



Propriedades Mecânicas (além do regime linear) de Fragmentos de DNA com Sequências Especiais

João Pedro Dadario Pereira

Orientação: Prof. Dr. Douglas Soares Galvão  *1

¹Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil.
Instituto de Física Gleb Wataghin - IFGW

Resumo: Este estudo tem como propósito a avaliação da estabilidade estrutural de microssatélites, sequências de repetições de nucleotídeos no DNA, mediante a investigação de possíveis correlações entre a instabilidade energética dessas estruturas e sua predisposição à algumas doenças genéticas. Para atingir esse objetivo, serão realizadas simulações computacionais por meio métodos de Dinâmica Molecular clássica e métodos quânticos. A abordagem metodológica adotada compreenderá uma análise detalhada das propriedades estruturais e dinâmicas dos microssatélites em diversos contextos energéticos, permitindo uma avaliação abrangente de sua estabilidade genética. Este estudo pretende contribuir para o entendimento dos mecanismos subjacentes à variabilidade genética associada aos microssatélites, potencialmente fornecendo insights valiosos para a compreensão de processos biológicos relacionados à instabilidade genômica e suas implicações em contextos de saúde humana.

Palavras-chave: Microssatélites, Dinâmica molecular, MSI

Abstract: *This study aims to assess the structural stability of microsatellites, which are sequences of repeated nucleotides in DNA, by investigating potential correlations between the energetic instability of these structures and their predisposition to some diseases. To achieve this objective, computational simulations will be carried out using classical Molecular Dynamics and quantum methods. The methodological approach adopted will involve a detailed analysis of the structural and dynamic properties of microsatellites under various energetic contexts, enabling a comprehensive assessment of their genetic stability. This study aims to contribute to understanding the underlying mechanisms of genetic variability associated with microsatellites, potentially providing valuable insights into biological processes related to genomic instability and their implications in human health contexts.*

Keywords: *microsatellites; Molecular Dynamics; MSI problem*

*Endereço de correspondência: j249829@dac.unicamp.br

1 Introdução

Nos últimos anos, a pesquisa sobre microssatélites tem desempenhado um papel fundamental na genética molecular, proporcionando insights valiosos sobre a variabilidade genética e suas implicações biológicas⁽¹⁾. Este trabalho se inspira na tese de Larissa Lima do Espírito Santo⁽²⁾, intitulada 'Aplicação de métodos semiempíricos ao estudo da estrutura eletrônica de compostos bioativos' para explorar a instabilidade genética de microssatélites de DNA. O estudo da tese analisou duas partes distintas: a primeira focada na análise de estrutura-atividade em compostos anticancerígenos utilizando métodos de índices eletrônicos, e a segunda, que investigou a estabilidade genética de sequências de microssatélites usando o método AMBER, na qual foi foco dessa pesquisa.

O DNA, ácido desoxirribonucleico, é uma macromolécula fundamental que armazena e transmite informações genéticas em todos os organismos vivos. Estruturalmente, o DNA é composto por duas cadeias complementares dispostas em uma dupla hélice, formadas por nucleotídeos. Cada nucleotídeo é composto por três componentes principais: um grupo fosfato (negativamente carregado), uma pentose (açúcar de cinco carbonos) e uma base nitrogenada. As quatro bases nitrogenadas encontradas no DNA são adenina (A), timina (T), citosina (C) e guanina (G). A adenina se emparelha sempre com a timina, e a citosina sempre com a guanina, estabelecendo a complementaridade das cadeias de DNA.

2 Microssatélites

Os microssatélites, também conhecidos como SSRs (Simple Sequence Repeats), são sequências de nucleotídeos curtas (geralmente de 1 a 6 pares de bases) que se repetem em tandem em várias regiões do genoma. Essas sequências dinâmicas são particularmente prevalentes em regiões não codificantes do DNA, como íntrons e regiões regulatórias, e são conhecidas por sua alta variabilidade devido à taxa elevada de mutações na expansão ou contração das repetições durante a replicação do DNA.³

Compreender a instabilidade genética de microssatélites é crucial para diversas áreas da biologia e medicina, incluindo a genética populacional, estudos filogenéticos, e a investigação de doenças genéticas associadas a defeitos na reparação de DNA. No DNA, durante a reprodução de novas células ocorrem erros durante o processo de replicação (1 a cada 10^9 copiados) que produz um erro na transmissão que pode adquirir um caráter permanente (mutações). A instabilidade de microssatélites está diretamente relacionada a várias síndromes genéticas⁽⁴⁻⁶⁾, conhecidas como síndromes de instabilidade de microssatélites (MSI), que podem predispor indivíduos a cânceres hereditários e outras condições genéticas.

