



MÁSTERES de la UAM

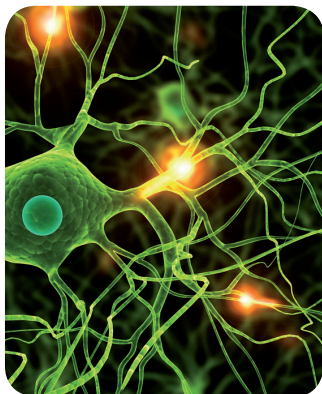
Facultad de Ciencias /12-13

Máster en Materiales
Avanzados



Estudio de la influencia de la secuencia en la respuesta elástica de dsDNA y dsRNA

Irene Gutiérrez Pérez



Estudio de la influencia de la secuencia en la respuesta elástica de dsDNA y dsRNA

Irene Gutiérrez Pérez¹

Director: J. Ricardo Arias González^{1,2,3}

Co-Director: Elías Herrero Galán²

Tutor: Daniel Jaque García⁴

¹ Dpto. Biomáquinas y manipulación de macromoléculas, IMDEA Nanociencia. C/Faraday 9, Cantoblanco, 28049 Madrid, España.

² Dpto. Estructura de Macromoléculas, Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC). C/Darwin 3, Cantoblanco, 28049 Madrid, España.

³ “Unidad de Nanotecnología” CNB-CSIC-IMDEA Nanociencia.

⁴ Dpto. Física de Materiales C-IV, Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, 28049 Madrid, España.

Correo electrónico: irene.gutierrezp@estudiante.uam.es

Consentimiento para que se publique en formato .pdf en www.uam.es/matavnan (rellenar Sí o No):

RESUMEN

Las atractivas propiedades que presentan los ácidos nucleicos han despertado un gran interés en el campo de la nanotecnología, no sólo por ofrecer la posibilidad de construir nuevos materiales que interactúen con las células, sino también por constituir una posible alternativa a los sistemas actuales de almacenamiento de datos. Debido a ello, se hace indispensable estudiar la estabilidad mecánica de estas moléculas e identificar cuáles pueden dar lugar a procesos más eficientes de almacenamiento y posterior procesamiento de la información. Una parte importante de este estudio debe centrarse en la influencia que sobre estas propiedades ejercen parámetros como la naturaleza de la molécula – DNA o RNA – o su secuencia. En este trabajo se ha llevado a cabo la síntesis de moléculas de dsDNA y dsRNA de la misma longitud y secuencia, variando su contenido en GC (35, 41, 47 y 60%), para su posterior análisis por Dicroísmo Circular y técnicas de manipulación y visualización de moléculas individuales – Pinzas Ópticas (OT) y Microscopía de Fuerzas Atómicas (AFM).

PALABRAS CLAVE: dsDNA, dsRNA, Dicroísmo Circular (CD), Pinzas Ópticas (OT), Microscopía de Fuerzas Atómicas (AFM).

1. INTRODUCCIÓN.

Los ácidos nucleicos, DNA y RNA, son las macromoléculas biológicas encargadas de almacenar y transmitir la información genética. Están formados por la disposición polimérica de cuatro monómeros diferentes – los desoxirribonucleótidos de adenina (dAMP), guanina (dGMP), timina (dTMP) y citosina (dCMP), en el DNA, y los ribonucleótidos equivalentes en el caso del RNA – unidos covalentemente a través de enlaces fosfodiéster, dando lugar a cadenas polares con una secuencia de bases específica en la que se encuentra codificada la información genética. Estas subunidades monoméricas están constituidas, a su vez, por: una base nitrogenada, compuesto heterocíclico derivado de la pirimidina (C, T, U) o la purina (A, G); una pentosa, monosacárido cíclico de cinco átomos de carbono (ribosa en el RNA y desoxirribosa en el DNA) y un ion fosfato.

La complementariedad existente entre las bases nitrogenadas que conforman este tipo de macromoléculas (A con T/U y G con C), provoca que dos cadenas simples antiparalelas (ssDNAs/ssRNAs) se enrollen una sobre la otra mediante numerosos puentes de hidrógeno, dando

lugar a una estructura de doble hélice (dsDNA/dsRNA), cuya estabilidad está determinada, principalmente, por las interacciones de apilamiento de sus bases. A su vez, esta complementariedad es responsable de la replicación del DNA y de la transmisión de la información genética. Ésta última se lleva a cabo en dos fases: la transcripción, donde un sistema enzimático convierte la información genética de un segmento de dsDNA en una cadena de ssRNA – salvo en algunos genomas virales, donde la información genética está almacenada en forma de RNA – y la traducción, donde el RNA sintetizado en la etapa anterior sirve de base para la formación de un polipéptido.

Las atractivas propiedades que presentan los ácidos nucleicos – programabilidad, manipulabilidad y biocompatibilidad – han hecho que se conviertan, en las últimas décadas, en la plataforma perfecta para el diseño y construcción de nuevos materiales que interactúen con las células [1-8] así como en una posible alternativa a los sistemas actuales de almacenamiento de datos, ofreciendo un soporte de gran capacidad, robusto y que ocupa poco espacio [9-10].

Si bien es verdad que en el campo de la nanotecnología el dsDNA ha sido más estudiado que el dsRNA – debido a la naturaleza lábil de los ssRNA y la falta de enzimas de restricción para este tipo de sustratos– en los últimos años ha crecido el interés por este último principalmente a causa de sus potenciales aplicaciones en nanomedicina gracias a su extraordinaria diversidad estructural y funcional [11-14]. Paralelamente, se han llevado a cabo estudios sobre las propiedades mecánicas de estos biopolímeros, consiguiéndose no sólo su caracterización individual bajo fuerzas nulas o muy pequeñas, sino también a valores altos de éstas, lo cual permite obtener información sobre el módulo elástico y las transiciones termodinámicas que sufren [15]. Continuando con esta línea de investigación, en este trabajo se ha llevado a cabo la síntesis de moléculas de dsDNA y dsRNA de la misma longitud y secuencia variando su contenido en GC, a fin de analizar el efecto de este parámetro tanto en la estabilidad relativa de ambas macromoléculas biológicas como en sus propiedades mecánicas. Para ello, se ha recurrido a las técnicas de Dicroísmo Circular (CD), Microscopía de Fuerzas Atómicas (AFM) y Pinzas Ópticas (OT).

2. MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1. Síntesis de moléculas de dsRNA con asas modificadas.

El proceso de síntesis llevado a cabo para la obtención de moléculas largas de dsRNA con asas modificadas, para su posterior manipulación en experimentos de pinzas ópticas, se basa en el protocolo descrito por Herrero-Galán et al. [15], el cual se fundamenta, a su vez, en el propuesto por Dekker et al. [16], incluyendo ligeras modificaciones a fin de incrementar el rendimiento y la eficiencia del proceso.

En primer lugar, se procedió a la amplificación de las secuencias de DNA con diferente contenido en GC – secuencia [3686, 7686] del plásmido pSP73-JYo (35%GC) y secuencias [26000,30000] (41%GC), [30286,34286] (47%GC) y [3100,7100] (60%GC) del bacteriófago λ – por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), técnica que permite, a partir de una muestra muy pequeña de DNA, la obtención de millones de copias de éste en pocas horas y sin necesidad de usar células vivas.

