

ESTUDO DA CONFORMAÇÃO DA INTERAÇÃO DNA-HISTONAS VIA ESPECTROSCOPIA DE FORÇA.

T. A. Soares¹, C.H.M Lima²

1. Professor Mestre de Física do Colégio Objetivo de Juazeiro do Norte CE

2. Estudante de doutorado do Laboratório de Física Biológica, UFV MG

Resumo:

A unidade fundamental da cromatina é o nucleossomo que consiste em, aproximadamente, 146 pares de bases do DNA enroladas ao redor de um octâmero central de proteínas conhecidas como histonas.

Ao longo das últimas duas décadas, o pinçamento óptico se tornou uma técnica para analisar os complexos DNA-HISTONA, através da técnica podemos retirar propriedades mecânicas exclusivas sobre conformações moleculares.

Nosso objetivo é caracterizar a interação DNA-Histonas mapeando as características dos condensados do DNA induzida pela histona, caracterizar a interação eletrostática no meio e retirar propriedades físico-química com isso podemos obter informações sobre como se dar interação no fio de cromatina.

Estudos desta natureza fornecem pistas importantes a respeito do mecanismo de ação do fármaco in vivo, conhecimento essencial para melhorar a eficiência dos tratamentos quimioterápicos já existentes.

Palavras-chave: Física Biológica; Macromoléculas; DNA-HISTONAS.

Apoio financeiro: CAPES, CNPq e FAPEMIG

Introdução:

O estudo das interações DNA-HISTONAS constitui um campo interdisciplinar de conhecimento, com importância fundamental tanto no entendimento de vários processos intracelulares básicos (divisão celular, transcrição, tradução). As proteínas histonas tem a função de regular o empacotamento do DNA, nessa dinâmica celular o DNA, varia sua conformação várias vezes [1].

A dinâmica celular está continuamente envolvida em uma "dançamolecular" com muitas proteínas. Estas proteínas são responsáveis por orquestrar o armazenamento, manutenção e transferência de informação genética [1]. Ao longo das últimas duas décadas, o pinçamento óptico se tornou uma técnica para analisar os complexos DNA-proteína, através da técnica podemos retirar propriedades mecânicas exclusivas sobre conformações moleculares.

A unidade fundamental da cromatina é o nucleossomo que consiste em, aproximadamente, 146 pares de bases do DNA enroladas ao redor de um octâmero central de proteínas conhecidas como histonas. Essas proteínas, inicialmente, foram consideradas como componentes meramente estruturais, mas agora são reconhecidas pelo importante papel que desempenham na manutenção do equilíbrio dinâmico da cromatina o octâmero é formado por quatro histonas que são H1, H2a, H2b, H3 e H4 [1].

Nosso objetivo é configurar a interação DNA-Histonas mapeando as características dos condensados do DNA induzida pela histona e em seguida analisar a interação DNA e Doxorubicina, estando o DNA condensado pela histona. Este tipo de experimento está numa conformação muito próxima que é encontrado no núcleo celular, onde o DNA está fortemente compactado formando a cromatina.

Metodologia:

Nesse trabalho, nós utilizamos pinçamento óptico, técnica experimental que consiste basicamente de um laser fortemente focalizado pela objetiva de um microscópio óptico. Ao interagir com pequenos objetos dielétricos, este laser é capaz de capturá-lo em um poço de potencial [2,3]. A Figura 1 mostra a montagem experimental utilizada para realização das medidas

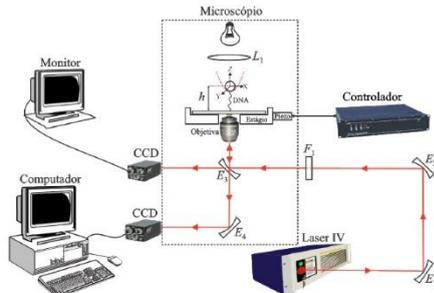


Figura 1: Montagem experimental utilizada para as medidas [4]

