

ESCUELA POLITÉCNICA NACIONAL

FACULTAD DE CIENCIAS

**CARACTERIZACIÓN DE LAS BARRERAS ENERGÉTICAS QUE
INTERVIENEN EN LA DISOCIACIÓN DE LA HORQUILLA DE ADN
AACC4 EN EL RANGO DE LOS NANOSEGUNDOS**

**PROYECTO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE FÍSICO**

MARCOS VINICIO BECERRA PUEBLA
marvius20@yahoo.com

Director: Marco Vinicio Bayas Rea, Ph.D.
marco.bayas@epn.edu.ec

2014

DECLARACIÓN

Yo, Marcos Vinicio Becerra Puebla, declaro bajo juramento que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentada para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Escuela Politécnica Nacional puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su Reglamento y por la normatividad institucional vigente.

MARCOS VINICIO BECERRA PUEBLA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue desarrollado por Marcos Vinicio Becerra Puebla, bajo mi supervisión.

Marco V. Bayas, Ph.D
DIRECTOR

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis padres, por haber sido el pilar más importante en mi vida y por demostrarme su cariño y apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi director de tesis, Marco Bayas Ph.D., por la orientación, seguimiento, supervisión y ayuda que me brindó para realizar este proyecto.

A mis padres Marco Becerra y Teresa Puebla y mi hermano Daniel Becerra por toda la comprensión, paciencia y ánimo recibidos por parte.

A un gran amigo, Víctor Posligua, por su amistad, consejos, apoyo, ánimo y ayuda que me brindó durante todo el tiempo de mi tesis.

Y a todas aquellas personas que de una u otra forma me ayudaron en la realización del presente trabajo.

ÍNDICE DE CONTENIDO

- LISTA DE FIGURAS	III
- LISTA DE TABLAS	III
- RESUMEN	V
- ABSTRACT	VI
1 BASES BIOFÍSICAS	1
1.1 GENERALIDADES DEL ADN	1
1.2 HORQUILLAS	3
1.2.1 FUNCIONALIDAD BIOLÓGICA	4
1.3 EXPERIMENTOS DE MOLÉCULAS INDIVIDUALES	4
1.4 HORQUILLA AACC4	6
2 MARCO TEÓRICO	8
2.1 ENTORNO DE ENERGÍA	8
2.2 Teoría de Kramers – Bell	9
2.2.1 Modelo de Kramers	9
2.2.2 BARRERA ENERGÉTICA EN PRESENCIA DE UNA FUERZA EXTERNA	11
2.3 RUPTURA FORZADA DE LA HORQUILLA	12
2.4 COMPONENTES DE LA ENERGÍA DE LA HORQUILLA	12
2.5 DINÁMICA MOLECULAR	13
2.6 ENERGÍA EN LA DINÁMICA MOLECULAR	14
2.7 OPTIMIZACIÓN GEOMÉTRICA EN LA DM	15
2.8 EQUILIBRACIÓN EN LA DM	16
3 MÉTODOS	17
3.1 NAMD	17
3.2 CONSTRUCCIÓN DEL MODELO DE LA HORQUILLA	18
3.2.1 Generación del Archivo PSF de la Estructura	19

ÍNDICE DE CONTENIDO

3.2.2	Preparación del Modelo Solvatado de la Horquilla	20
3.3	RMSD	21
3.4	MINIMIZACIÓN DE LA ENERGÍA	21
3.5	CALENTAMIENTO DEL SISTEMA	21
3.6	EQUILIBRACIÓN DEL SISTEMA	22
3.7	SIMULACIONES DE DINÁMICA MOLECULAR DIRIGIDA	22
3.8	CÁLCULO DE TIEMPOS MEDIOS	23
3.9	COMPONENTES DE ENERGÍA	23
3.10	ANÁLISIS DE LOS TIEMPOS DE RUPTURA	24
4	RESULTADOS	26
4.1	SIMULACIONES DE DINÁMICA MOLECULAR	26
4.1.1	MINIMIZACIÓN Y CALENTAMIENTO	26
4.1.2	EQUILIBRACIÓN	27
4.2	SIMULACIONES DE DINÁMICA MOLECULAR DIRIGIDA	27
4.2.1	CORRECCIÓN DE LOS TIEMPOS DE RUPTURA	31
4.3	ANÁLISIS DE ENERGÍAS	32
4.3.1	ENERGÍAS DE DISOCIACIÓN DE LA HORQUILLA	33
4.3.2	COMPONENTES DE ENERGÍA EN LOS PARES DE BASES	34
4.3.3	ENERGÍA DEL ESQUELETO DE LA HORQUILLA	36
4.4	ANÁLISIS DE REGRESIÓN DEL TIEMPO DE RUPTURA VS. LA FUERZA	37
4.4.1	REGRESIÓN LINEAL	37
4.4.2	REGRESIÓN CUADRÁTICA	38
4.5	PARÁMETRO τ_0	41
5	CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN	43
	ANEXOS	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Representación del ADN con sus enlaces entre las azúcares, fosfatos y bases nitrogenadas.	2
Figura 1.2 - Esquemas de Horquillas.	3
Figura 1.3 - Esquema de instrumentos.	5
Figura 1.4 - Estructura AACCC4 en su forma primaria, secundaria y terciaria.	6
Figura 2.1 - Entorno de energía libre de una biomolécula.	9
Figura 2.2 - Potencial $U(x)$ con dos estados metaestables.	10
Figura 2.3 - Esquema de la disminución de la barrera energética al momento de ser aplicada una fuerza.	11
Figura 2.4 - Esquema simplificado del algoritmo de dinámica molecular.	16
Figura 3.1 - Hoquilla AACCC4 extraído de la información suplementaria de Zhang <i>et. al.</i>	19
Figura 3.2 - Dimensiones de la caja de Agua junto a la horquilla en su estado plegado.	20
Figura 4.1 - Caja de Agua junto a la horquilla en su estado plegado.	26
Figura 4.2 - RMSD de la horquilla AACCC4 para la Minimización y Calentamiento a 300K.	27
Figura 4.3 - RMSD y Radio de Giro para la horquilla AACCC4.	28
Figura 4.4 - Secuencia de la ruptura de la horquilla bajo una fuerza de 300 pN.	29
Figura 4.5 - Gráfico de la distancia entre el átomo fijo y SMD aplicando una fuerza de 100 pN.	30
Figura 4.6 - Representaciones de la horquilla aplicando fuerzas de 100 y 500 pN	30
Figura 4.7 - Gráfico de la componente de la fuerza que se aplica sobre la primera base en la dirección de la fuerza.	31
Figura 4.8 - Ángulo entre el centro de masa del anillo de la base, el carbono C1' del azúcar y el átomo SMD.	32

Figura 4.9 - Gráficos de los puntos obtenidos en las simulaciones, regresión lineal y cuadrática para cada par de bases. 39

Figura 4.10 - Gráficos para cada par de bases con respecto a $\ln \alpha$, β y γ . . . 40

Figura A.1 - Esquema de la trampa óptica 48

LISTA DE TABLAS

Tabla 2.1 - Energías de interacción entre la Adenina – Timina y Citosina – Guanina halladas por varios autores	13
Tabla 2.2 - La energía de apilamiento de los pares de bases de ADN.	13
Tabla 4.1 - Tiempos promedio de ruptura corregidos para cada una de las fuerzas.	33
Tabla 4.2 - Energía media de disociación necesaria para de ruptura de cada una de las fuerzas.	34
Tabla 4.3 - Energía media de disociación para cada par de bases.	34
Tabla 4.4 - Energía media de los puentes de hidrógeno correspondientes a cada par y fuerza.	35
Tabla 4.5 - Energía media de apilamiento entre dos pares de bases.	36
Tabla 4.6 - Energía media del aporte de energía del esqueleto de la horquilla a la ruptura de las bases.	37
Tabla 4.7 - Valor de las constantes obtenidas del ajuste lineal de mínimos cuadrados.	38
Tabla 4.8 - Valor de las constantes obtenidas en la regresión cuadrática	38
Tabla 4.9 - Pruebas de Hipótesis al 5 % de significancia de los coeficientes $\ln \alpha$	40
Tabla 4.10 - Pruebas de Hipótesis al 5 % de significancia de los coeficientes β	41
Tabla 4.11 - Pruebas de Hipótesis al 5 % de significancia de los coeficientes γ	41
Tabla 4.12 - Coeficiente τ_0 encontrado a partir de los datos obtenidos en las simulaciones.	41

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A - Pinzas Ópticas	47
ANEXO B - “Script” de Traslación de una Molécula	49
ANEXO C - “Script” de Rotación de una Molécula	51
ANEXO D - “Script” para Generar la Caja de Agua	53
ANEXO E - Archivo de Configuración de NAMD para la Minimización	54
ANEXO F - Archivo de Configuración de NAMD para la Calentamiento	56
ANEXO G - Archivo de Configuración de NAMD para la Equilibración	58
ANEXO H - Archivo de Configuración de NAMD para la Ruptura de las Bases a Fuerza Constante	60

RESUMEN

Una de las estructuras secundarias más interesantes del ADN es la horquilla. Ésta es considerada una estructura importante ya que es un punto de reconocimiento de las proteínas asociadas a la replicación del material genético de un organismo. A diferencia de la estructura doble helicoidal del ADN, las horquillas se componen de una sola hebra que se enrolla en sí misma de modo que las bases complementarias interactúan de la misma forma que en una doble hélice. Es de interés conocer los mecanismos físicos asociados a su formación, así como los mecanismos de interacción con otras biomoléculas. Esta información está contenida en el llamado “Entorno energético” de la molécula.

Mediante simulaciones de dinámica molecular dirigida (SMD: Steered Molecular Dynamics) se ha estudiado el comportamiento de la horquilla AACCC4 bajo la acción de fuerzas externas que disocian los pares de bases. Bajo la acción de fuerzas entre 100 y 500 pN se ha logrado abrir la estructura en tiempos del orden de nanosegundos. Esto ha permitido caracterizar las barreras energéticas asociadas a la estructura.

Para cada valor de fuerza se encontró el intervalo de tiempo necesario para separar la horquilla. También se determinó que la teoría de Kramers – Bell (K–B) no se cumple puesto que no existe una relación forma lineal entre el logaritmo del tiempo de ruptura y la fuerza que se ejerce, más bien corresponde a un comportamiento cuadrático. Se proponen dos posibles explicaciones a este hecho. La primera se basa en la existencia de una función general de la fuerza y que la teoría de K–B es un caso particular y la segunda se basa en que la teoría si puede cumplirse pero como una superposición de barreras energéticas. Considerando el primer escenario, se hallaron valores para las alturas de las barreras energéticas los cuales dan información acerca de la disociación a fuerza cero.

ABSTRACT

The DNA hairpin is one of the most interesting secondary structures. It is important because it can be considered as a point of recognition of proteins associated with the replication of the genetic material of an organism. Unlike the double-helical structure of DNA, the hairpins have a single strand that folds onto itself so that the complementary bases interact in the same way as in a double helix. It is of interest to know the physical mechanisms associated with its formation as well as the mechanism of interaction with other biomolecules. This information is contained in the “energy landscape” of the molecule.

Using Steered Molecular Dynamics simulations (MDS), we have studied the behavior of the hairpin AACCC4 under the action of external forces to dissociate base pairs. Under the action of forces between 100 and 500 pN, it has been managed to open the structure in times of the order of nanoseconds. This has allowed the characterization of the energy barriers associated with the structure.