La mezcla de reacción (50 μ l) está compuesta por: 1.5 ng de DNA molde; dos oligonucleótidos sintéticos de DNA (a concentración 10 μ M), que actúan como cebadores o *primers*, siendo complementarios a los extremos de cada una de las dos cadenas de la doble hélice que se desea

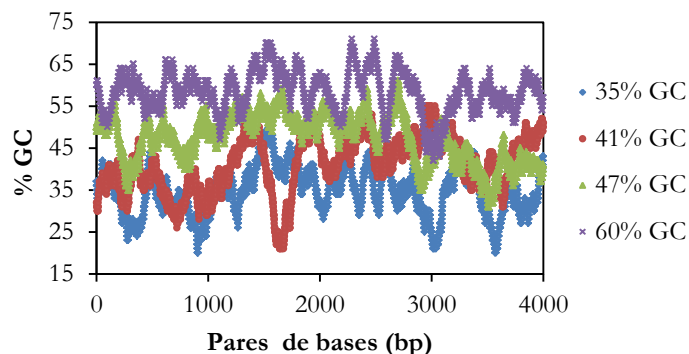


Fig.2.1. Contenido en GC de las secuencias de DNA seleccionadas.

amplificar; una enzima DNA polimerasa termoestable (Taq) y los cuatro desoxirribonucleótidos trifosfato (a concentración 10mM) –dATP, dGTP, dCTP y dTTP. Dicha mezcla se somete a 30 ciclos sucesivos, cada uno de ellos integrado por tres fases: *desnaturalización*, en la que las dos cadenas que conforman el DNA molde se separan por efecto del calentamiento de la mezcla a 94°C; *hibridación*, donde la temperatura de incubación se reduce – hasta 56°C durante los 10 primeros ciclos y hasta 62°C en los 20 restantes – para permitir el apareamiento de las bases de ambos cebadores en el sitio donde encuentran una secuencia complementaria y, por último, la *elongación*, etapa en la que la polimerasa replica las hebras de DNA, comenzando por el extremo 3' de los cebadores a una temperatura de 68°C. Al finalizar cada ciclo, la cantidad de DNA molde disponible para el ciclo siguiente aumenta al doble.

Como se puede observar en la Fig.2.2, se llevaron a cabo dos reacciones en paralelo, PCR1 y PCR2, las cuales únicamente difieren en los oligonucleótidos adicionados a la mezcla de reacción. En el primer caso, el oligonucleótido directo es el que incorpora al promotor de la T7 RNA polimerasa seguido de algunos nucleótidos no complementarios que servirán para la posterior ligación de las asas, mientras que en la PCR2 es el inverso el que los contiene. Los productos de reacción obtenidos se purificaron empleando el kit comercial *PCR Purification* de *Qiagen* y eluyendo en agua libre de RNasas.

A continuación, se procedió a la transcripción *in vitro* a partir de los dsDNA obtenidos (3h, 42°C) usando el kit comercial *HiScribe* de *New England Biolabs*, lo que genera dos moléculas de RNA de hebra simple (ssRNA) de 4-kbp, complementarias entre sí salvo por los nucleótidos añadidos en sus extremos 5' y las dos G extra que deja la T7 RNA polimerasa. Tras la adición de EDTA hasta 30mM, cada pareja de ssRNA hibrida lentamente por

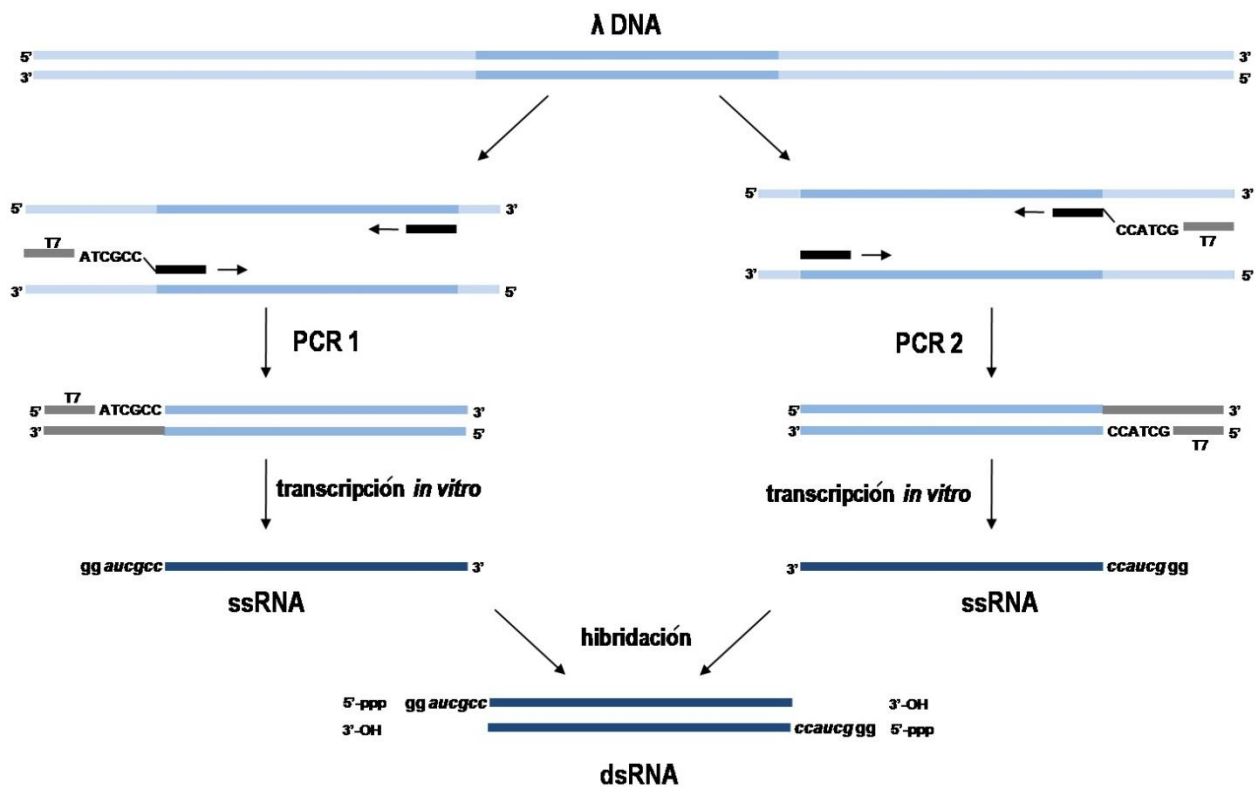


Fig.2.2. Esquema de la síntesis de una molécula de dsRNA con extremos no complementarios

calentamiento a 65°C durante una hora, enfriándose a continuación hasta temperatura ambiente a razón de 1.25°C/5 min, lo que da lugar a los dsRNA deseados (35, 41, 47 y 60 %GC) con extremos no complementarios a los que posteriormente se unirán las asas (véase Fig.2.2). Los transcritos obtenidos se purificaron con el kit comercial *RNeasy Purification* de *Qiagen*, eluyendo en agua libre de RNasas.