A partir disso, o foco desse estudo se torna fazer uma análise que correlaciona a estabilidade genética de microssatélites e a aparição de mutações no código genético.

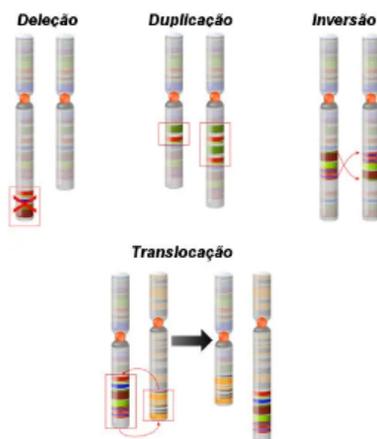


Figura 1: Demonstração de alguns tipos de mutação. Figura adaptada da referência Figura 2.

3 Metodologia

No estudo de microssatélites a abordagem mais utilizada é a estatística⁽⁷⁾, porém no estudo feito foi utilizado-se a abordagem da estabilidade energética. Para isso utilizamos a análise de estrutura-atividade.

No estudo de estrutura-atividade utilizamos diversos métodos, tais como mecânica molecular⁸, dinâmica molecular e métodos quânticos para testar nossas hipóteses.

A mecânica molecular é uma aproximação para se calcular a energia molecular de um sistema, nela utilizamos a função de energia potencial que descreve as interações entre um conjunto de átomos especificados por suas coordenadas cartesianas (campos de força) que varia de acordo com método de M.M escolhido (Cada método possui um campo de força parametrizado para cada tipo de molécula)

$$E(\text{est}) = E(\text{lig}) + E(\text{ang}) + E(\text{die}) + E(\text{vdW}) + E(\text{ele})$$

Nessa expressão separamos as energias de átomos ligados por potenciais do tipo “mola” (Energia de estiramento, deformações angulares e rotações internas em torno de ligações simples) e a energia de átomos não-ligados (Potencial de van der Waals e Eletrostática). A soma de todos esses termos constitui a energia estereoquímica do sistema que fornece uma estrutura molecular de mínima energia. Também podemos adicionar mais um termo referente às pontes de hidrogênio (Eh) se estivermos lidando com DNA (método AMBER -referência AMBER).

As superfícies da energia potencial são complexas, apresentando vários mínimos locais que aumentam com o número de graus de liberdade do sistema, e normalmente é necessário uma análise extensiva de todas as conformações moleculares que há equação permite. Para contornar esse problema utilizamos a Dinâmica Molecular, que consiste em resolver as equações de Newton, normalmente podemos escrever a equação abaixo (para forças conservativas):

$$\frac{d\text{Energia Potencial}}{dx_i} = - \sum F$$

Nela derivamos a expressão de energia potencial em relação às posições atômicas e obtemos o somatório de forças que atuam na molécula e, através disso, aplicamos as leis de Newton e obtemos a evolução das posições atômicas que nos dão as conformações do sistema.

A partir das simulações de Dinâmica Molecular, podemos extrair diversas propriedades físicas e químicas do sistema estudado, como energia livre, entalpia, entropia, e constantes de equilíbrio. Esses dados são essenciais para compreender a estabilidade energética dos microssatélites e sua relação com a estrutura molecular. Além disso, as simulações nos permitem observar possíveis mudanças conformacionais e interações intermoleculares que podem ser fundamentais para a estabilidade dos microssatélites.

Para avaliar se os microssatélites realmente desempenham papel na instabilidade genética, partimos do princípio de que um sistema mais energético tende naturalmente a buscar um estado de menor energia, indicando que sistemas com maior energia são mais instáveis⁹. Dessa maneira, nos propomos a analisar várias permutações de sequências de DNA, tanto completamente aleatórias quanto contendo microssatélites. Comparando estas sequências procuramos determinar se a redução na aleatoriedade do sistema resulta em um aumento na energia total. Isso nos permitirá inferir a correlação entre a presença de microssatélites e a instabilidade genética, baseada nas variações energéticas observadas entre as diferentes sequências de DNA.