The time range necessary to separate the hairpin AACCC4 was found. It was also determined that the Kramers – Bell (K–B) theory can not be met since its relationship between the logarithm of time rupture and the exerted force is not linear rather corresponds to a quadratic regression. There are two possible explanations for this fact. The first is based on the existence of a general force function and that the K–B theory is a special case and the second one is this theory can be met if it is considered as a superposition of energy barriers. Considering the first setting, values for the energy barriers heights which give information about the dissociation at zero force were found.

CAPÍTULO 1

BASES BIOFÍSICAS

1.1. GENERALIDADES DEL ADN

El ácido desoxirribonucleico o ADN es una macromolécula fundamental para la vida debido a dos hechos principales: (i) la capacidad de llevar la información, necesaria para el desarrollo de un organismo; y (ii) su capacidad de replicación, la cual permite que las células puedan dividirse y poseer la misma información genética [1]. Típicamente el ADN en las células se compone de dos cadenas que se unen formando una estructura doble helicoidal, la misma que fue propuesta por Watson–Crick en el año de 1953 [2, 3]. Cada una de las cadenas es un polímero formado por unidades repetitivas sencillas llamadas nucleótidos. Cada nucleótido está conformado por una base nitrogenada, un azúcar de cinco carbonos (desoxirribosa) y un grupo fosfato [3, 4]. La conexión entre unidades sucesivas se realiza mediante el residuo fosfato PO_4^{3-} y esto forma el enlace fosfodiéster entre dos residuos de azúcar. Este conjunto constituye el armazón o esqueleto de la molécula del ácido nucleico (Figura 1.1).

La codificación de la información se da a través de la secuencia de las bases nitrogenadas [4]. Estas se dividen en dos grupos: (i) el de las purinas donde se encuentran la adenina (A) y la guanina (G), y el de las pirimidinas donde se incluyen la citosina (C), la timina (T) y el uracilo (U). El ADN incluye en su composición la adenina, guanina, citosina y timina. Con la adenina enlazándose sólo a la timina con dos puentes de hidrógeno y la citosina enlazándose solamente a la guanina con tres puentes de hidrógeno. A esto se le llama el apareamiento de bases complementarias. Debido a que los enlaces son débiles, se los puede separar y volver a unir fácilmente como un cierre, ya sea con altas temperaturas o fuerza mecánica [4, 5].

La estabilidad de la cadena es posible debido a las interacciones por puentes de hidrógeno en los pares de base y las interacciones de apilamiento entre éstas [4].

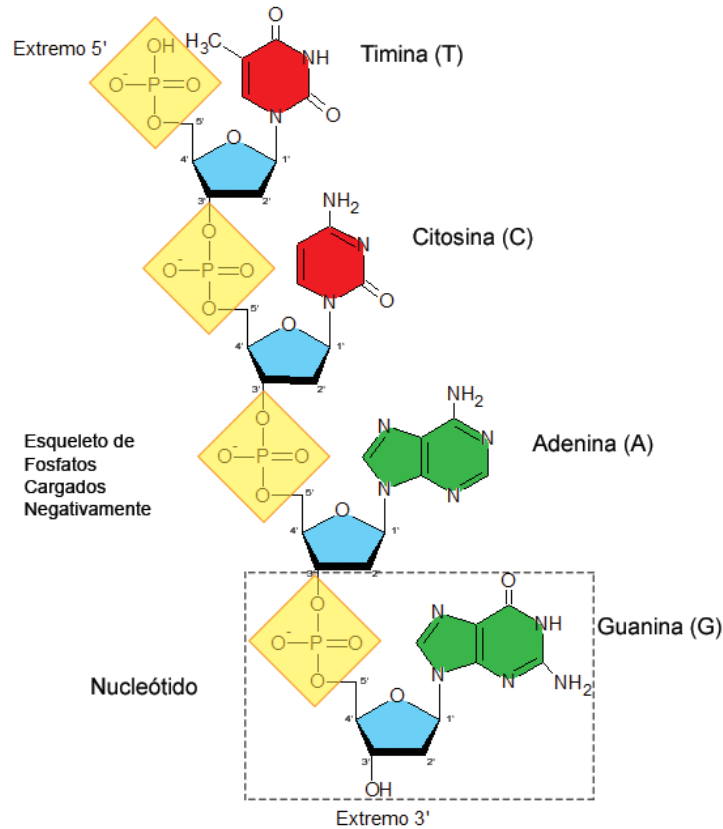


Figura 1.1: Representación del ADN con sus enlaces entre las azúcares (azul), fosfatos (amarillo) y bases nitrogenadas (rojo: pirimidinas y verde: purinas).

En una estructura típica de ADN, el esqueleto gira hacia la derecha (dextrógira) en un diámetro de 20 Å. Para tomar esta forma, la doble hélice necesita que la dirección de los nucleótidos en una cadena sean opuestas a la dirección de la otra cadena, es decir que sean antiparalelas. Las terminaciones asimétricas del ADN son llamadas terminaciones 5' y 3', siendo la terminación 5' un grupo fosfato mientras que la terminación 3' posee un grupo hidroxilo (ver Figura 1.1).

El ADN, así como las proteínas y otras biomoléculas, posee múltiples niveles de estructura [4, 6], como son:

- Estructura primaria, corresponde a la geometría de menor información estructural del biopolímero y equivale simplemente a la secuencia de los nucleótidos.
- Estructura secundaria, ésta describe las interacciones entre dos o más bases causando la formación de diferentes elementos estructurales.
- Estructura terciaria, es la estructura tridimensional, como el superenrollamiento del ADN, que involucra un plegamiento de orden superior de los elementos de una estructura secundaria regular.

1.2. HORQUILLAS

La secuencia de ADN puede adoptar estructuras diferentes de la típica doble hélice de Watson–Crick [3]. Estas estructuras secundarias incluyen a las horquillas, cruciformes, uniones de Holliday, triples hélices, cuadruplexes, entre otras. Algunas de estas estructuras han sido asociadas con la regulación de diversas actividades nucleares y representan una nueva área de investigación como potentes blancos anticancerígenos, así como en el tratamiento de numerosas enfermedades como la diabetes y desórdenes neurodegenerativos [9–12].

Las horquillas constan de dos partes, un tallo y un lazo (Figura 1.2a) [7]. El tallo es una doble hélice que puede tener una cantidad variable de pares de bases, mientras que el lazo está formado por bases no apareadas, típicamente entre cuatro o cinco nucleótidos ya que presentan una mayor estabilidad [13]. En el lazo, las bases se encuentran expuestas hacia el exterior de la cadena permitiendo que esta última sección sea muy activa, aquí se pueden anclar moléculas a través de interacciones débiles [14–16]. Para que las bases puedan adoptar esta forma de horquilla, debe existir una autocomplementariedad de la secuencia de bases, lo que permite que la cadena se pliegue sobre sí misma y forme una hélice antiparalela de bases apareadas.

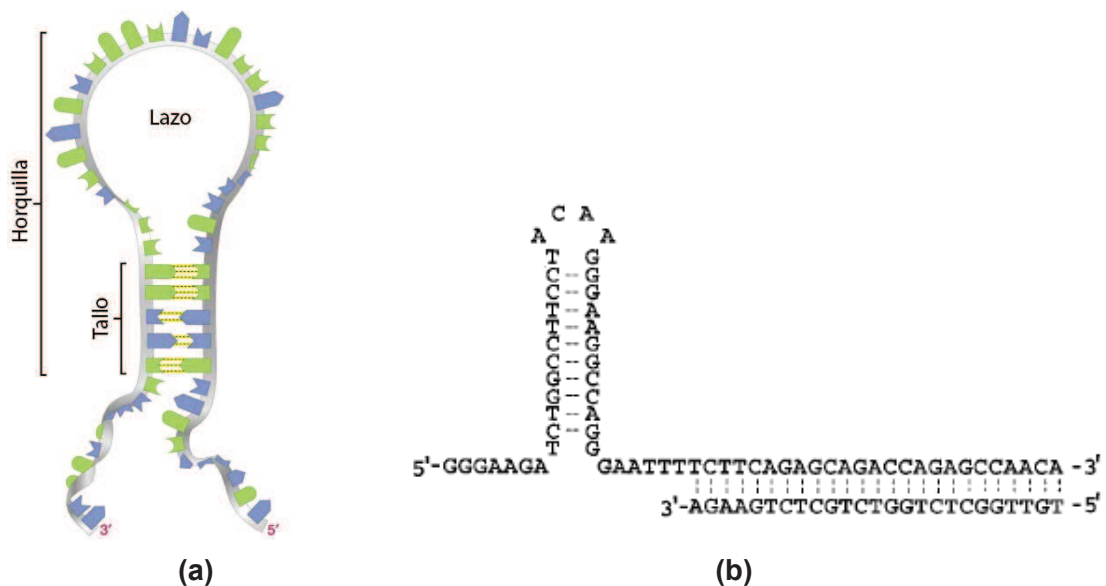


Figura 1.2: a) Esquema de la horquilla con sus respectivas partes. Adaptado de [7, pág. 8]. b) Horquilla que le sirve de punto de reconocimiento a la Topoisomerasa II. Adaptado de [8, pág. 2]

1.2.1. FUNCIONALIDAD BIOLÓGICA

La horquilla de ADN puede participar en muchas funciones biológicas, tales como la regulación de la expresión genética [17], recombinación del ADN [18, 19] y facilitación de eventos mutagénicos [20]. Por esta razón, no todas las configuraciones de bases en una horquilla funcionan de igual manera, ya que estas tienen que ser secuencias predeterminadas dependiendo de las enzimas o moléculas que actúen sobre la cadena.

Esta diferenciación en las horquillas permite ser puntos de reconocimiento para que las moléculas puedan interactuar con el ADN. Entre estas moléculas tenemos a la topoisomerasa II. Esta enzima juega un papel importante en la estructura y funcionamiento del cromosoma, puesto que modula el estado topológico de las moléculas en las células eucariotas a través de rupturas de la doble cadena [18]. Uno de los mecanismos de acción de esta enzima incluye la participación de horquillas compatibles [18, 19, 21]. Un ejemplo de estas horquillas se muestra en la Figura 1.2b.

Las horquillas también participan en la replicación y regulación del ADN. Drogas antitumorales como la Actinomicina D y análogos pueden enlazarse selectivamente a horquillas de una sola hebra. Este enlace corresponde a las interacciones que se generan entre el lazo y la molécula [22].

1.3. EXPERIMENTOS DE MOLÉCULAS INDIVIDUALES

La separación de la doble hélice de ADN en dos cadenas simples es fundamental en la replicación de los organismos vivos. En equilibrio, el ADN se separa cuando la energía libre de las hebras simples es menor que la energía de la doble hélice. Para ello, en los organismos vivos existen enzimas, como la helicasa, especializadas en minorar la barrera de activación para permitir este proceso [23].

Para estudiar estos procesos de forma experimental, se recurre a estudios de moléculas individuales [24–27]. Estos estudios permiten caracterizar directamente las barreras energéticas asociadas a las reacciones biomoleculares. Además proveen información adicional acerca de la cinética y termodinámica lo cual es difícil encontrar con otro tipo de experimentos.