La eliminación del DNA molde se llevó a cabo por simple digestión con DNasa I *RNAse free* en presencia de inhibidor de RNasas e incubando la mezcla a 37°C durante una hora. El producto obtenido en cada caso se purificó con el kit comercial *RNeasy MinElute Cleanup* de *Qiagen*.

Dado que la reacción de transcripción da como resultado moléculas triplemente fosforiladas en el extremo 5', sobre las que no podría actuar posteriormente la T4 RNA ligasa de forma correcta, se procedió primero a su desfosforilación mediante la enzima CIP y, a continuación, a su monofosforilación, usando la enzima T4 PNK e incubando las muestras a 37°C durante 1h. Tras cada reacción, los productos obtenidos fueron purificados con el kit comercial *RNeasy Purification* de *Qiagen*.

En cuanto a la síntesis de las asas modificadas, ésta se llevó a cabo de manera análoga, partiendo esta vez de una secuencia molde más corta – [23137,23630] del bacteriófago λ – e introduciendo nucleótidos no complementarios que hibridasen

posteriormente con los de los extremos de la molécula principal. Además, para las reacciones de transcripción fue necesario preparar una mezcla de nucleótidos que incluyese la proporción adecuada de Digoxigenina-11-UTP, en un caso, y Biotina-16-UTP, en el otro (Fig.2.3).

La ligación de las asas con cada uno de los dsRNAs obtenidos (35, 41, 47 y 60%GC), en presencia de la enzima T4 RNA Ligasa y a una temperatura de 16°C durante 16h, dio lugar a la molécula completa de dsRNA deseada, lista para su manipulación en experimentos de pinzas ópticas previa purificación con el kit comercial *RNeasy Purification* de *Qiagen*.

2.2. Síntesis de moléculas de dsDNA con asas modificadas.

La síntesis de moléculas de dsDNA equivalentes en longitud (4kbp) y secuencia a las de dsRNA se llevó a cabo por simple amplificación por PCR de las secuencias que sirven de molde para la transcripción, introduciendo por mutagénesis dirigida dos dianas de restricción diferentes, KpnI y SacI, necesarias para generar extremos cohesivos que facilitarían la posterior adición de las asas [15]. Los productos de reacción obtenidos se purificaron empleando el kit comercial *PCR Purification* de *Qiagen*.

En lo que respecta a las asas, éstas fueron sintetizadas de manera análoga, partiendo ahora de la

secuencia [23137,23630] del bacteriófago λ y usando desoxirribonucleótidos modificados con Biotina-16-UTP, en un caso, y Digoxigenina-11-UTP, en el otro. De nuevo, los productos de reacción fueron purificados con el kit *PCR Purification* de *Qiagen*.

Como, al igual que la molécula principal, cada asa incluía en uno de sus extremos una de las dianas

de restricción, procediendo a la digestión de las mismas a 37°C durante 16h, seguida de un periodo de incubación a 65°C durante 20 min para la inactivación de las enzimas, se obtuvieron los tres fragmentos compatibles necesarios para su ligación unívoca con la T4 DNA Ligasa a 16°C durante 16h (*Fig.2.4*).

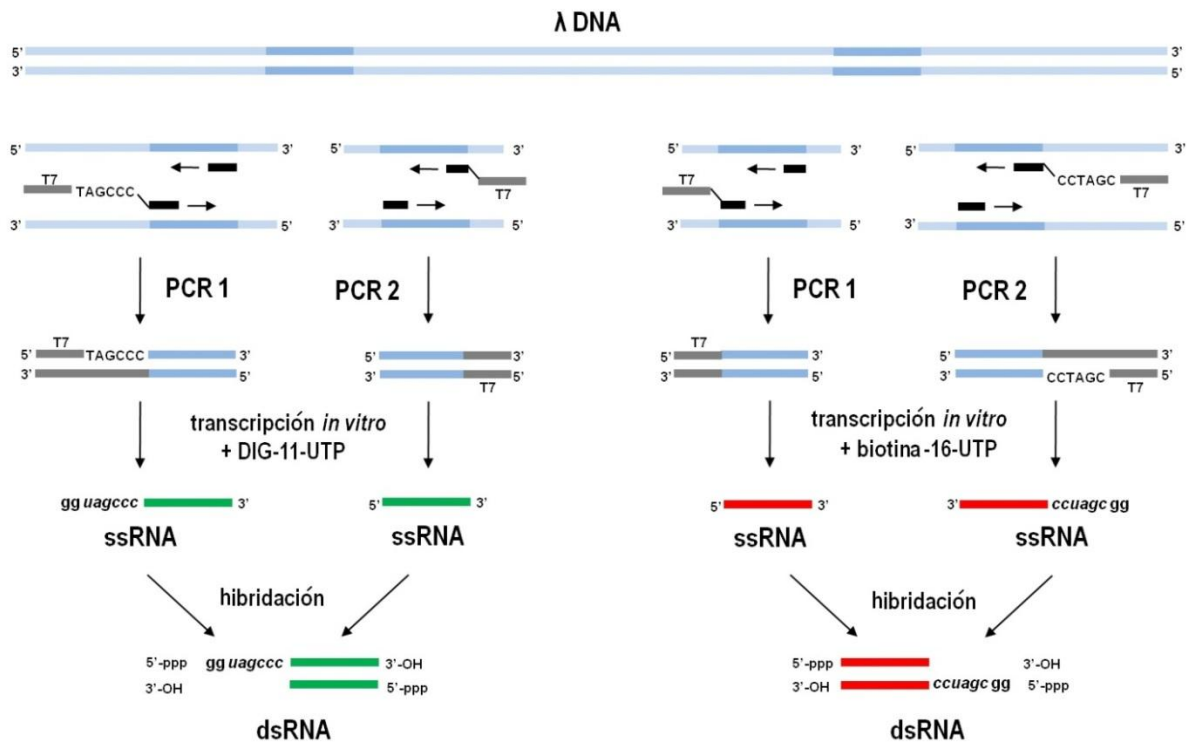


Fig.2.3. Esquema de la síntesis de asas modificadas de dsRNA para su posterior ligación a la molécula principal.