Para o presente estudo, utilizamos inicialmente o software Avogadro¹⁰ para construir uma sequência de nucleotídeos aleatória, configurada na conformação de dupla-hélice do DNA na forma B, contendo 10 bases nucleotídicas (ACCAACCAAC). Em seguida, geramos um arquivo .xy dentro do próprio Avogadro, contendo todas as posições e conformações dos átomos da fita de DNA. Este arquivo foi então exportado para o software MOPAC onde a geometria dos fragmentos do DNA foi otimizada¹¹⁻¹³. Utilizamos então as geometrias otimizadas no MOPAC para calcular energias configuracionais no SAMSON, que descreve melhor as contribuições das forças de van der Waals.

Para as fitas do DNA realizamos uma permutação da nossa sequência inicial, mantendo o número de bases constante, mas alterando a sequência para gerar microssatélites do tipo (AC)_k. Este novo arranjo foi submetido ao mesmos procedimentos descritos anteriormente.

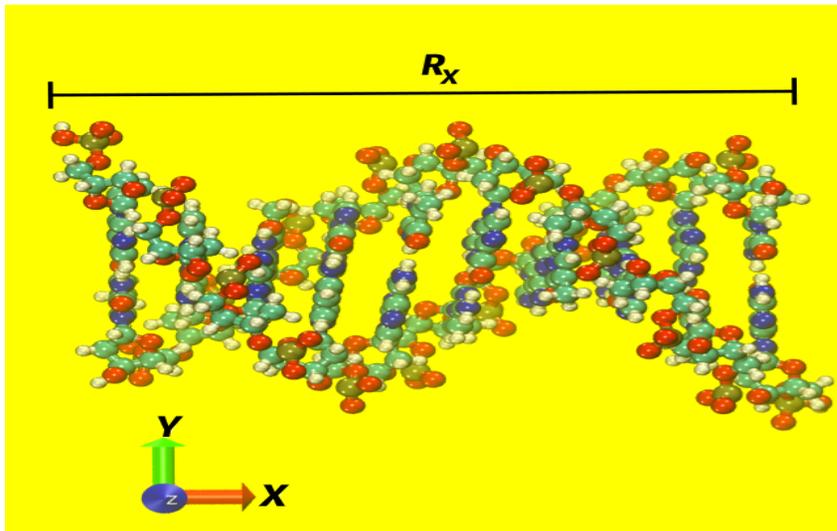


Figura 2: Visualização da fita de DNA pelo software SAMSOM

Finalmente, analisamos uma sequência adicional, mais extrema, composta por bases homogêneas (AAAAACCCC). Esta sequência também passou pelo mesmo conjunto de passos. Os resultados para os valores da energia configuracional dos diversos arranjos são apresentados na figura abaixo.

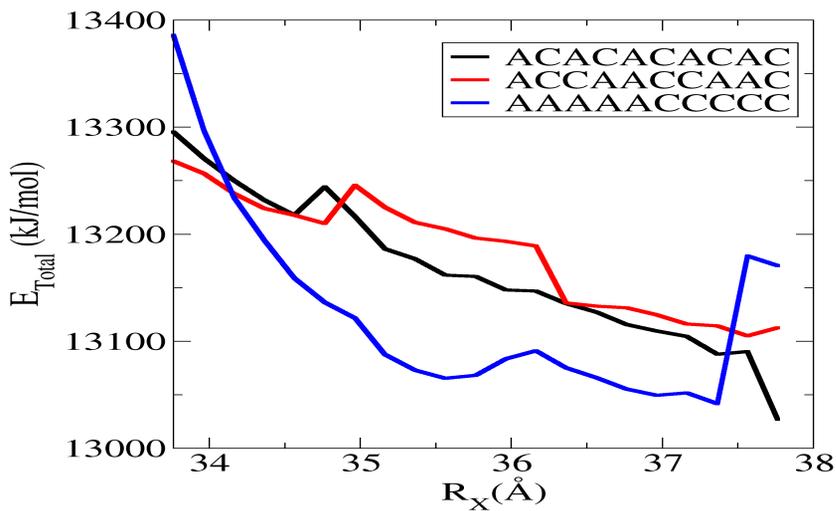


Figura 3: Energia Total para as diferentes sequências das bases em função do comprimento de estiramento.