Algunas técnicas han sido desarrolladas para medir las pequeñas fuerzas que actúan en las moléculas individuales de ADN y ARN. En estos experimentos, un extremo de la molécula se mantiene fijo en una posición, mientras que el otro se lo extiende a fuerza constante o velocidad constante. Estas técnicas incluyen las pinzas ópticas [24, 28, 29], las pinzas magnéticas [30] y el microscopio de fuerza atómica (AFM) [25, 26, 31–33]. Todos estos instrumentos son capaces de medir la

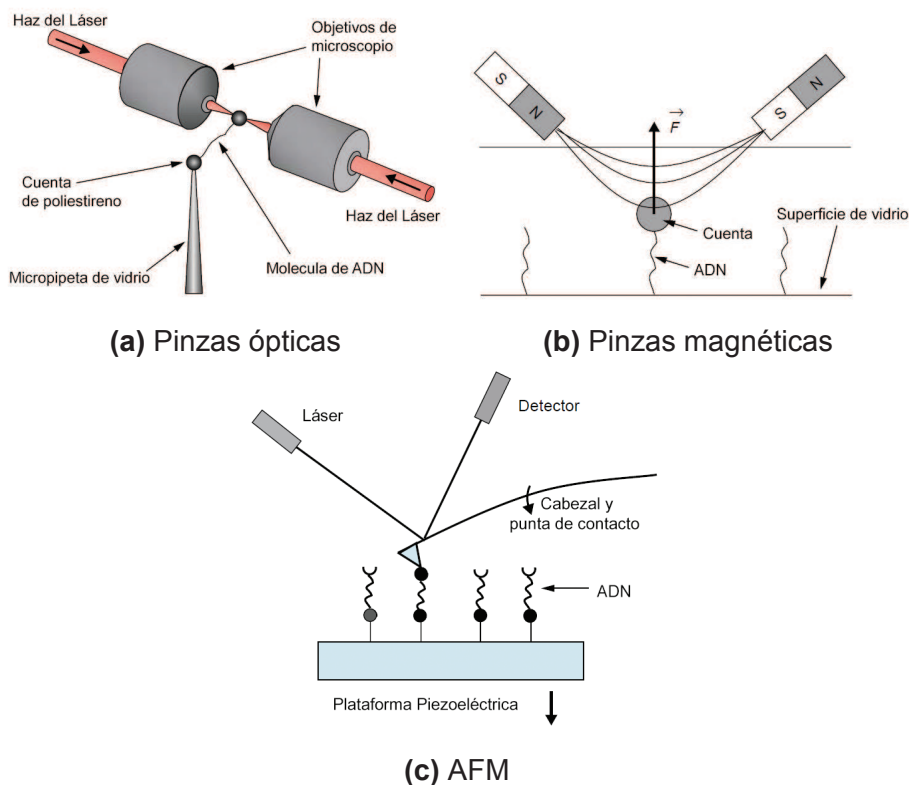


Figura 1.3: Esquema de los instrumentos utilizados en experimentos de moléculas individuales de horquillas. Adaptado de [27, pág. 2]

fuerza que se requiere para estirar el ADN bajo varias condiciones.

En las pinzas ópticas, un extremo de la molécula individual de ADN se une a una cuenta de poliestireno en una trampa óptica mientras que el otro extremo se fija a una micropipeta (Figura 1.3a). La fuerza resultante en la cuenta de la trampa óptica se puede medir en el rango de los 0.1–150pN. El funcionamiento de las trampas ópticas está detallado en el Anexo A.

En las pinzas magnéticas, un extremo de la cadena de ADN se une a una cuenta magnética, mientras que el otro se lo une a una superficie de cristal (Figura 1.3b). El campo magnético ejerce una fuerza constante, por ello la extensión resultante puede ser medida como una función de la fuerza. Este método puede ser usado para medir fuerzas por debajo del 1pN.

En los experimentos de AFM, las moléculas de ADN se las unen a una superficie fija en un extremo y la punta del cabezal en el otro extremo (Figura 1.3c). A medida que la superficie se la aparta de la punta, se puede utilizar la deflexión del mismo para determinar la fuerza requerida para estirar la molécula de ADN. La resolución de este método es de aproximadamente 5 pN, pero también puede ser utilizado para medir fuerzas en el rango de los nanonewtons.

Estas técnicas se han utilizado para estudiar varios regímenes del comporta-

miento del ADN sometido a fuerzas externas y también para el estudio de las interacciones entre ADN–proteínas y ADN–drogas [34, 35]. Además, se puede extraer información acerca de los tiempos de ruptura, así como la extensión que va adquiriendo la cadena a medida que se va abriendo [34, 36, 37]. Esta información es importante para investigar la termodinámica y cinética inducida por el plegamiento.

La experimentación con moléculas de ADN brinda información sobre el comportamiento del sistema. Sin embargo, esto tiene sus propias limitaciones, ya que la información que se extrae es de carácter global debido a que los aparatos registran sólo ciertos parámetros, como la fuerza y extensión en el caso de las pinzas ópticas. Para mejorar este tipo de estudio se puede utilizar cálculos computacionales. Estos permiten acceder a más información del sistema, la cual no es accesible de forma experimental, por ejemplo las posiciones de los átomos a medida que pasa el tiempo así como las energías involucradas en la ruptura [38].

1.4. HORQUILLA AACCC4

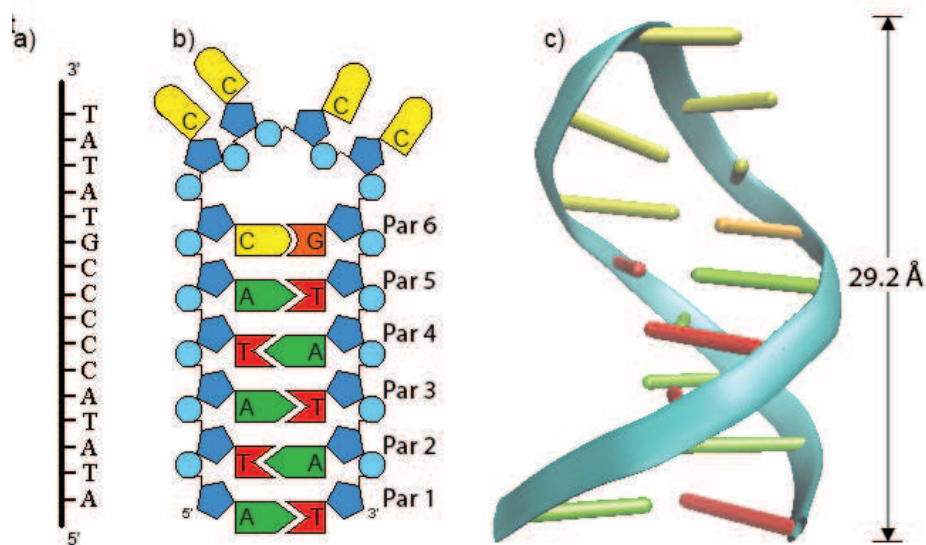


Figura 1.4: a) Estructura Primaria del AACCC4, b) Esquema 2D de los enlaces del AACCC4, c) Forma 3D de la molécula AACCC4.

La horquilla AACCC4 está formada por 16 bases con un total de 502 átomos. La secuencia es $5' - A_1T_2A_3T_4A_5C_6C_7C_8C_9C_{10}G_{11}T_{12}A_{13}T_{14}A_{15}T_{16} - 3'$ (Figura 1.4a). El lazo está formado por cuatro bases de citosina que se encuentran expuestas hacia afuera de la cadena (Figura 1.4c) y el tallo está compuesto por 6 pares de bases que son 5 pares A-T y un par C-G (Figura 1.4b). En lo posterior, el primer par A_1-T_{16} se lo llamará Par 1, al siguiente par T_2-A_{15} se lo llamará Par 2 y así sucesivamente hasta el Par 6, como se puede observar en la Figura 1.4b. En la Figura 1.4c se aprecia la

forma tridimensional del esqueleto de la horquilla. Ésta se enrolla en sí misma como una doble hélice que mide 101.9 Å de extremo a extremo en su estado desplegado, mientras que en su estado plegado mide 29.2 Å.

Para describir las características de la horquilla AACC4, Zhang *et. al.* [39] realizaron estudios de los efectos termodinámicos a través de la examinación de la desnaturalización de la cadena en búfers de diferentes concentraciones iónicas. También se ubicó la droga 7-aminoactinomicina D cerca de las horquillas para ver su interacción. Con esto, se pudo examinar propiedades espectroscópicas de fluorescencia y se encontró que esta horquilla puede actuar como donador en la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) cuando se le acerca la droga. Se usó resonancia magnética nuclear (NMR) para encontrar la estructura tridimensional de la molécula, con lo que se pudo obtener la información para crear la estructura 3D que se puede ver en la Figura 1.4c. Con todo esto se desea conocer la relación estructura – función de esta horquilla, sin embargo esto no es posible hacerlo de una forma directa debido a la complejidad de este problema. Para ello, en este proyecto, se investiga las energías involucradas en el proceso de disociación de esta biomolécula basado en la teoría del entorno de la energía libre.

Para este trabajo se toma como referencia el estudio de Mossa *et. al.* [37] para hacer un análisis energético de la estructura AACC4. Ellos analizaron la ruptura de una horquilla de 21 pares de bases y posteriormente realizaron un análisis del entorno de energía de la misma. Para la ruptura, se utilizaron fuerzas con una tasa de cambio constante entre los 10 y 20 pN. Además, el sistema se mantiene a temperatura ambiente (23°C - 24°C) en una solución acuosa búfer de NaCl 1M con un pH neutro de 7.5 estabilizada con Tris HCl y EDTA 1M. Un aspecto importante tratado en el artículo de Mossa *et. al.* [37] es el uso del concepto del entorno de energía libre. Éste les permitió describir la altura de las barreras energéticas y la diferencia de energía entre los estados plegado y desplegado.

A diferencia del trabajo de Mossa *et. al.*, la ruptura de la presente horquilla no se encuentra analizada de forma experimental. Para la realización de las simulaciones se aplicó una fuerza a los extremos de la horquilla tal y como se lo haría con pinzas ópticas, a fuerza constante. Las fuerzas que se mencionan en Mossa *et. al.* son muy pequeñas para la capacidad de cómputo que se posee. Es por esto que las simulaciones se las realizarán a fuerzas mucho mayores (100 - 500 pN) para hacer varias pruebas de la misma ruptura.

CAPÍTULO 2

MARCO TEÓRICO

2.1. ENTORNO DE ENERGÍA

La superficie de energía potencial o PES por sus siglas en inglés, es una relación entre la energía de una molécula (o colección de moléculas) con su geometría [40]. Cada configuración accesible a una molécula se encuentra definida a través de un punto en la PES. Por ello la forma de esta superficie, definida por sus puntos críticos, gradiente y función de partición, definen las características que va a poseer la molécula. Existe una generalización de estas superficies que se llama el entorno de energía libre [40].

El término “entorno de energía” fue introducido para discutir la paradoja de Levinthal sobre las superficies de energía para las proteínas [41]. Esta paradoja indica la aparente imposibilidad de que una proteína pueda encontrar su estado biológicamente activo en una búsqueda aleatoria entre el número astronómico de las estructuras disponibles. Para resolver se propuso que no todas las configuraciones posibles eran igualmente probables y no se encuentran aleatoriamente distribuidas. Un modelo para describir consiste en una superficie con forma de embudo o cono rugoso. Aquí la proteína recorre ciertos caminos para llegar a su estado nativo (fondo del embudo) que es el más estable termodinámicamente [42–44].

Este cono es descrito en términos del gradiente de energía libre hacia la estructura nativa, y su rugosidad representa a las barreras entre mínimos de energía. Estas barreras actúan como trampas cinéticas, como se ilustra en la Figura 2.1. El plegamiento de la molécula se da siempre y cuando estas barreras no sean muy altas comparadas con la energía del gradiente [45].