Nosso trabalho desenvolvido no Laboratório de Física Biológica do departamento de Física da Universidade Federal de Viçosa, consiste, basicamente, em estudarmos as alterações nas propriedades mecânicas do DNA ao interagir com fármaco e com as proteínas. A partir dos pontos experimentais conseguimos obter parâmetros mecânicos para a molécula de DNA e os complexos DNA - fármacos/compostos. Utilizando o modelo teórico deduzido por Marko e Siggia [5], ajustamos as curvas obtidas e extraímos os parâmetros importantes para as nossas análises que são: o comprimento de persistência, A (esse parâmetro nos fornece informação sobre a elasticidade da molécula) e o comprimento de contorno, L (é a distância ponta - à - ponta do polímero quando este se apresenta totalmente esticado). O modelo WLC prevê o comportamento da força em função da extensão para polímeros semi-flexíveis, como a molécula de DNA. Este comportamento pode ser resumido com a equação

$$F = \frac{k_B T}{A} \left[\frac{z}{L} + \frac{1}{4 \left(1 - \frac{z}{L}\right)^2} - \frac{1}{4} \right],$$

onde k_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura absoluta, A é comprimento de persistência e L o comprimento de contorno, z é a extensão da molécula de DNA. A Figura 2 descreve a curva típica da componente da força x extensão do DNA, o ajuste é feito utilizando o modelo WLC dado pela equação (1).

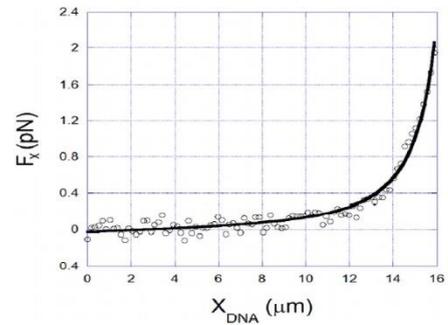


Figura 2: Curva de força X extensão para uma molécula de DNA do bacteriófago Lambda. Círculos: dado experimental. Linha sólida: ajuste com o modelo WLC [6]

Resultados e Discussão:

Na condensação do DNA, pouco se sabe sobre a magnitude e a origem das forças que atuam nas fibras de cromatina, que regulam as características genéticas. Estas fibras mudam de conformação de acordo com a evolução da compactação do DNA no ciclo celular.

Uma maneira de responder a estas perguntas é estirar uma única fibra de cromatina por suas extremidades para determinar padrões mecânicos como já discutidos anteriormente. Em nossos experimentos utilizamos um conjunto de histonas produzido pela Sigma-Aldrich, cujas proteínas foram extraídas de timo de bezerro as histonas produzida pela Sigma-Aldrich está na forma cristalizada e as proteínas contida são (H1, H2a, H2b, H3 e H4).

Nas figura 03 e 04 temos as curvas típicas força por extensão obtidos no regime de altas e baixas forças, para algumas concentrações de histona.

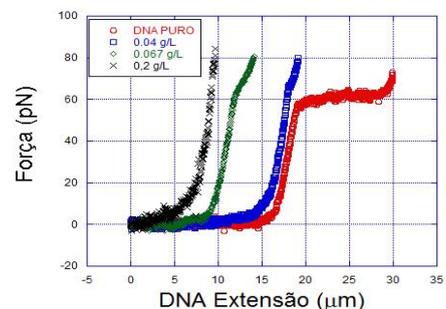


Figura 03. Curvas de força por extensão obtidos no regime de entálpico (altas forças). As curvas de variação de concentração de histonas, onde temos: o DNA puro representada pela cor vermelha $C_{histonas} = 0$; e as concentrações de histonas temos, azul $C_{histona} = 0,04g/L$; verde $C_{histona} = 0,0067g/L$; preto $C_{histona} = 0,2g/L$.

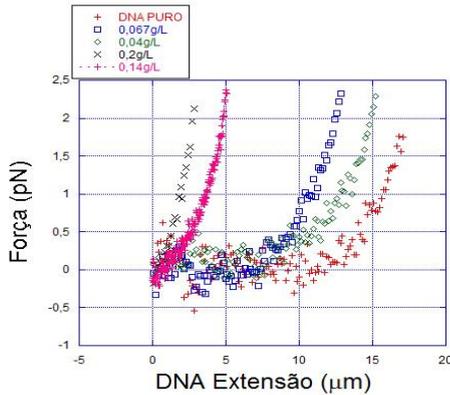


Figura 04: Curvas de força por extensão obtidas no regime entrópico (baixas forças). As curvas de variação de concentração de histonas, onde temos: o DNA puro representada pela cor vermelha $C_{histona} = 0$; e as concentrações de histonas temos, azul $C_{histona} = 0,04g/L$; verde $C_{histona} = 0,067g/L$; preto $C_{histona} = 0,14g/L$; roxo $C_{histona} = 0,2g/L$.