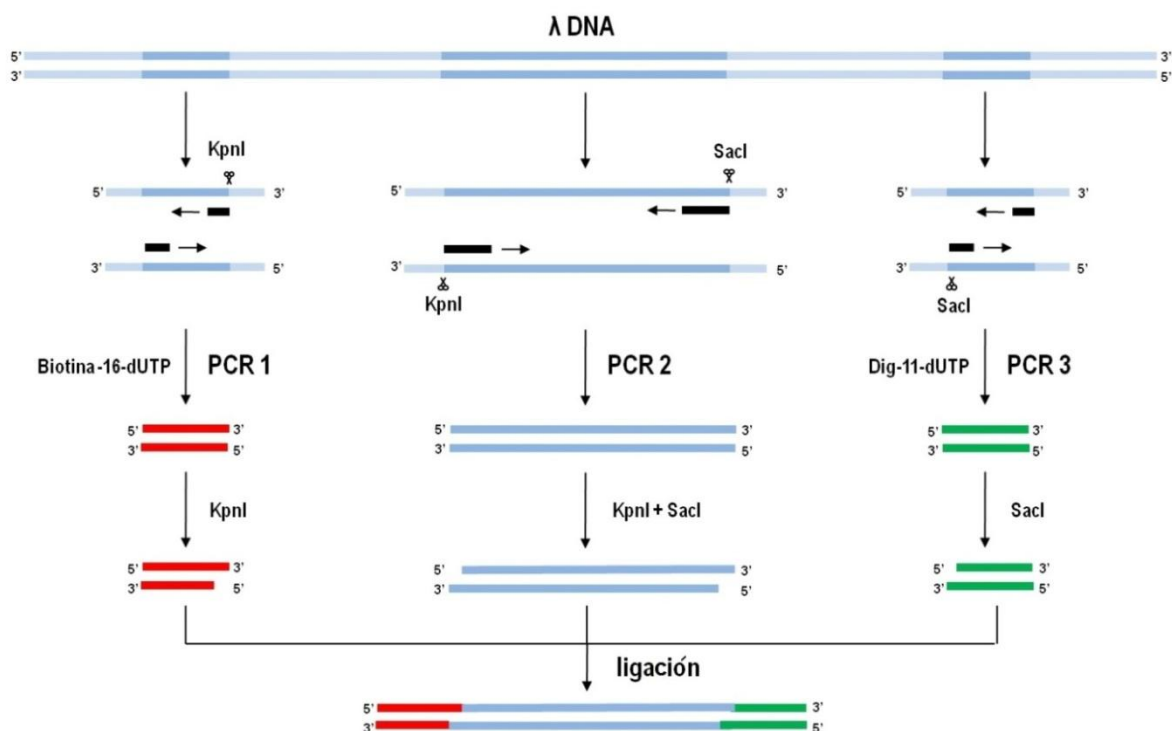


Fig.2.4. Esquema de la síntesis de moléculas de dsDNA equivalentes en longitud y secuencia a las de dsRNA para la comparación de ambas mediante técnicas de manipulación y visualización a nivel molecular.

2.3. Dicroísmo Circular.

El Dicroísmo Circular (CD) es una técnica espectroscópica que permite obtener información sobre la estructura secundaria de macromoléculas biológicas, tales como proteínas u ácidos nucleicos, determinando la diferencia entre las absorbancias de las componentes de la luz polarizada usada como fuente. Dicha diferencia se debe a la interacción que sufre cada una de estas componentes polarizadas circularmente con los centros quirales de las moléculas presentes en el medio, lo cual induce un desfase y un cambio de magnitud en ellas, provocando no sólo la distorsión elíptica del plano de polarización, sino también su rotación en un ángulo α . Esta desviación se debe al cambio en el índice de refracción entre la luz polarizada circularmente a la izquierda y a la derecha [17-18].

Se define en términos de elipticidad; es decir, de la tangente de la relación entre los ejes menor y mayor de la elipse formada por el plano de polarización, expresada en unidades de $\text{grado} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$, generalmente [19].

Los espectros registrados para las moléculas de dsDNA y dsRNA sintetizadas— antes de su ligación con las asas modificadas— se llevaron a cabo en un espectropolarímetro Jasco 815, diluyendo las muestras en tampón Tris 10mM con NaCl 150mM y 1mM de EDTA a pH=8 y usando una cubeta de cuarzo con un paso óptico de 0.1 cm.

2.4. Microscopía de Fuerzas Atómicas.

El AFM es un instrumento capaz de caracterizar la superficie de muestras con resolución nanométrica. Su principio de funcionamiento consiste en barrer la superficie por medio de una punta muy afilada, denominada sonda, que se encuentra localizada al final de una micropalanca muy blanda llamada *cantilever*. Manteniendo constante un parámetro dependiente de la deformación de éste último — producida por la interacción entre los

átomos de la punta y los de la muestra — es posible obtener información sobre la topografía de la superficie.

Para la caracterización por AFM de las moléculas de DNA sintetizadas, se llevaron a cabo dos protocolos. En un principio, se prepararon diluciones 1/2, 1/5 y 1/10 de los DNAs y se depositaron sobre mica recién exfoliada junto con un tampón que contenía Tris acetato 25mM, acetato de magnesio 2.5mM y NiCl₂ 2.5mM. Tras 30 s, se aclaró la superficie de la mica con 3mL de agua Milli-Q filtrada y se secó con nitrógeno. Debido a las dificultades encontradas para la correcta visualización de las moléculas, se desarrollaron unas nuevas condiciones de deposición consistentes en la funcionalización de la mica, recién exfoliada, con NiCl₂ 10mM durante 1 min., aclarado con agua Milli-Q filtrada y secado al aire y, a continuación, deposición del dsDNA correspondiente y secado al aire.

Las imágenes se obtuvieron con los AFMs Nanowizard II (JPK) y Cervantes (Nanotec Electrónica S.L.), operando el primero de ellos en modo *tapping* — donde un pequeño piezo oscila y hace vibrar al *cantilever* y a la punta a una frecuencia cercana a su frecuencia de resonancia, induciendo una señal sinusoidal cuya amplitud se amortigua al aproximarse a la superficie — y el segundo, en *jumping* — modo de contacto intermitente en el que el *cantilever* no se hace oscilar sino que se aproxima y retrae en cada punto, detectando la altura a la cual se alcanza una determinada deflexión del mismo, lo cual permite un mayor control de la fuerza máxima que la punta ejerce sobre la muestra. En ambos casos se trabajó en atmósfera de aire y se usaron puntas NSG30 de NT-MDT (frecuencia de resonancia ~320KHz; constante de fuerza ~40N/m). Para el procesamiento de las imágenes se recurrió al software propio de JPK y al WSxM [20].

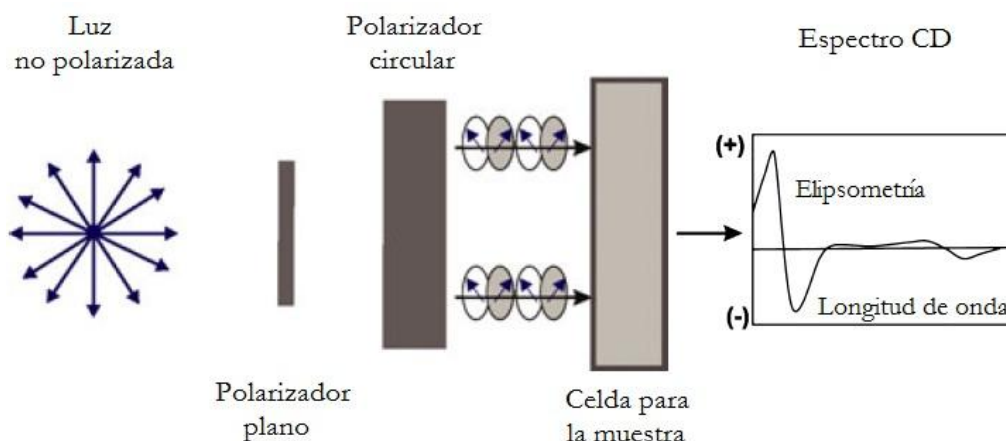


Fig. 2.5. Esquema del funcionamiento de un espectropolarímetro o dicrógrafo circular. [17]

2.5. Pinzas Ópticas.

Las Pinzas Ópticas (OT) constituyen un dispositivo de manipulación a nivel molecular que permite medir las fuerzas ejercidas sobre partículas atrapadas en una trampa óptica. Dicha trampa se genera a través de dos haces láser contrapropagantes ($\lambda=835$ nm) que focalizan en un mismo punto. El sensor de fuerzas se basa en medidas del cambio del momento lineal del haz lumínico y se calibra por primeros principios; es decir, a través del cambio de flujo de momento de la luz, lo que hace que la calibración no dependa del tamaño, forma, posición o índice de refracción de la partícula atrapada ni de la viscosidad o índice de refracción del tampón ni de las variaciones en la potencia del láser [21]. El rango de fuerzas accesible se encuentra comprendido entre 0.1-200 pN.