En la Figura 2.1, la entropía de la biomolécula está representada a través del ancho del embudo y la escala vertical representa la energía potencial (o entalpía). En la parte superior de la superficie, la molécula se encuentra completamente desnaturalizada; a medida que va cayendo en el embudo se va plegando [43]. Las

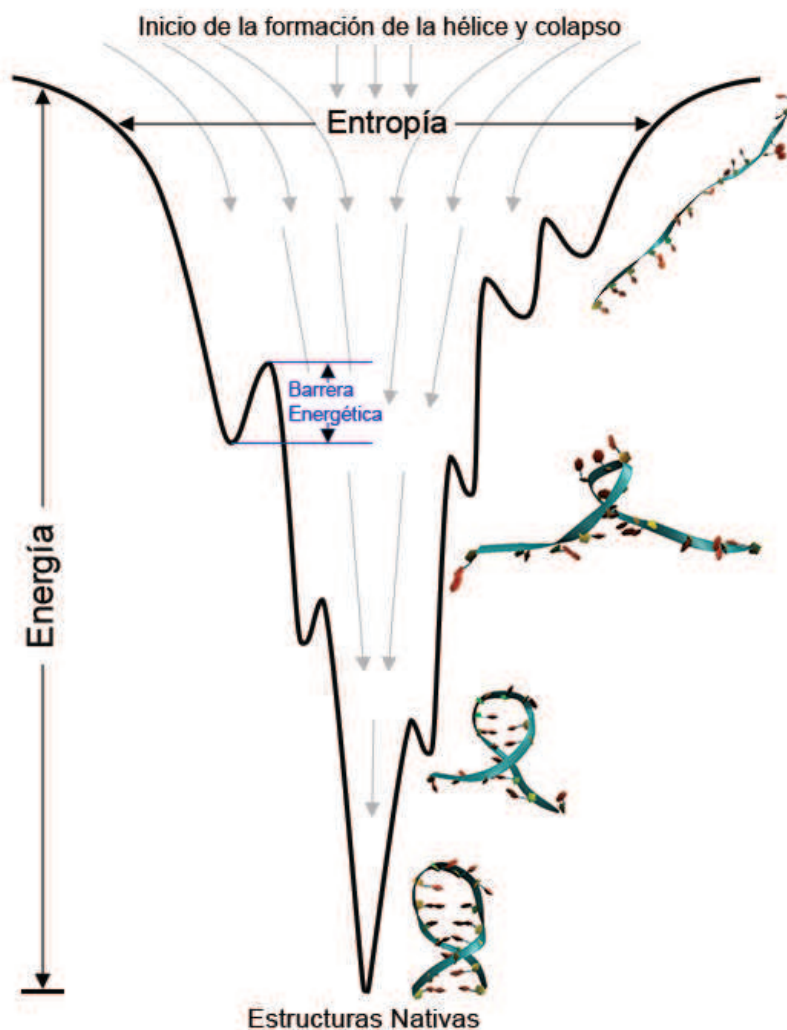


Figura 2.1: Entorno de energía libre de una biomolécula. A modo ilustrativo se muestra una posible evolución de una horquilla. (Adaptado de [42, pág. 553]).

moléculas llegan a un estado de mínima energía en donde se encuentran en su estado natural. Si estos biopolímeros no alcanzan el mínimo, no podrán realizar sus funciones biológicas adecuadamente.

2.2. TEORÍA DE KRAMERS – BELL

2.2.1. MODELO DE KRAMERS

Se considera una partícula clásica de masa M moviéndose en una dimensión en un potencial con dos pozos $U(x)$, tal y como se puede ver en la figura 2.2. x es la coordenada que describe el proceso de escape la cual generalmente está acoplada al entorno. Debido a este acoplamiento, x varía aleatoriamente. En términos

generales, los estados A y C corresponden a dos atractores diferentes en un espacio de fase multidimensional que se encuentran separados por una barrera la cual contiene uno o más puntos de ensilladura o atractores inestables.

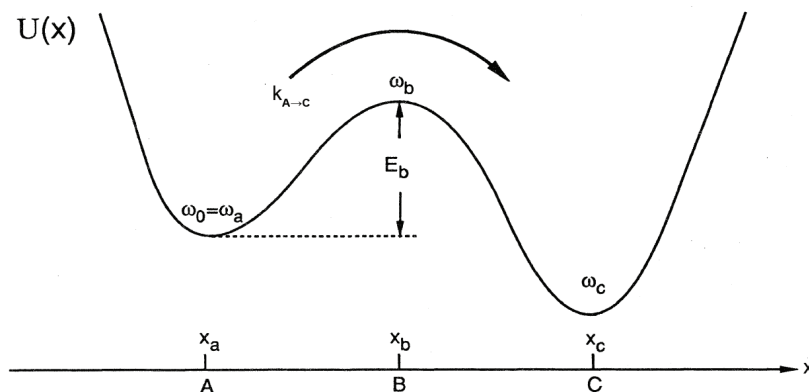


Figura 2.2: Potencial $U(x)$ con dos estados metaestables A y C. (Adaptado de [46, pág. 256]).

En este modelo simple, todos los demás grados de libertad de las moléculas de reactivos y productos constituyen el baño térmico a temperatura T , cuyo efecto total sobre las partículas se encuentra descrito a través de una fuerza fluctuante $\xi(t)$ y por una fuerza de amortiguamiento lineal $-M\gamma\dot{x}$ donde γ es la constante de amortiguamiento. Estas fuerzas entran en la ecuación de Langevin en la forma de:

$$M\ddot{x} = -U'(x) - M\gamma\dot{x} + \xi(t) \quad (2.1)$$

Donde la prima indica diferenciación respecto a la coordenada x [47].

Si se relaciona las fluctuaciones a una apropiada escala de energía E_{ruido} , las transiciones entre dos regiones atractoras A y C serán infrecuentes cuando se cumpla que

$$\frac{E_{ruido}}{E_b} \ll 1 \quad (2.2)$$

Donde $E_b = U(x_b) - U(x_a)$ es la barrera que separa los estados A y C . Para sistemas en contacto con un ambiente térmico a una temperatura T , la escala de energía $E_{ruido} = k_B T$, donde k_B es la constante de Boltzmann.

A partir de este modelo, Kramers en su trabajo [47] encontró que la tasa de escape desde el pozo A al C en un medio con una alta viscosidad, como por ejemplo un sistema biológico sumergido en agua, es:

$$k_{A \rightarrow C} = \frac{\omega_0 \omega_b}{2\pi\gamma} \exp\left(-\frac{E_b}{k_B T}\right) \quad (2.3)$$

Donde ω_0 es la frecuencia angular dentro del mínimo metaestable y ω_b es la frecuencia angular en el estado de transición. El valor que precede al exponencial se lo conoce como la frecuencia de intento de escape del pozo ν_D .

2.2.2. BARRERA ENERGÉTICA EN PRESENCIA DE UNA FUERZA EXTERNA

Bell fue el primero en analizar el aumento de la tasa de disociación bajo la acción de una fuerza externa f [48]. En este modelo, la tasa de disociación k , es el producto de la frecuencia de intento de escape del pozo ν_D , y de la probabilidad de alcanzar el estado de transición con una barrera E_b , descontando la energía mecánica entregada $f x_\beta$ para dar

$$k = \nu_D \exp[-(E_b - f x_\beta)/k_B T] \quad (2.4)$$

Se asume que la fuerza aplicada f actúa directamente a lo largo de la coordenada de reacción x , alcanzando x_β en el estado de transición y $k_B T$ establece la escala de energía térmica. La importancia del trabajo de Bell es que expuso la importancia del papel de la fuerza mecánica en la biología. Hay que destacar que todas las características del entorno de energía se agrupan en un solo parámetro que es la longitud x_β . Por ello existen investigaciones [49] donde se modifica el término del exponente para capturar las variaciones en el comportamiento de la ruptura.

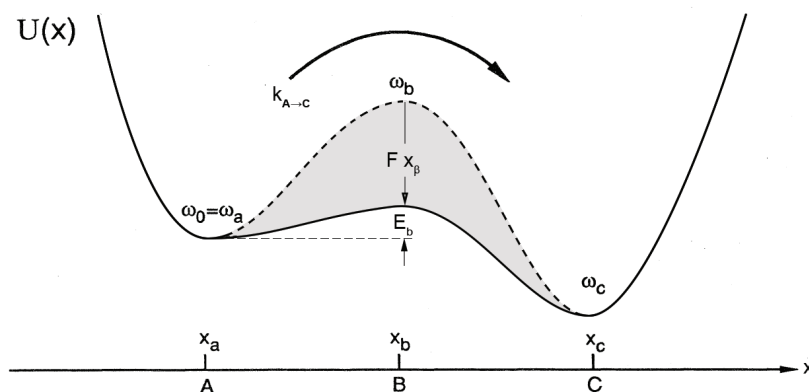


Figura 2.3: Esquema de la disminución de la barrera energética al momento de ser aplicada una fuerza.

(Adaptado de [46, pág. 256]).

La fuerza juega un papel importante en el comportamiento de la barrera energética en una disociación. Cuando ésta aparece provoca una disminución en la barrera (Figura 2.3) y da a la partícula una mayor probabilidad de cruzarla. Cuando la fuerza es lo suficientemente grande para hacer desaparecer la barrera se la conoce como

la fuerza crítica (F_c). En ausencia de fuerza externa, el enlace se disocia eventualmente tal como describe la teoría de Kramers. Este escape activado térmicamente se lo conoce como el límite cinético. Cuando $F > F_c$, la disociación es dominada por el estiramiento mecánico, por eso se lo llama el límite mecánico.

2.3. RUPTURA FORZADA DE LA HORQUILLA

La separación de la doble cadena de ADN es fundamental en el proceso de replicación en los organismos vivos. En equilibrio, ésta se separará cuando la energía libre de la cadena simple sea menor que aquella de la doble cadena. Experimentalmente esto se puede obtener incrementando la temperatura hasta que el ADN se funda. Pero en los organismos vivos la separación no se realiza de forma térmica, más bien se la lleva a cabo bajo la acción de fuerzas generadas por enzimas.

Uno podría predecir que si se abre el ADN aplicando una fuerza constante por encima de la energía de transición, la doble cadena se separaría con bastante rapidez sin importar la secuencia de bases. Sin embargo, las variaciones de la secuencia producen estados intermedios metaestables lo que resultan en pausas significativas durante el cual el número de bases separadas no cambia [50]. La separación de las bases en función del tiempo se muestran como saltos bruscos seguidos de mesetas en donde la separación no va a cambiar. Incluso en moléculas idénticas de ADN el número de pares de bases que se separan en un determinado tiempo es diferente.

2.4. COMPONENTES DE LA ENERGÍA DE LA HORQUILLA

Las barreras energéticas en la horquilla pueden considerarse como resultado de la contribución de varias componentes: la interacción de los pares de bases a través de puentes de hidrógeno, las interacciones de apilamiento de las bases a través de interacciones $\pi-\pi$ y la resistencia mecánica del esqueleto. Sin embargo la relación relativa entre estas componentes no es clara.

En el ADN, los puentes de hidrógeno se generan entre las bases de cadenas complementarias, con la adenina enlazándose sólo a la timina a través de dos puentes de hidrógeno y la guanina sólo a la citosina con tres puentes de hidrógeno. Las energías involucradas a estos enlaces han sido estudiadas usando diferentes métodos, algunos de estos resultados se muestran en la tabla 2.1. Para realizar una comparación con los resultados obtenidos, se utilizan los datos que provienen de cálculos mecano cuánticos (Lewis *et al.* [51], Bravaya *et al.* [52], Langlet *et al.* [53] y Jiang *et al.* [54]), cálculos con potenciales clásicos (Poltev *et al.* [55], Zhurkin *et al.*

[56]) y resultados experimentales (Yanson *et al.* [57]).

