN_a [1 - (DN_{\text{PEG}} / DN_a) (n_a / n_{\text{PEG}})] dm_{\text{água}} \quad (7) \end{aligned}$$

Supondo agora que não existe diferença de ligação do polímero neutro(PEG) com o DNA em qualquer dos seus dois estados, ou equivalentemente, que o potencial químico da macromolécula não depende **diretamente** do potencial químico do PEG, teremos:

55

$$-dm_{\text{DNA}} / dm_{\text{água}} = DN_a, \text{ visto que } DN_{\text{PEG}} = 0 \quad (8)$$

Dessa forma, a variação do número de moléculas de água associadas aos dois estados conformacionais do DNA pode ser encontrada acompanhando-se a variação do potencial químico da macromolécula(ou equivalentemente, medindo-se a razão entre a concentração dos dois estados conformacionais) com o potencial químico da água.

Pode-se reescrever a equação 8 em termos da pressão osmótica, pois $dm_{\text{água}} = -dP_{\text{osm}} \nu$ sendo ν o volume parcial molar da água.

$$dm_{\text{DNA}} / dP_{\text{osm}} = V_{\text{água}} \quad (9)$$

Para um mol de moléculas de DNA podemos escrever que:

$$d(-RT \ln K_{eq})/dP_{OSM} = V_{\text{água}} \quad (10)$$

A equação 10 foi utilizada para o cálculo do volume de água deslocado durante o curso da reação de condensação do DNA.

O uso da equação de Gibbs-Duhem para a análise dos volumes de água deslocados no curso de reações bioquímicas pela adição de solutos neutros (ou inertes) que estejam preferencialmente excluídos da superfície macromolecular, vem sendo feito para avaliar a importância do solvente na termodinâmica das mudanças conformacionais de macromoléculas biológicas, atividade enzimática, regulação alostérica e etc. Tal método vem sendo designado por estresse osmótico e se encontra detalhadamente descrito no trabalho de Parsegian e colaboradores (Parsegian et al, 1995).

Referências Bibliográficas

1. Blomfield, V.A. 1996. DNA condensation. *Curr. Opin. Struct. Biol*, **6**:334-341.
2. Blumstein, A. 1978. Liquid crystalline order in polymers. *Academic Press. Inc(London)*.
3. Bustamante, C., Samori, B., Builes, E.1991. Daunomycin inverts the long-range chirality of DNA condensed states. *Biochemistry*, **30**: 5661-5666
4. de Gennes, P.G.1979. Scaling concepts in polymer physics. 4ª Edição, capítulos 1, 3 e 4. *Cornell University Press, Ithaca- NY*.
5. de Vries, Renko.2001. Flexible polymer-induced condensation and bundle formation of DNA and F- actin filaments. *Biophys. J*, **80**: 1186-1194.
6. Grosberg, A. Y., Khokhlov, A. R. 1997. Giant Molecules. 1ª Edição. Academic Press. San Diego, CA- USA.
7. Hecht, E. 1991. Óptica. 2ª Edição, capítulo 8. Editora da Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa, Portugal.
8. Keller, D., Bustamante, C.1985. Theory of the interaction of light with large inhomogeneous molecular aggregates.II.Psi-type circular dichroism. *J. Chem.Phys*, **84**: 2972-2980.
9. Leforestier, A., Livolant, F.1997. Liquid crystalline ordering of nucleosome core particles under macromolecular crowding conditions: Evidence for a discotic columnar hexagonal phase. *Biophys. J*, **73**: 1771-1776.
- 10.Lerman, L.S.1973. Physico-chemical properties of nucleic acids, editado por J. Duchesne(Academic Press, NY)
- 11.Lerman, L.S.1971. A transition to a compact form of DNA in polymer solutions. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA*, **68**: 1886-1890.
12. Maestre, F.M., Reich, C.1980. Contribution of light scattering to the circular dichroism of Deoxyribonucleic Acid films, Deoxyribonucleic Acid-Polylysine complexes and Deoxyribonucleic Acid particles in ethanolic buffers. *Biochemistry*,**19**:5214-5223.
13. Minagawa, K., Matsuzawa, Y., Yoshikawa, K., Khokhlov, A.R., Doi, M.1994. Direct observation of the coil-globule transition in DNA molecules. *Biopolymers*, **34**:555-558.
- 14.Odijk, T.1983. On the statistics and dynamics of confined or entangled stiff polymers. *Macromolecules*, **16**:1340-1344.
- 15.Odijk, T.1993. Undulation-enhanced electrostatic forces in hexagonal polyelectrolyte gel. *Biophys Chem*, **46**:69-75.
- 16.Parsegian, V.A., Rand, P.R., Rau, D.C.1995. Energetics of Biological Macromolecules. *Meth. Enzymol*, **259**: 43-93.
- 17.Philip, J. R., Wooding, R.A.1969. Solution of the Poisson-Boltzmann equation about a cylindrical particle. *J. Chem. Phys*, **52**:953-959.
- 18.Podgornik, R., Strey, H.H., Rau, D.C., Parsegian, V.A.1995. Watching molecules crowd: DNA double helices under osmotic stress. *Biophys. Chem*, **57**:111-121.

19. Podgornik, R., Rau, D.C., Parsegian, V.A. 1989. The action of interhelical forces on the organization of DNA double helices: fluctuations-enhanced decay of electrostatic double-layer and hydration forces. *Macromolecules*, **22**: 1780-1786.
20. Rau, D.C., Lee, B., Parsegian, V.A. 1984. Measurement of the repulsive force between polyelectrolyte molecules in ionic solutions: Hydration forces between parallel DNA double helices. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**: 2621-2625.
21. Rau, D.C., Parsegian, V.A. 1992. Direct measurement of the intermolecular forces between counterion-condensed DNA double helices. *Biophys. J*, **61**: 246-259.
22. Rill, R.L. 1986. Liquid crystalline phase in concentrated aqueous solutions of Na⁺ DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**: 342-346.
23. Rodger, A., Norden, B. 1997. Circular dichroism and linear dichroism. Capítulos 1, 2 e 6. *Oxford University Press*.
24. Ubink, J., Odijk, T. 1995. Polymer-and-salt induced toroids of hexagonal DNA. *Biophys. J*, **68**: 54-61.
25. van Holde, K. E., Johnson, W.C., Ho, P.S. 1998. Principles of physical biochemistry. Printice-Hall, Inc. New Jersey, USA. Capítulos 1, 10 e 13.
26. van't Hoff, J. H. 1885. The role of osmotic pressure in the analogy between solutions and gases. *Zeits. Phys. Chem*, **1**: 481-508.
27. Vasilevskaya, V.V, Khokhlov, A.R., Matsuzawa, Y., Yoshikawa. 1995. Collapse of a single DNA molecule in poly(ethylene glycol) solutions. *J. Chem. Phys*, **102**: 6595-6602