Las moléculas de dsDNA y dsRNA que van a ser sometidas a estiramiento en este dispositivo han sido previamente funcionalizadas en sus extremos con modificaciones complementarias a las de las microesferas de poliestireno a las que se pretenden enganchar (*véanse apartados 2.1 y 2.2*). La microesfera recubierta de anticuerpo anti-digoxigenina – cuya suspensión ha sido incubada previamente con la muestra que se desea estudiar – es atrapada ópticamente, mientras que la recubierta con estreptavidina es succionada por la parte superior de una micropipeta situada en el interior de una cámara de fluidos (*Fig.2.6*).

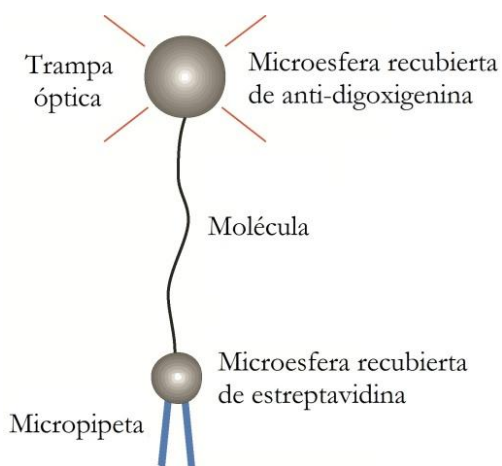


Fig.2.6. Representación de una molécula de doble cadena que va a ser sometida a estiramiento en OT [22].

La fuerza ejercida sobre las moléculas se genera mediante el movimiento relativo de la micropipeta con respecto a la microesfera atrapada ópticamente a través del desplazamiento de los piezoeléctricos correspondientes, determinándose su extensión por la distancia entre los centros de ambas microesferas.

Los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) usando, como

tampón de ensayo, Tris 10mM con NaCl 150mM y 1mM de EDTA a pH=8. En lo que respecta a la muestra adecuadamente modificada, se preparó una dilución 1/5 y se incubaron 3 μl de la misma con 3 μl de suspensión de bolas de poliestireno recubiertas de anti-digoxigenina y 3 μl de tampón durante 10 min con agitación ocasional por pipeteo. Transcurrido ese tiempo, se llevó la mezcla a un volumen final de 500 μl con el tampón de ensayo y se fluyó en la cámara de las pinzas, en la que previamente se habían introducido bolas de poliestireno recubiertas de estreptavidina (2 μl de suspensión de bolas en 400 μl de tampón de ensayo). Los ciclos de estiramiento y relajación se tomaron a una velocidad de 500 nm/s.

3. RESULTADOS.

3.1. Electroforesis en geles de agarosa.

Con el fin de verificar durante el proceso de síntesis que las moléculas obtenidas presentaban el tamaño deseado – 4kbp – se procedió a la electroforesis de las mismas en geles de agarosa (1% p/v). Como los ácidos nucleicos poseen carga neta negativa debido a la ionización de los numerosos grupos fosfato presentes en su estructura, al ser sometidos a un campo eléctrico (100V/cm) se produce la migración de éstos hacia el polo positivo, dependiendo su movilidad de las dimensiones que presenten. Así, aquellas moléculas que sean más grandes se desplazarán más lentamente a través de los poros del gel.

Los resultados obtenidos se muestran en las *Fig.3.1* y *3.2*. Para la visualización de las bandas se utilizó el agente de tinción bromuro de etidio, compuesto fluorescente bajo luz UV y, como patrón de masa molecular, 1kbp.

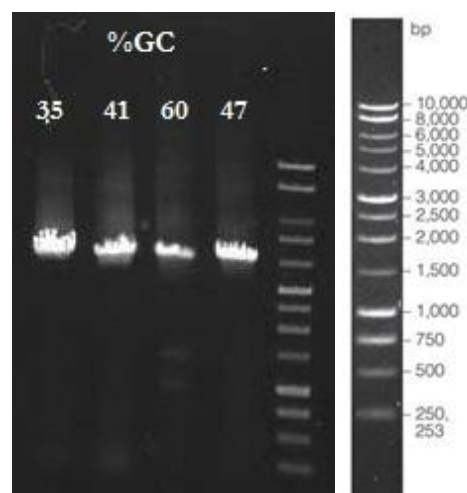


Fig.3.1. Resultado obtenido tras la electroforesis en gel de agarosa (1% p/v) de las moléculas de dsDNA sintetizadas, comprobándose que la longitud de las mismas es de aproximadamente 4kbp.

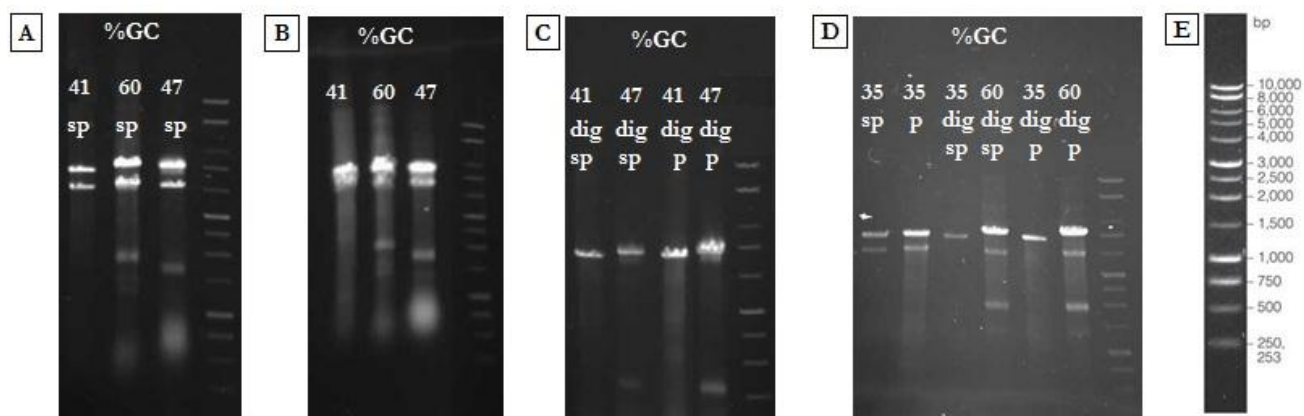


Fig.3.2. Resultado obtenido tras la electroforesis en geles de agarosa (1% p/v) de: dsRNAs del 41, 60 y 47%GC sin purificar (a) y purificados (b); (c) dsRNAs del 41 y 47% GC tras la eliminación del DNA molde por digestión (dig) y (d) dsRNA del 35%GC sin purificar (sp), purificado (p) y dsRNAs del 35 y 60%GC tras la eliminación del DNA molde. A la dcha. de cada una de las imágenes aparece el patrón de masa molecular utilizado, a su vez detallado en (e), comprobándose que el tamaño de las moléculas sintetizadas es de, aproximadamente, 4kbp.