Tabla 2.1: Energías de interacción (kcal mol⁻¹) entre la Adenina – Timina y Citosina – Guanina halladas por varios autores.

Par de Bases	Lewis <i>et al.</i> [51]	Bravaya <i>et al.</i> [52]	Langlet <i>et al.</i> [53]	Jiang <i>et al.</i> [54]	Poltev <i>et al.</i> [55]	Zhurkin <i>et al.</i> [56]	Yanson <i>et al.</i> [57]
A-T	-11.2	-15.16	-12.9	-14.1	-11.3	-11.9	-13.0
C-G	-24.3	-	-23.0	-26.6	-25.5	-22.8	-21.0

Las interacciones de apilamiento se refieren a interacciones atractivas no covalentes generadas por los anillos aromáticos. Estas energías son las encargadas de modular la estructura, estabilidad, dinámica y plegamiento del ADN. Este fenómeno va a depender de varios parámetros de las bases tales como el giro, inclinación, elevación, torsión entre otras [58]. En la Tabla 2.2 se muestra las energías de interacción involucradas en el ADN para cálculos mecano cuánticos (Cooper *et al.* [59], Šponer *et al.* [60]) y para energías de apilamiento cuando las bases se las rodea de agua (Šponer *et al.* [60]).

Tabla 2.2: La energía de apilamiento (kcal/mol) de los pares de bases de ADN. La primera y segunda columna muestra valores de pares de bases en el vacío con diferentes niveles de teoría y conjuntos base. La tercera columna muestra la energía de apilamiento cuando a las bases se las rodea de agua.

	Cooper <i>et al.</i> vdW-DF [59]	Šponer <i>et al.</i> MP2/5-31G [60]	Šponer <i>et al.</i> HF/6-31G [60]
AT:AT	-14.0	-13.3	- 8.9
TA:TA	-15.1	-12.8	-10.6
CA:TG	-16.3	-15.1	- 8.0

La resistencia mecánica del esqueleto está compuesta por: las interacciones hidrofóbicas – hidrofílicas del esqueleto con las moléculas del solvente, interacciones de las cargas negativas del esqueleto con el solvente y estiramiento del esqueleto, las cuales son responsables de la estabilidad de la cadena. Sin embargo, las relaciones entre éstas no se encuentran bien definidas y por ello se las va a tratar como una sola.

2.5. DINÁMICA MOLECULAR

La dinámica molecular (DM) es un tipo de simulación computacional del movimiento de átomos y moléculas. Este modelo asume que las moléculas se encuentran compuestas por esferas (representando átomos) unidas a través de resortes (representado enlaces). En este marco, la energía de la molécula cambia con la

geometría porque los resortes se resisten a ser estirados o torcidos fuera de su longitud y ángulo natural y las esferas se oponen a ser comprimidas entre ellas [61].

A pesar de esta simplificación la DM permite resolver sistemas con una gran cantidad de átomos en un tiempo moderado. En algunos casos, los resultados que éste genera son casi tan exactos como los resultados que da la mecánica cuántica pero en una fracción del tiempo. Cabe recalcar que este método no hace referencia a los electrones y por ello no se puede dar información acerca de propiedades electrónicas como cambio en las distribuciones de carga, comportamientos electrofílicos y nucleofílicos, aunque existen varios algoritmos empíricos que permiten obtener valores aproximados de estos [40].

La DM es un método muy usado en la actualidad, por ejemplo en las áreas de ciencia de materiales, biofísica y bioquímica [61]. Debido a esto, se han creado una gran gama de programas, cada uno con ciertas especificaciones dependiendo del sistema a estudiar. Entre estos paquetes tenemos a CHARMM [62], AMBER [63], NAMD [64] y GROMACS [65]. Para el desarrollo de este trabajo se va a utilizar el programa NAMD [64].

2.6. ENERGÍA EN LA DINÁMICA MOLECULAR

El principio detrás de DM es expresar la energía de la molécula como función de la resistencia hacia el estiramiento, torsión de enlaces y hacinamiento de átomos. Con esta información se puede encontrar las longitudes de enlace, ángulos y diedros correspondientes al mínimo de energía geométrico o precisamente, el mínimo posible de la superficie de potencial. La forma de la expresión matemática de la energía y sus correspondientes parámetros constituyen el campo de fuerza.

Un atributo importante de los campos de fuerza, es que los parámetros que son desarrollados y probados para un pequeño número de casos se pueden aplicar para una gran variedad de problemas. Incluso, parámetros creados para moléculas pequeñas pueden ser usadas para un estudio de moléculas más grande como son los biopolímeros [40].

Una gran variedad de modelos de campos de fuerza son usados en sistemas moleculares y pueden ser interpretados como varias componentes de fuerza las cuales están asociadas a una energía de la siguiente manera [40, 61]:

$$E = \sum_{\text{enlaces}} E_{\text{extensión}} + \sum_{\text{ángulos}} E_{\text{rotación}} + \sum_{\text{diedros}} E_{\text{torsión}} + \sum_{\text{pares}} E_{\text{no enlazantes}} \quad (2.5)$$

Donde $E_{extensión}$, $E_{rotación}$, $E_{torsión}$ y $E_{no\ enlazantes}$ son las contribuciones de energía de la extensión de enlaces, la rotación de ángulos, el movimiento de torsión alrededor de enlaces y la interacción entre átomos o grupos de átomos que no están enlazados directamente como son la energía electrostática ($E_{electroestática}$) y la energía de Lennard-Jones (E_{LJ}). Una expresión para cada uno de los términos de la ecuación 2.5 se muestra a continuación:

$$E_{extensión} (R^{AB} - R_0^{AB}) = k^{AB} (R^{AB} - R_0^{AB})^2 \quad (2.6)$$

$$E_{rotación} (\theta^{AB} - \theta_0^{AB}) = k^{AB} (\theta^{AB} - \theta_0^{AB})^2 \quad (2.7)$$

$$E_{torsión} (\omega) = \sum_{n=1} V_n \cos (n\omega) \quad (2.8)$$

$$E_{electroestática} (R^{AB}) = \frac{\mu^A \mu^B}{\varepsilon (R^{AB})^3} (\cos \chi - 3 \cos \alpha_A \cos \alpha_B) \quad (2.9)$$

$$E_{LJ} (R) = \varepsilon \left[\left(\frac{R_0}{R} \right)^{12} - 2 \left(\frac{R_0}{R} \right)^6 \right] \quad (2.10)$$

2.7. OPTIMIZACIÓN GEOMÉTRICA EN LA DM

La DM permite realizar cálculos de la energía de un sistema formado por unos cuantos átomos hasta polímeros, como por ejemplo proteínas y ácidos nucleicos [61]. Aunque encontrar la energía de una estructura arbitraria puede ser interesante, las moléculas reales normalmente están en su estado de equilibrio. Por ello, encontrar este estado es esencial para poder hallar las constantes de equilibrio que se pueden comparar con resultados experimentales. Para este cálculo primero se necesita optimizar geoméricamente la estructura.

Durante la optimización se exploran diferentes geometrías hasta encontrar la geometría con la energía más baja. Una forma de visualizar esto es con una molécula diatómica, donde su única coordenada es la distancia entre enlaces. Se podría hacer un cálculo inicial de energía, luego acortar el enlace y verificar la energía. Si ésta baja, se está acercando a un mínimo, caso contrario se debería mover el enlace en dirección opuesta. Esta forma de realizar la optimización tiene una convergencia muy lenta. Sin embargo hoy en día existen métodos que alcanzan el mínimo en sólo diez pasos.

2.8. EQUILIBRACIÓN EN LA DM

En la Figura 2.4 se puede apreciar una descripción simplificada del algoritmo que usa todo programa de dinámica molecular. Esta simulación procede iterativamente alternando el cálculo de las fuerzas y resolviendo las ecuaciones de movimiento basado en las aceleraciones obtenidas a partir de las nuevas fuerzas. En la práctica, casi todos los códigos de DM usan versiones más complejas, incluyendo varios pasos para resolver las ecuaciones de movimiento y muchos pasos adicionales para controlar la temperatura, presión, volumen, entre otros.

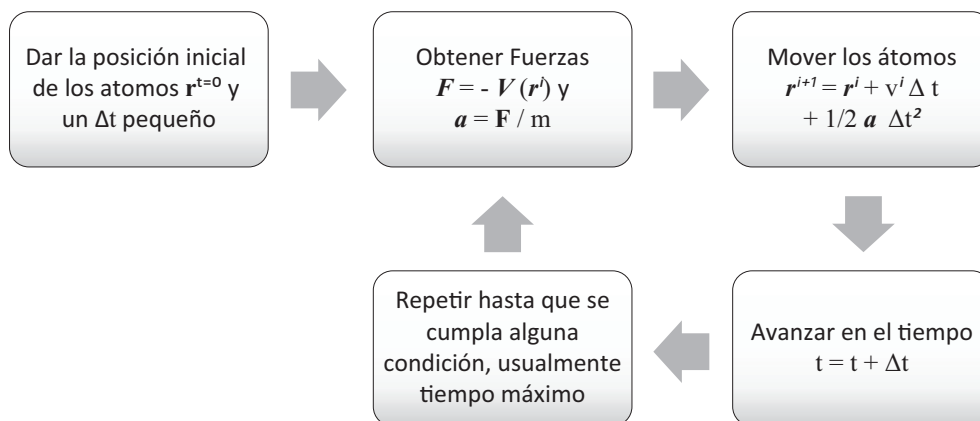


Figura 2.4: Esquema simplificado del algoritmo de dinámica molecular.

CAPÍTULO 3

MÉTODOS

3.1. NAMD

NAMD (NAnoscale Molecular Dynamics) [66], es un programa de dinámica molecular diseñado para simulaciones de alto rendimiento en biología molecular [64]. En términos generales, NAMD resuelve las ecuaciones de trayectorias atómicas de forma numérica asumiendo que los átomos obedecen las leyes de la mecánica clásica y su entorno puede ser descrito mediante un campo de fuerza definido con parámetros empíricos. Existen varios campos de fuerza que puede utilizar NAMD como CHARMM, AMBER, GROMACS. Para el presente trabajo se empleó el campo de fuerza CHARMM.

Este programa ofrece la posibilidad de realizar cálculos en forma paralelizada. Esto permite que una misma tarea sea realizada por varios procesadores simultáneamente lo que significa una reducción considerable de tiempos [67]. Algunas otras características del programa NAMD son:

1. NAMD es compatible con otros programas de simulación como CHARMM y X-PLOR, por lo que es posible la migración de datos entre estos tres programas.
2. NAMD incorpora el algoritmo de Particle Mesh Ewald (PME) [68], el cual reduce el costo computacional a la hora de evaluar fuerzas electroestáticas.
3. Los archivos de entrada de NAMD se definen con coordenadas en formato PDB (i.e., Protein Data Bank). Los archivos de estructura se escriben en formato X-PLOR PSF. Los archivos de parámetros se definen en formatos CHARMM o X-PLOR. Finalmente, los archivos de salida se escriben en formato PDB que contienen las coordenadas atómicas y un archivo DCD que contiene las trayectorias en formato binario.

4. NAMD es un programa que se distribuye de forma gratuita, además es un código “open source”, lo que implica que el código fuente puede ser leído, reproducido y modificado.
5. NAMD está asociado al visualizador de estructuras VMD [69], el cual, a más de la visualización, permite la generación de archivos que puede utilizar NAMD.