4 Conclusões

A partir dos dados obtidos, podemos realizar uma análise detalhada sobre a minimização de energia em seqüências de DNA. A instabilidade genética ocorre quando não há uma minimização adequada da energia, pois um sistema que não está em um estado de energia mínima tende a migrar para um estado de menor energia. Dessa forma, sistemas com maior energia são, por natureza, mais instáveis.

Como podemos observar da Figura, a ordem relativa da energia total muda em função do estiramento, indicando várias regiões de instabilidade estrutural. Embora esses resultados sejam bastante preliminares e para fragmentos de DNA relativamente curtos, parecem validar que, de fato, existe uma

correlação entre os 'repeats' dos microsátélites e estabilidade estruturas.

5 Análises Futuras

No seguimento deste projeto, pretendemos expandir as análises para sequências de DNA significativamente maiores, variando de 700 a 1000 bases nucleotídicas. Esta ampliação permitirá uma análise mais abrangente e representativa das propriedades mecânicas e estruturais do DNA. Para alcançar este objetivo, planejamos utilizar algoritmos avançados e programas especialmente desenvolvidos para a geração de sequências aleatórias de grande comprimento, garantindo a diversidade necessária para uma análise estatística robusta.

A análise de sequências maiores exigirá recursos computacionais substanciais. Portanto, será crucial a utilização dos supercomputadores da COARCI (Centro de Operações de Alto Rendimento em Computação e Inovação), que oferecem a capacidade de processamento necessária para realizar simulações de alta complexidade e precisão.

6 Bibliografia

Referências

- [1] Orlemans, E. O. M.; et al J Med Chem 1989, 32, 1612.
 - [2] SANTO, Larissa Lima do Espirito. Aplicação de métodos semiempíricos ao estudo da estrutura eletrônica de compostos bioativos. 2003. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Física Gleb Wataghin, 2003.
 - [3] Mackiewicz, P.; Gierlik, A.; Kowalczyk, M.; Szczepanik, D.; Dudek, M. R.; Cebrat, S. Physica A 1999, 103.
 - [4] Kleiderlein, J. K.; Nisson, P. E.; Jessee, J.; Li, W.B.; Becker, K. G.; Derby, M. L.; Ross, C. A.; Margolis, R. L. Human Genetic 1998, 103, 666.
 - [5] Verkerk, A. J. M. H. et al Cell 1991, 65, 905.
 - [6] Clark, T. A Handbook of Computational Chemistry- A Practical Guide to Chemical
 - [7] Eichler, E. E. et al. Nature Genetics 1994, 8, 88.
 - [8] Structure and Energy Calculations. John Wiley E Sons, EUA, 1985.
 - [9] Dokholyan, N. V.; Buldyrev, S. V.; Halvlin, S.; Stanley, H. E. Physical Review Letters 1997, 79, 25, 5182.
 - [10] Avogadro: an open-source molecular builder and visualization tool. Version 1.XX. <http://avogadro.cc/>
 - [11] M. J. S. Dewar and W. Thiel. Ground States of Molecules, 38. The MNDO Method. Approximations and Parameters. J. Am. Chem. Soc., 99:4899-4907, 1977.
 - [12] R. Fletcher. Function minimization without evaluating derivatives - a review. Comput. J., 8:33-41, 1965.
 - [13] 148 Stewart J. J. P., Optimization of Parameters for Semiempirical Methods V: Modification of NDDO Approximations and Application to 70 Elements J. Mol. Modeling 13, 1173-1213 (2007).
 - [13] 152 Stewart J. J. P., Optimization of parameters for semiempirical methods VI: more modifications to the NDDO approximations and re-optimization of parameters J. Mol. Modeling 19, 1-32 (2013).
- Figura 1: <https://pt.khanacademy.org/science/ap-biology/gene-expression-and-regulation/replication/a/hs-dna-structure-and-replication-review>