No regime de altas forças, podemos constatar um aumento na concentração de histona há uma diminuição no platô de desnaturação até a sua extinção. Sabemos que na dinâmica celular, o DNA compacta e descompacta, e uma das causas dessas mudanças de conformação da molécula é a sua interação com as histonas. As concentrações dessas proteínas variam de acordo com a função específica da cromatina [1]. Realizamos medidas variando a concentração de histonas no complexo de DNA e obtivemos padrões mecânicos da interação DNA-histona que estão relacionados com a condensação do DNA. As Figuras 05 e 06 descrevem esses resultados.

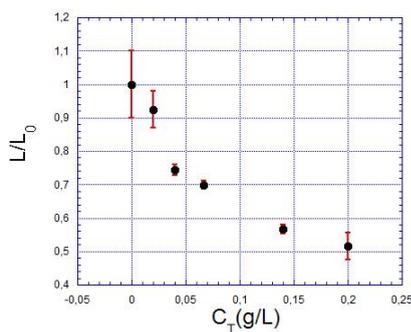


Figura 05: Gráfico do comprimento de contorno em função da variação de concentração de histonas

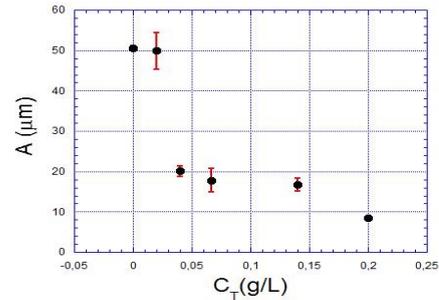


Figura 06: Gráfico do comprimento de persistência em função da variação de concentração de histonas

Podemos observar que, nas Figuras 05 e 06 quando aumentamos a concentração de histonas o comprimento de contorno e de persistência diminuem. Essas mudanças conformacionais mostram que a molécula está compactando.

Conclusões:

Podemos concluir que as histonas compactas o DNA fortemente. No desenvolvimento dos experimentos nós tentamos fazer medidas do complexo DNA-histona e em seguida intercalar o complexo usando Doxorrubicina, mas a estrutura do octâmero formado pelas histonas impede que o intercalante se acople nos pares de base do DNA [26,28,29]. Nossos próximos experimentos iremos manipular as concentrações de histonas para que o nucleossomo fique numa conformação que facilite a intercalação. Essa mudança estrutural da formação do octâmero é devido alguma anomalia em uma das proteínas que regulam o nucleossomo.

Referências bibliográficas

[1] D. P. Snustad, M. and J. Simmons, "Fundamentos de Genética", Guanabara Kogan 3, 185-237 (2001).

[2] A. Ashkin, "Acceleration and trapping of particles by radiation pressure", Phys. Rev. Lett. 24 (4), 156-159 (1970).

[3] A. Ashkin, J. M. Dziedzic, J. E. Bjorkholm, and S. Chu, "Observation of a singlebeam gradient force optical trap for dielectric particles", Optics Letters 11 (5), 288-290 (1986).

[4] F. A. P Crisafuli, "Caracterização das Interações do DNA com as Moléculas Actinomicina de Gelred.", Tese de Doutorado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil (2016).

[5] M. S. Rocha, "Pinças ópticas: experimento, teoria e aplicações no estudo das interações DNA-fármacos", Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil (2008).

[6] J. F. Marko and E. D. Siggia, "Stretching DNA", *Macromolecules* 28 (26), 87598770 (1995).

[8] J.D.Watson, T.A.Baker, S.P.Bell, A.Gann, M.L. evine and R.Losick, "Molecular Biology of the Gene", 5a Ed. Person Education 3, 185-237 (2004).

[9] F. Yanga, S. Tevesa, C. J. Kempb, and S. Henikoff, "Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics", *Biochim Biophys Acta*. 1841, 84-89 (2014).

[10] B. Pang, X. Qiao, L. Janssen, A. Velds, T. Groothuis, R. Kerkhoven, M. Nieuwland, H. Ovaa, S. Rottenberg, O.V.Tellingen, J. Janssen, P. Huijgens, W.Zwart and J. Neefjes, "Drug-induced histone eviction from open chromatin contributes to the chemotherapeutic effects of doxorubicin", *Nature Communications*. 122, 1-13 (2013).