Para las simulaciones se usó la versión de NAMD 2.7 para Linux-i386 instalado en un clúster de cinco computadoras Core-Duo de 32-bits, con un servidor Quad de 64-bits. El sistema operativo instalado en el clúster fue la distribución de Linux Rocks 5.3 [70], el cual permite correr programas en paralelo de forma sencilla ya que Rocks incluye todo lo necesario para poder trabajar con NAMD, desde la sincronización del servidor con los nodos hasta el sistema de colas. Gracias a la configuración del clúster se pudieron realizar cálculos en un máximo de diez procesadores.

Para correr cualquier simulación de dinámica molecular, el programa NAMD requiere por lo menos cuatro archivos, que son:

- Archivo PDB (Protein Data Bank), este archivo almacena las coordenadas atómicas del sistema. Estos pueden ser generados a mano o sino se encuentran disponibles en la página <http://www.pdb.org>
- Archivo PSF (Protein Structure File), éste almacena la información estructural de la biomolécula, tales como tipos de átomos, enlaces, ángulos, diedros, torsiones impropias y términos cruzados.
- Archivo de parámetros de campos de fuerza. Un campo de fuerza es una expresión matemática del potencial que experimentan los átomos en el sistema. El archivo de parámetros define la fuerza de enlace, longitudes de equilibrio, entre otros. Para nuestro caso se utilizó el campo de fuerza CHARMM27 debido a que era la última versión en la fecha que se realizó el proyecto. Además es el campo de fuerza por defecto que posee NAMD, el cual posee todas los parámetros necesarios para realizar simulaciones de biomoléculas [62].
- Archivo de configuración, éste contiene toda las opciones que NAMD debe usar cuando se corre la simulación.

3.2. CONSTRUCCIÓN DEL MODELO DE LA HORQUILLA

El modelo de horquilla AACC4 (ATATACCCCGTATAT), que es objeto del presente trabajo, se construyó a partir de los datos publicados como material suple-

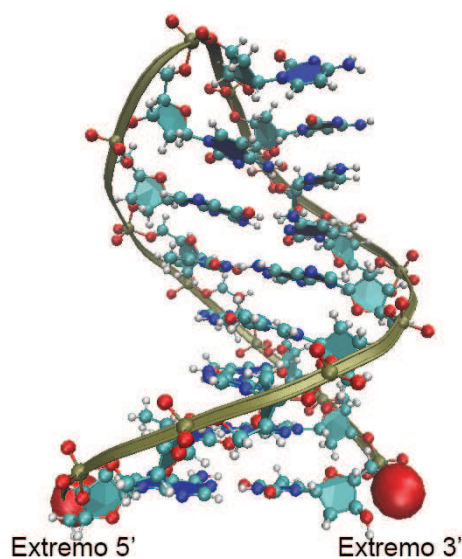


Figura 3.1: Hoquilla AACC4 extraído de la información suplementaria de Zhang *et. al.* [39]
Figura hecha con VMD [69].

mentario en el trabajo de Zhang *et. al.* [39]. La razón por la que se escogió esta secuencia, se debe a que es relativamente corta y por ende su simulación no requiere de grandes recursos computacionales. Adicionalmente el modelo es importante por estar compuesto de cinco pares de bases A–T lo que permite realizar un estudio sistemático de la disociación de este par. Para ello se aplicó una fuerza externa constante a los pares adenina-timina ubicados en extremos opuestos 5' y 3' de la secuencia.

Para facilitar los cálculos de separación de la horquilla, ésta fue orientada de tal manera que los átomos del oxígeno correspondiente a la terminación 3' de la primera base sea el origen de coordenadas y el oxígeno de la terminación 5' de la última base se encuentre en el eje X. De esta forma se pueden separar los extremos mediante el simple estiramiento de la molécula en una sola dirección. El proceso de orientación de la molécula se logró mediante “scripts” de traslación y rotación que se incluyen en los Anexos B y C. Estos modifican el archivo PDB de coordenadas con las nuevas posiciones.

3.2.1. GENERACIÓN DEL ARCHIVO PSF DE LA ESTRUCTURA

Para la generación del archivo PSF correspondiente al modelo de la horquilla AACC4 se empleó una aplicación del programa VMD (versión 1.8.7) llamado Automatic PSF Builder. Esta aplicación genera el archivo PSF de forma automática a partir de los archivos de topología y PDB del sistema. En el presente caso, se empleó el archivo de la horquilla AACC4 y el archivo de topología incluido por defecto en el programa VMD, el cual se llama *par_all27_prot_lipid_na.inp* que contiene

la información de los parámetros de lípidos, aminoácidos y ácidos nucleicos del CHARMM27.

3.2.2. PREPARACIÓN DEL MODELO SOLVATADO DE LA HORQUILLA

Con el fin de investigar el comportamiento de la horquilla en medio acuoso – en el cual ocurren típicamente las reacciones de relevancia biológica– se introdujo al modelo generado en el interior de una caja llena de moléculas de agua. Hay que tener presente que esta caja debe ser lo suficientemente grande para permitir las modificaciones estructurales de la horquilla que son necesarias para simular la transición desde su estado plegado hacia el desplegado; y que, a la misma vez, ésta no debe ser demasiado grande ya que esto causaría un incremento en el tiempo requerido para los cálculos. Para obtener las dimensiones óptimas de la caja, en la cual se introdujo la horquilla, se consideró la distancia de los puntos extremos del modelo en las direcciones X, Y y Z en estos dos estados. Se determinó que los extremos de la horquilla se abren hasta 102 Å, mientras que en su estado plegado la molécula ocupa un volumen de alrededor de 30 Å x 30 Å x 20 Å. Considerando estas medidas, se introdujo al modelo en una caja de 112 x 40 x 30 Å. Esto se realizó para dar un pequeño margen de 10 Å en cada dirección y así evitar que la horquilla salga de la caja (Figura 3.2). En el Anexo D se puede ver el “script” que se ejecutó para crear esta caja con 8,231 aguas.

Es importante notar que la horquilla AACCC4 se encuentra cargada negativamente, ya que cada grupo fosfato de las bases aporta con e^- al sistema. Debido a que el programa NAMD no puede realizar cálculos en sistemas con carga, se requiere neutralizar el modelo empleando iones como por ejemplo el Cl^- y Na^+ . Para esto se utilizó la aplicación *Addions* de VMD, la cual incorpora aleatoriamente iones en toda la caja de agua hasta que ésta llega a una carga total igual a cero. Para la caja

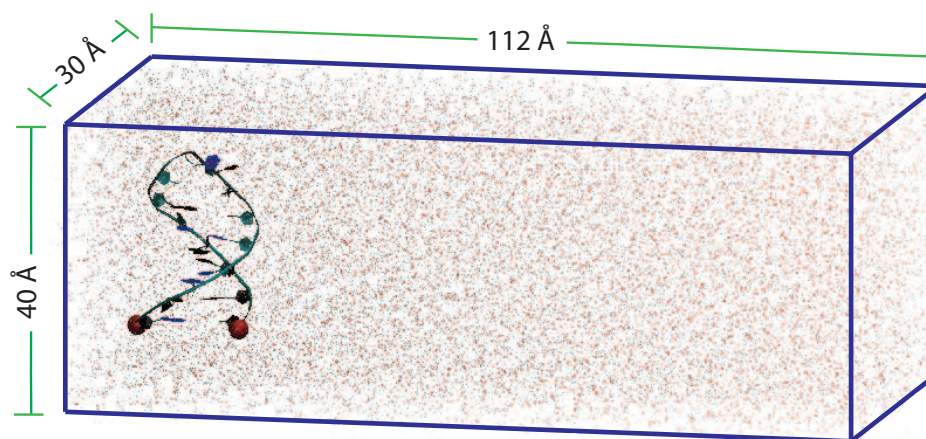


Figura 3.2: Dimensiones de la caja de Agua junto a la horquilla en su estado plegado.

de agua de la horquilla AACC4 se utilizó 31 iones de Cl^- y 46 de Na^+ .

3.3. RMSD

La desviación cuadrática media o RMSD (Root-Mean-Square Deviation) es un número que caracteriza la cantidad por la cual una configuración anterior [71]. Se define como:

$$RMSD_{\alpha}(t_j) = \sqrt{\frac{1}{N_{\alpha}} \sum_{\alpha=1}^{N_{\alpha}} \left(\tilde{\mathbf{r}}_{\alpha}(t_j) - \frac{1}{N_t} \sum_{i=1}^{N_t} \tilde{\mathbf{r}}_{\alpha}(t_i) \right)^2} \quad (3.1)$$

Donde el N_{α} es el número de átomos cuyas posiciones están siendo comparados, N_t es el número de pasos de tiempo sobre el cual las posiciones atómicas se están comparando, $\tilde{\mathbf{r}}_{\alpha}(t_j)$ es la posición del átomo α en el tiempo t_j .

El RMSD se usa para conocer si la estructura ha llegado a un estado estable. Si el RMSD sigue creciendo al final de una simulación indica que la estructura está buscando un mínimo de energía.

3.4. MINIMIZACIÓN DE LA ENERGÍA

El proceso de minimización de energía del sistema encuentra mínimos locales en la superficie del entorno de energía de la molécula. La forma en que el programa realiza la minimización es variando la posición de los átomos en forma sistemática y calculando la energía asociada a la estructura obtenida.

Para realizar la minimización, NAMD usa el método del gradiente conjugado [64]. Este método es usado para seleccionar sucesivamente las direcciones en las cuales debe ser guiada la búsqueda. Esto evita que la minimización se realice dos veces en una misma dirección. En cada dirección, se encuentra primero un mínimo y luego se lo hace converger ya sea por el método de la “búsqueda de la selección dorada” o una “convergencia cuadrática” usando la información del gradiente [72].

Con el sistema de la horquilla más agua se realiza la correspondiente minimización de energía, la cual se lleva a cabo a 0 K por un total de 10,000 pasos. El archivo de configuración para la minimización que se utilizó para correr la horquilla conjuntamente con el agua se encuentra en el Anexo E.

3.5. CALENTAMIENTO DEL SISTEMA

Luego de la minimización, la velocidad de los átomos se aumenta de forma gradual, es decir, considerando una gradiente de temperatura, de tal manera que

se permita al sistema equilibrarse a medida que la temperatura va incrementando. Primero se sube 0.375 K, luego se equilibra el sistema por 25 pasos y se repite el proceso hasta alcanzar la temperatura deseada. La meta de 300 K se cumplió en 20000 pasos. Para esto se utilizó el archivo de configuración incluido en el Anexo F.

3.6. EQUILIBRACIÓN DEL SISTEMA

El procedimiento de equilibración involucra cálculos de dinámica molecular en los que se resuelve la segunda ecuación de Newton para cada átomo del sistema y así obtener su trayectoria. Al igual que la minimización, la equilibración es un proceso iterativo, el cual se considera que ha llegado a convergencia cuando se encuentra una distribución adecuada de las velocidades, presiones y trayectorias del sistema en un determinado tiempo. Estos parámetros se pueden analizar con la ayuda del programa VMD. Además se puede examinar la desviación estándar RMSD (Desviación Cuadrática Media) del esqueleto de la molécula para determinar si ésta ha llegado a un estado estable.

La equilibración de la horquilla se la realizó por 2 ns (2,000,000 pasos de simulación). Además se utilizó el control de temperatura de Langevin [64], lo que ayuda a estabilizar la temperatura del sistema. Ésta opción mide la temperatura a medida que pasa la simulación y si esta se eleva muy por encima de la temperatura deseada realiza una corrección a las velocidades de todas las partículas. Todas opciones que se utilizaron en el archivo de configuración se encuentran en el Anexo G.