3.2. Dicroísmo Circular.

Con objeto de mostrar el efecto del contenido en GC en la estructura secundaria de moléculas de dsDNA y dsRNA de la misma longitud y secuencia se muestra, en las Fig.3.3a y 3.3b, la superposición de sus espectros de Dicroísmo Circular.

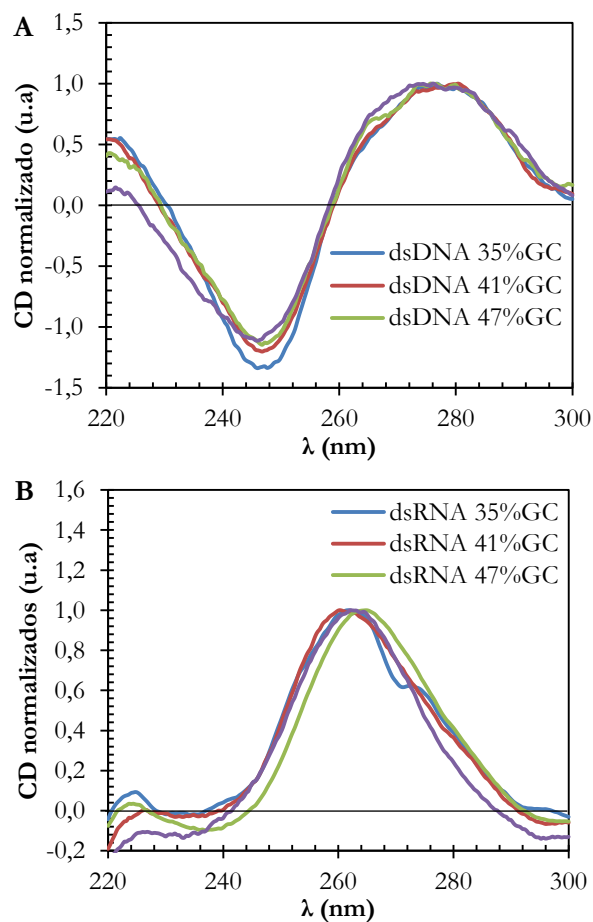


Fig.3.3. Superposición de los espectros de CD normalizados de las moléculas de dsDNA (a) y dsRNA (b) sintetizadas.

Asimismo, se ha establecido una comparativa entre los espectros de las moléculas de dsDNA y dsRNA con el mismo contenido en GC, mostrándose, como ejemplo, la correspondiente al 47%GC (véase Fig.3.4).

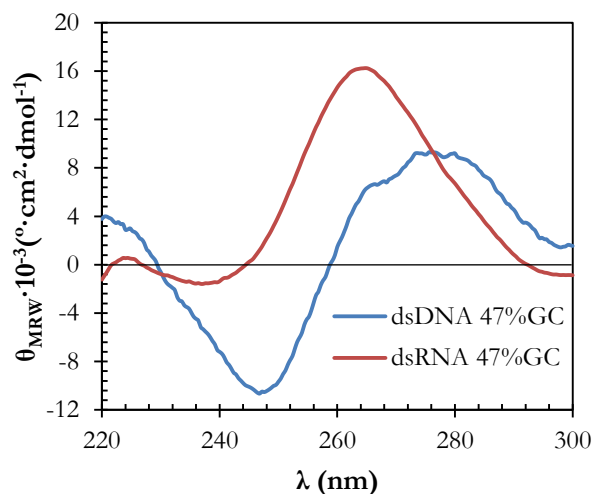


Fig.3.4. Espectros de Dicroísmo Circular de moléculas de dsDNA y dsRNA de la misma longitud, secuencia y contenido en GC.

Los espectros CD obtenidos para las moléculas de DNA se corresponden con la conformación denominada *forma B*, la cual presenta dos bandas características: una positiva, a aproximadamente 280nm, y otra negativa, en torno a los 245nm [18, 23-24]. Dicha conformación se encuentra típicamente cuando se estudia DNA en disolución en condiciones fisiológicas.

En cuanto a los espectros de dsRNA, estos se corresponden con la conformación denominada *forma A*, la cual se caracteriza por poseer una banda intensa positiva a 260nm aprox. y otra negativa en torno a los 230nm.

3.3. Imágenes de AFM.

En la *Fig. 3.5* se muestra un ejemplo de las primeras imágenes obtenidas con AFM tras la deposición de las muestras de DNA con tampón Tris acetato 25mM, acetato de magnesio 2.5mM y NiCl_2 2.5mM.

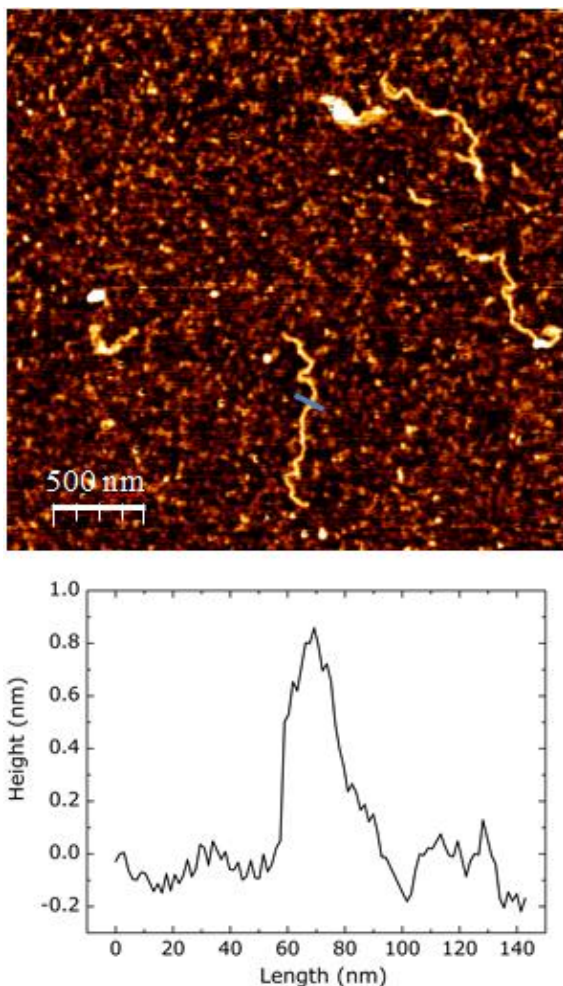


Fig.3.5. Moléculas de dsDNA del 41%GC – procedentes de una dilución 1/2 – depositadas sobre mica recién exfoliada junto con tampón Tris acetato 25mM, acetato de magnesio 2.5mM y NiCl_2 2.5mM, mostrándose el perfil de altura sobre la mica de una de ellas.

Debido a los problemas de agregación de las moléculas y la alta concentración de sales en el medio, se decidió cambiar las condiciones de deposición. En primer lugar, se funcionalizó la superficie de la mica recién exfoliada con NiCl_2 10mM durante 1 min. y, tras su aclarado y secado al aire, se depositó la muestra de dsDNA correspondiente. Ejemplos de imágenes así obtenidas se recogen en las *Fig.3.6 y 3.7*.