Es importante mencionar que para las simulaciones de minimización, calentamiento y equilibración se fijó el movimiento del átomo de oxígeno terminal de la primera base mientras que el oxígeno terminal de la última base se restringió el movimiento al eje X. De esta forma se logró que los oxígenos terminales de la horquilla, luego de ser equilibrada, se encuentren orientados en la dirección X. Esto es relevante para el presente estudio ya que posteriormente se realizará la transición del estado plegado hacia el desplegado usando una fuerza constante en la dirección del eje X. De esta forma se evitará producir un torque sobre la horquilla.

3.7. SIMULACIONES DE DINÁMICA MOLECULAR DIRIGIDA

En NAMD las fuerzas externas se pueden aplicar a uno o más átomos, los cuales son llamados átomos SMD. Existen dos formas en las que se puede aplicar las fuerzas. La primera es estirando una biomolécula a velocidad constante y la otra es empleando una fuerza constante. Las simulaciones en las que se usa el estira-

miento a velocidad constante involucra el enlace de los átomos SMD con un átomo ficticio a través de un resorte virtual. Al desplazar este átomo ficticio con una velocidad constante en la dirección deseada, el átomo SMD experimenta la acción de la fuerza que es linealmente dependiente de la distancia que los separa. A este tipo de simulaciones se las puede ver como los experimentos de AFM. Cuando se estira una molécula bajo la acción de una fuerza constante, el átomo SMD experimenta directamente la acción de la fuerza. Aquí no existen ni resortes virtuales ni átomos ficticios. Este método es el que se empleó en el presente estudio para separar las cadenas de la horquilla. El archivo de configuración que se usó para la ruptura forzada se incluye en el Anexo H.

Como se mencionó anteriormente, en todo el proceso de preparación de la molécula hasta la equilibración, se la mantenga orientada de tal forma que el oxígeno terminal de la primera base se mantiene fija y el oxígeno de la última base está orientado en la dirección X. Para realizar la ruptura de las bases a fuerza constante, se sigue manteniendo fijo el primer oxígeno y definimos al oxígeno terminal de la última base como el átomo SMD, el mismo que será sometido a una fuerza en la dirección X. Se realizó la extensión de la horquilla usando nueve diferentes fuerzas: 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 pN. Para cada fuerza se realizaron siete simulaciones.

3.8. CÁLCULO DE TIEMPOS MEDIOS

El tiempo de ruptura se obtuvo utilizando como indicador la desviación estándar de las distancias entre los centros de masa de los anillos de las bases complementarias para cada uno de los pares de bases. Cuando este valor sobrepasa los 0.75, se considera que ocurre la ruptura. Se asumió este valor tomando en cuenta que si las bases sobrepasan este valor ya no podrán volver a formar el enlace debido a que el aumento en la desviación estándar indica que el par de bases están saliendo de su posición de equilibrio. De esta forma se obtuvieron sesenta y tres tiempos de ruptura. A estos se los agrupó dependiendo de la fuerza a la cual fue sometido y se realiza el promedio.

3.9. COMPONENTES DE ENERGÍA

Como se mencionó en el capítulo 2, las barreras energéticas pueden considerarse como la contribución de tres componentes que son: la interacción de los pares de bases a través de puentes de hidrógeno, las interacciones de apilamiento de las bases a través de interacciones $\pi-\pi$ y la resistencia mecánica del esqueleto de

la horquilla. Para obtener la información de la energía, se utilizó la opción *NAMD Energy* del programa VMD. Esta opción permite obtener la energía de una selección de átomos partiendo de las simulaciones de rupturas forzadas previas usando los correspondientes archivos DCD.

En el cálculo de la energía de interacción de los puentes de hidrógeno se consideró la diferencia de energía de las bases en su estado enlazado y desenlazado. La selección que se usó para estos cálculos excluye la parte del esqueleto que corresponde al nucleótido. Luego se obtuvo una energía media para cada una de las bases considerando la fuerza a la que fueron sometidas.

Para extraer la información del apilamiento se agruparon dos pares de bases, es decir el grupo 1 consta del par 1 y par 2, el grupo 2 consta del par 2 y par 3, etc. Luego a cada grupo se le restó las cuatro bases y las energías correspondientes a la interacción de los puentes de hidrógeno. De esta forma sólo queda la energía de interacción de los enlaces $\pi - \pi$.

La resistencia mecánica no puede ser extraída directamente debido a que la información de esta energía no se encuentra sólo en el esqueleto sino que también involucra interacciones con las bases y el resto del sistema. Por ello para extraer esta información se utilizará la energía total involucrada en la ruptura de la horquilla menos las dos componentes que ya se conocen.

Para la energía total involucrada en la ruptura primero se calcula la energía de toda la horquilla excluyendo el agua. Luego se separan las energías de acuerdo a su tiempo de ruptura y para cada par de bases se obtiene una energía promedio. Por último se resta las energías de las bases cuando se encuentran enlazadas y desenlazadas.

3.10. ANÁLISIS DE LOS TIEMPOS DE RUPTURA

Para probar si la ruptura forzada de la horquilla cumple la teoría de Kramers–Bell se utilizó la Ecuación 2.4 del capítulo 2 y comparó con regresiones de los datos obtenidos en las simulaciones. La ecuación 2.4 muestra la relación entre la tasa de escape y la fuerza aplicada. Puesto que de los resultados se obtiene el tiempo de ruptura (τ), es conveniente invertir la ecuación de tal manera que:

$$\tau = \tau_0 \exp[(E_b - fx_\beta)/k_B T] \quad (3.2)$$

Donde $\tau = k^{-1}$ y τ_0 es el tiempo que toma al sistema pasar la barrera energética. Como se puede ver existe una dependencia lineal entre el $\ln \tau$ y la fuerza externa (f) que experimenta el sistema. De esta manera la ecuación 3.2 se la reescribe de la siguiente manera:

$$\ln \tau = \ln \alpha + \beta f \quad (3.3)$$

Donde $\ln \alpha = \ln \tau_0 + E_b/k_B T$ y $\beta = -\frac{x\beta}{k_B T}$. De esta manera se pudo realizar una regresión lineal con los datos obtenidos y verificar si éstos siguen la forma que Kramers–Bell predicen. También se averiguó el valor de la constante τ_0 con el fin de saber los tiempos involucrados en el salto de la barrera de energía.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS

4.1. SIMULACIONES DE DINÁMICA MOLECULAR

4.1.1. MINIMIZACIÓN Y CALENTAMIENTO

La preparación de la horquilla AACCC4 más agua (Figura 4.1) se encuentra detallado en el capítulo 3. En la figura 4.2 se presenta la evolución temporal de la Desviación Media Cuadrática o RMSD (Root-Mean-Square Deviation) la cual muestra la diferencia entre de las posiciones de los átomos de la estructura inicial comparándolas con el resto de las posiciones que toma la molécula en cada paso. En este caso compara la estructura inicial de la horquilla con las posiciones que toma en la minimización y calentamiento.

Como se puede ver, el RMSD aumenta debido a las nuevas posiciones de equilibrio que van tomando los átomos en el transcurso de la simulación. En la estructura se observan cambios en las bases del lazo de la horquilla con un RMSD que llega a 1.2 Å en el paso 7000 del calentamiento. Éstas giran exponiéndose hacia el agua que rodea la estructura, lo cual ya se mencionaba en el paper de Zhang et. al. [39].

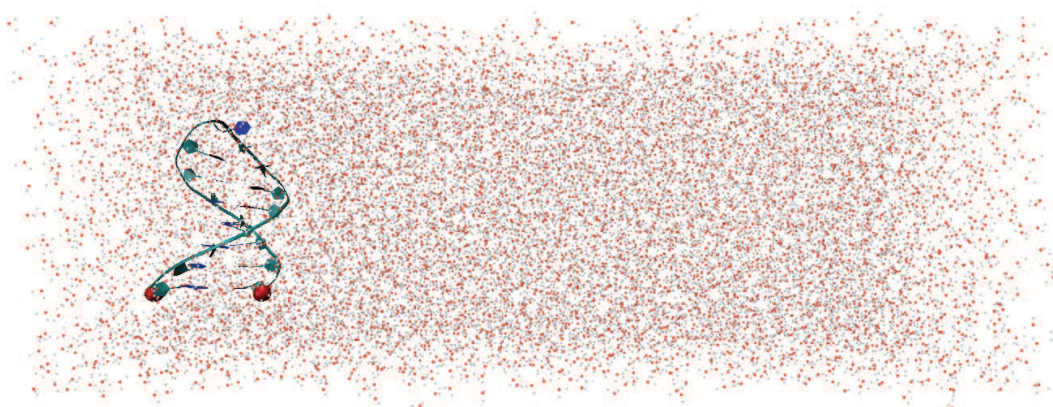


Figura 4.1: Caja de Agua junto a la horquilla en su estado plegado.

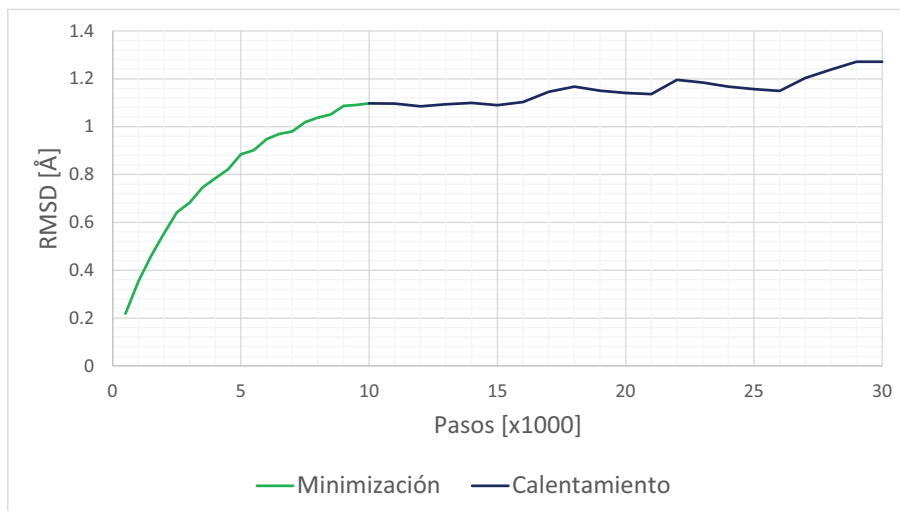


Figura 4.2: RMSD de la horquilla AACC4 para la Minimización (Línea verde) y Calentamiento (Línea azul) a 300K.