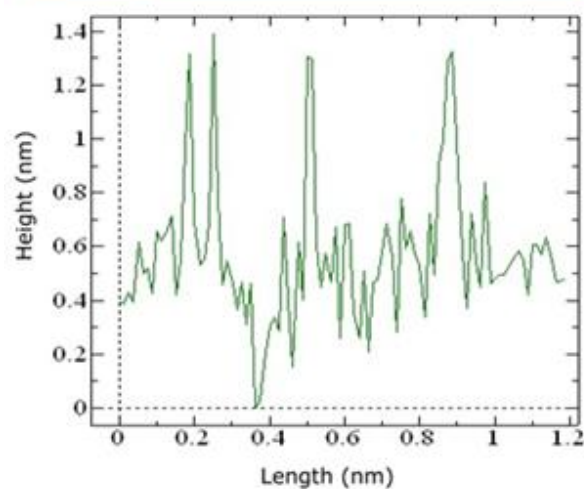
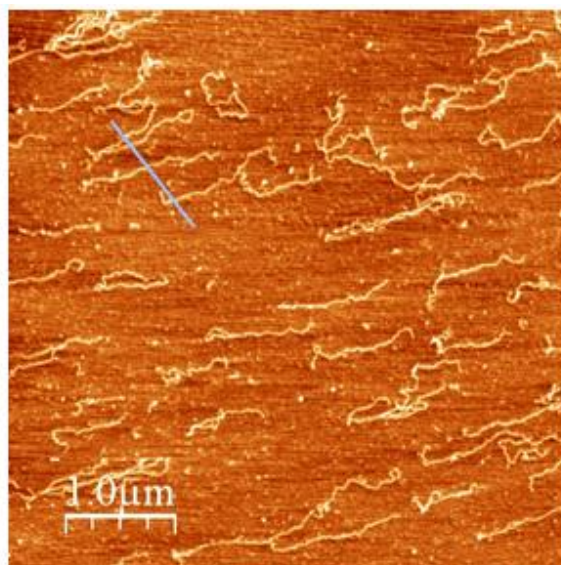


Fig.3.6. Moléculas de dsDNA del 47%GC.

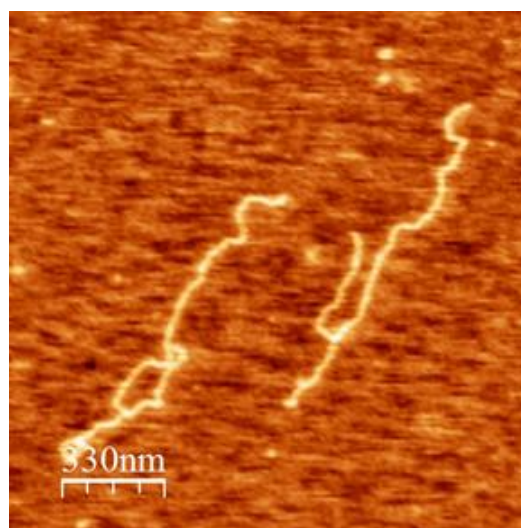


Fig.3.7. Moléculas de dsDNA del 60%GC.

3.4. Pinzas Ópticas.

Tras la funcionalización de los extremos de las moléculas de dsDNA sintetizadas con modificaciones complementarias a las microesferas de poliestireno recubiertas de anti-digoxigenina y estreptavidina, se procedió a comprobar su buen funcionamiento en OT, obteniéndose resultados positivos. En la Fig.3.8 se muestra, a modo de ejemplo, la curva fuerza-extensión obtenida para una molécula de dsDNA del 47%GC. Como se puede observar, la molécula se desenrolla a fuerzas cercanas a 120 pN (*overstretching plateau*), en contraste con lo que ocurre cuando una molécula contiene *nicks* – discontinuidades ocasionadas por la rotura de uno o varios enlaces fosfodiéster entre nucleótidos adyacentes de una de las hebras – o una de sus hebras no está sujeta a una de las bolas, desenrollándose, entonces, a fuerzas cercanas a 65 pN. Ello se debe a que la molécula estaba ligada por ambas hebras y ambos extremos a las esferas de poliestireno, encontrándose en una situación conocida como *torsional constraint*.

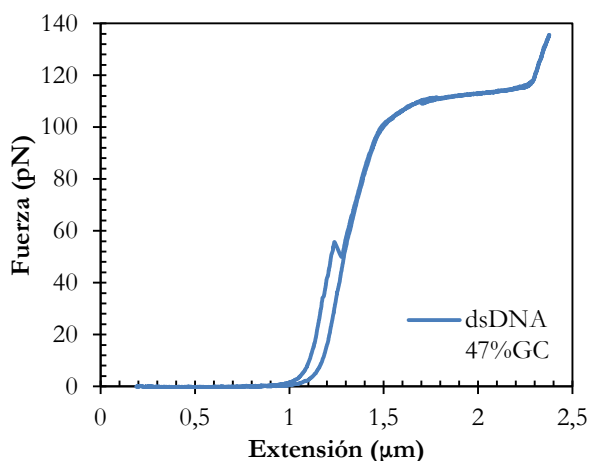


Fig.3.8. Curva fuerza-extensión obtenida para una muestra de dsDNA del 47%GC.

4. ANÁLISIS DE RESULTADOS.

Las estructuras secundarias de las moléculas de dsDNA y dsRNA sintetizadas han sido determinadas mediante la técnica espectroscópica de Dicroísmo Circular – conformaciones B y A, respectivamente. La superposición de sus espectros muestra que, en el caso de las moléculas de dsDNA (véase Fig.3.3a), un aumento del contenido en GC supone un desplazamiento de la banda positiva hacia longitudes de onda menores y una disminución de la amplitud de la banda negativa, signo de que los espectros adquieren características de forma A. En el caso de las moléculas de dsRNA (Fig.3.3b), se observa un desplazamiento de las bandas hacia longitudes de onda mayores y un ligero incremento de la amplitud de la banda negativa. En lo que respecta a la

comparativa entre moléculas de la misma secuencia, se observa, en todos los casos, un desplazamiento del espectro de dsRNA con respecto al de dsDNA hacia longitudes de onda menores (véase ejemplo Fig.3.4).

Las primeras imágenes obtenidas por AFM para las muestras de dsDNA del 41, 47 y 60% muestran hebras de dsDNA con alturas de aproximadamente 1nm y longitudes en torno a 1.4µm, lo cual concuerda con lo recogido en bibliografía [15], no observándose diferencias significativas al aumentar el contenido en GC. El segundo protocolo de deposición – funcionalización de la mica con NiCl₂ y deposición de la muestra tras aclarado y secado al aire de la superficie – permitió eliminar los problemas de agregación de moléculas y alta concentración de sales en el medio, mejorándose así la visualización de las moléculas.

En cuanto a la manipulación de las moléculas de dsDNA modificadas en sus extremos mediante experimentos con OT, se ha verificado el buen funcionamiento de las mismas y se han registrado unas primeras curvas fuerza-extensión.

5. CONCLUSIONES.

En este trabajo se ha llevado a cabo la síntesis de moléculas de dsDNA y dsRNA de la misma longitud y secuencia, variando su contenido en GC (35, 41, 47 y 60%) para su posterior análisis por DC y técnicas de manipulación y visualización de moléculas individuales – AFM y OT.

Mediante Dicroísmo Circular, se han determinado las estructuras secundarias de ambos biopolímeros – forma A para el dsRNA y forma B, para el dsDNA – y se ha descrito, cualitativamente, el efecto del contenido en GC en las mismas. En el caso de las moléculas de dsDNA, se ha observado que un incremento de GC en la secuencia desplaza los espectros hacia características de forma A mientras que en lo que respecta a las moléculas de dsRNA, los cambios son mucho menos acusados.

Asimismo, se ha optimizado el procedimiento de deposición de moléculas de dsDNA sobre mica recién exfoliada y se han conseguido visualizar éstas mediante AFM, obteniéndose longitudes y alturas de las mismas que concuerdan con lo recogido en bibliografía.

Por último, se ha verificado el buen funcionamiento de las moléculas de dsDNA modificadas en experimentos de Pinzas Ópticas, consiguiéndose unas primeras curvas fuerza-extensión. Aunque aún se deben completar estos experimentos, el éxito alcanzado tanto en el diseño

de las moléculas como en la puesta a punto del sistema supone un paso importante de cara a trabajos futuros. En concreto, se pretende llevar a cabo un estudio comparativo entre las moléculas de dsDNA y dsRNA sintetizadas a fin de conocer la influencia que ejerce el contenido en GC tanto en la estabilidad relativa de ambas macromoléculas biológicas como en sus propiedades mecánicas.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha llevado a cabo gracias a la Beca de Iniciación a la Investigación concedida por el Instituto Madrileño de Estudios Avanzados en Nanociencia.

Deseo mostrar mi agradecimiento a la Dra. Rebeca Bocanegra, por enseñarme el montaje de cámaras de microfluídica; al Dr. Santiago Casado, por su ayuda en la toma de imágenes de AFM y posterior tratamiento con el software WSxM y al Dr. Borja Ibarra y al estudiante de doctorado José Alberto Morín, por su ayuda en el manejo de OT. Finalmente, agradecemos al Dr. José María Valpuesta su apoyo a esta investigación.

BIBLIOGRAFÍA

- [1]. Peng, S.; Derrien, T.L.; Cui, J.; Xu, C.; Luo, D. *Materials Today* **2012**, 15 (5): 190–194.
- [2]. Chhabra, R.; Sharma, J.; Liu, Y.; Rinker, S.; Yan, H. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2010**, 62: 617–625.
- [3]. Seeman, N.C. *Annu. Rev. Biochem.* **2010**, 79: 65–87.
- [4]. Lee, J.B.; Campolongo, M.J.; Kahn, J.S.; Roh, Y.H.; Hartmana, M.R.; Luo, D. *Nanoscale* **2010**, 2: 188–197.
- [5]. Roh, Y.H.; Lee, J.B.; Kiatwuthinon, P.; Hartman, M.R.; Cha, J.J.; Um, S.H.; Muller, D.A.; Luo, D. *Small* **2011**, 7 (1): 74–78.
- [6]. Um, S.H.; Lee, J.B.; Park, N.; Kwon, S.Y.; Umbach, C.C.; Luo, D. *Nature Materials* **2006**, 5: 797 – 801.
- [7]. Peñaranda, A.A.; Londoño López, M.E. *Revista Ingeniería Biomédica* **2009**, 3 (5): 83-94.
- [8]. Park, N.; Um, S.H.; Funabashi, H.; Xu, J.; Luo, D. *Nature Materials* **2009**, 8: 432- 437.
- [9]. Church, G.M.; Gao, Y.; Kosuri, S. *Science* **2012**, 337(6102): 1628.
- [10]. Goldman, N.; Bertone, P.; Chen, S.; Dessimoz, C.; LeProust, E.M.; Sipos, B.; Birney, E. *Nature* **2013**, 494 (7435): 77-80.
- [11]. Guo, P. *Nature Nanotechnology* **2010**, 5 (12): 833–842.
- [12]. Shukla, G.C.; Haque, F.; Tor, Y.; Wilhelmsson, L.M.; Toulmé, J.J.; Isambert, H.; Guo, P.; Rossi, J.J.; Tenenbaum, S.A.; Shapiro, B.A. *American Chemical Society* **2011**, 5 (5): 3405-3418.
- [13]. Bumcrot, D.; Manoharan, M.; Koteliensky, V.; Sah, D.W.Y. *Nature Chemical Biology* **2006**, 2 (12): 711-719.
- [14]. Hannon, G.J. *Nature* **2002**, 418: 244-251.
- [15]. Herrero-Galán, E.; Fuentes-Perez, M.E.; Carrasco, C.; Valpuesta, J.M.; Carrascosa, J.L.; Moreno-Herrero, F.; Arias-González, J.R. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135: 122–131.
- [16]. Dekker, N.H.; Abels, J.A.; Veenhuizen, P.T.M.; Bruinink, M.M.; Dekker, C. *Nucleic Acids Research* **2004**, 32 (18), e140.
- [17]. Ranjbar, B. and Gill, P. *Chem Biol Drug Des* **2009**, 74: 101–120.
- [18]. Kypr, J.; Kejnovská, I.; Renčíuk, D.; Vorlíčková, M. *Nucleic Acids Research* **2009**, 37 (6): 1713–1725.
- [19]. Berova N., Nakanishi K., Woody R.W. (2000) *Circular Dichroism: Principles and Applications*, 2ª Edición. New York, USA: Wiley-VCH.
- [20]. Horcas, I.; Fernández, R.; Gómez-Rodríguez, J.M.; Colchero, J.; Gómez-Herrero, J.; Baro, A.M. *Rev. Sci. Instrum.* **2007**, 78, 013705.
- [21]. Smith, S.B.; Cui, Y.; Bustamante, C. *Methods Enzymol.* **2003**, 361: 134-162.
- [22]. Hormeño, S.; Ibarra, B.; Carrascosa, J.L.; Valpuesta, J.M.; Moreno-Herrero, F.; Arias-Gonzalez, J.R. *Biophysical Journal* 2011, 100 (8): 1996-2005.
- [23]. Ivanov, V.I.; Minchenkova, L.E.; Schyolkina, A.K.; Poletayev, A.I. *Biopolymers* **1973**, 12: 89-110.
- [24]. Brahm, J.; Mommaerts, W.F. *J. Mol. Biol.* **1964**, 10: 73-88.
- [25]. Perea, J.; Tormo, A.; García, J.L. *Ingeniería Genética*. Vol. I, Editorial Síntesis.
- [26]. Nelson, D.L.; Cox, M.M. *Lehninger. Principios de Bioquímica*. 5ª Edición. Omega.
- [27]. Sambrook, J. and Russell, D.W. *Molecular Cloning. A laboratory Manual*. Vol. I y II. 3ª Edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- [28]. Faraldos, M. and Goberna, C. (eds.). *Técnicas de Análisis y Caracterización de Materiales*. Consejo Superior de Investigaciones Científicas (2012).