4.1.2. EQUILIBRACIÓN

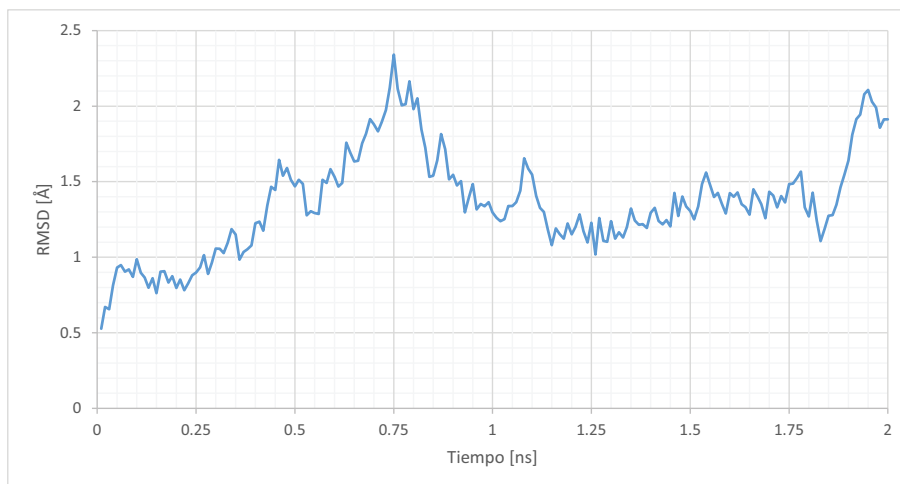
En la Figura 4.3a se puede observar como fue el proceso de equilibración para el sistema en los 2 ns. Se observa que en el picosegundo 750 existe un máximo del RMSD. Posteriormente comienza a decrecer hasta mantenerse alrededor del valor de 1.5 Å. Luego se observa que después de 1.8 ns se presenta otro salto en el RMSD indicando que la estructura llegó a otra conformación. Para confirmar si el sistema se encuentra en un estado de equilibrio se procedió a realizar una equilibración posterior de 1 ns y esto confirma que el estado que se encontró en el segundo nanosegundo es un estado en equilibrio y es posible considerar a esta estructura como punto de partida de la dinámica molecular dirigida.

De igual forma se calculó el radio de giro de la estructura. En la Figura 4.3b, se puede observar que ésta es estable a partir del primer nanosegundo. Esto también confirma que la estructura se encuentra en un estado estable en los 2 ns.

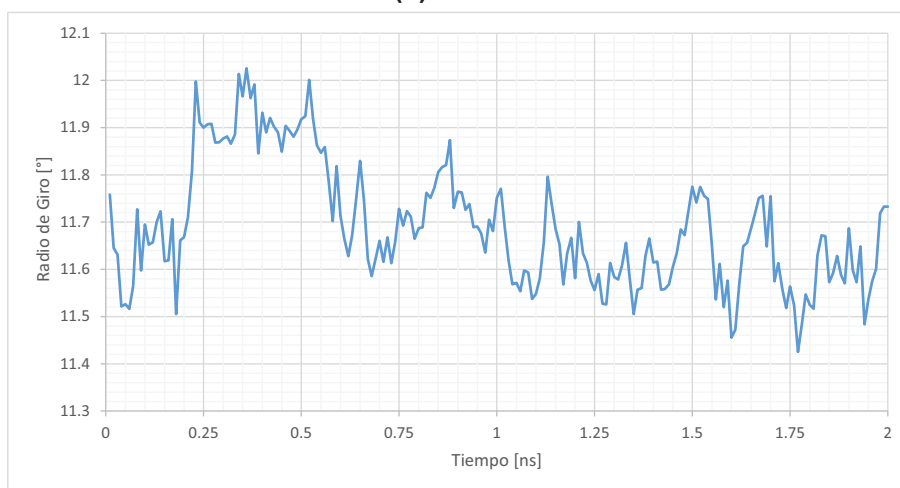
4.2. SIMULACIONES DE DINÁMICA MOLECULAR DIRIGIDA

Todas las simulaciones de dinámica molecular dirigida tomaron como punto de partida la estructura equilibrada obtenida anteriormente. La horquilla fue sometida a rupturas a fuerza constante de 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 y 500 pN. y a cada una de estas se realizaron siete repeticiones. Cada disrupción de la horquilla inicia con el par de bases más cercano al punto de aplicación de la fuerza llamado Par 1. Este proceso de ruptura seguirá abriéndose como si fuera un cierre a partir de este primer par, como se puede apreciar en la Figura 4.4.

Para cada simulación se obtuvo un tiempo medio de ruptura para cada par de



(a) RMSD.



(b) Radio de Giro.

Figura 4.3: RMSD y Radio de Giro para la horquilla AAC4 en la equilibración.

bases en la horquilla, el cual fue calculado siguiendo el método presentado en la sección 3.8. Se observa que a la fuerza externa le toma diferentes intervalos de tiempos romper cada par de bases, a pesar de que 5 de los 6 pares son adenina – timina. De igual forma sucede para cada repetición a la misma fuerza, ningún proceso de separación es igual al otro. Este proceso estadístico es explicado a través de la teoría Kramers–Bell y es por esta razón que se realizaron varios ensayos para poder obtener una mejor descripción del sistema.

También se pudo notar que existe una dependencia entre la fuerza y el tiempo de ruptura. A medida que la fuerza aplicada al sistema es menor, el tiempo en el que se separan las bases aumenta. Estos tiempos pasan de ser un par de picosegundos para fuerzas de 500 pN a cientos de picosegundos, incluso un par de nanosegundos en el caso de 100 pN.

En la figura 4.5 se aprecia como varía la distancia entre el átomo fijo (oxígeno

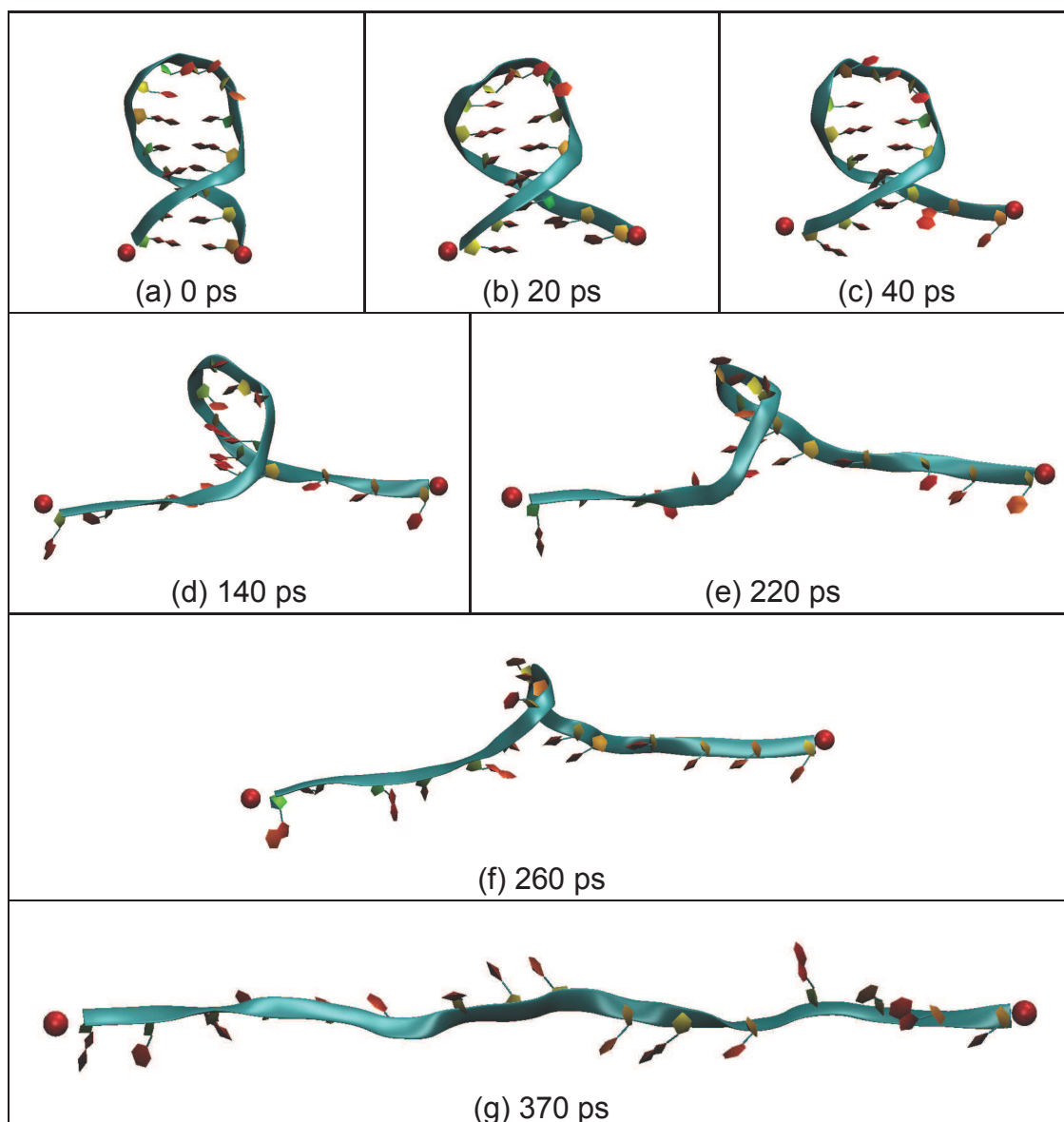


Figura 4.4: Secuencia de la ruptura de la horquilla bajo una fuerza de 300 pN.

terminal de la primera base) y el SMD (oxígeno terminal de la última base) con respecto al tiempo. En este caso se trata de una fuerza de 100 pN, se observa en el gráfico la formación de mesetas seguidas de saltos en el eje de la distancia. La creación de esta forma de escalera se debe a que al momento de la ruptura las bases se separan, lo que se genera un salto en el eje de la distancia. Así mismo, mientras el par se encuentra enlazado, no existirá un cambio en la distancia por lo que se forma una platea. A medida que la fuerza aumenta este comportamiento es cada vez menos notorio hasta perderse por completo a fuerzas mayores de 200 pN.

Igualmente se observa que existe diferencia en la forma que se desenrolla la horquilla dependiendo de la fuerza. Para fuerzas bajas, es decir entre 100 y 200 pN, la molécula gira desenvolviéndose de su hélice y luego se rompen los enlaces entre

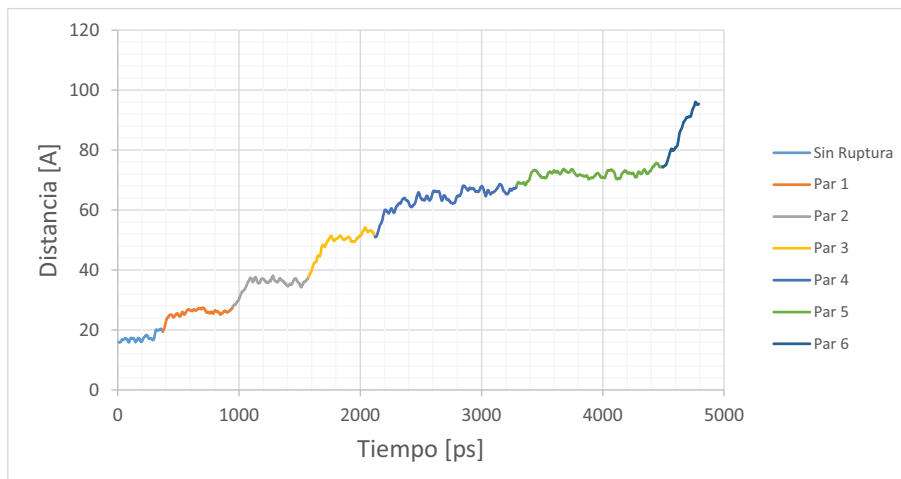


Figura 4.5: Gráfico de la distancia entre los átomos oxígeno terminal de la primera base (fijo) y el oxígeno terminal de la última base (SMD) entre las bases extremas aplicando una fuerza de 100 pN.

los nucleótidos (Figura 4.6a). Si la fuerza es alta, entre 400 y 500 pN, la molécula se desenrolla al mismo tiempo que se va abriendo (Figura 4.6b). Esto va a ser de importancia para el cálculo posterior de los tiempos de ruptura ya que la fuerza en cada base es sólo una componente de la fuerza externa aplicada y depende de la orientación de los pares de base con respecto al eje X.

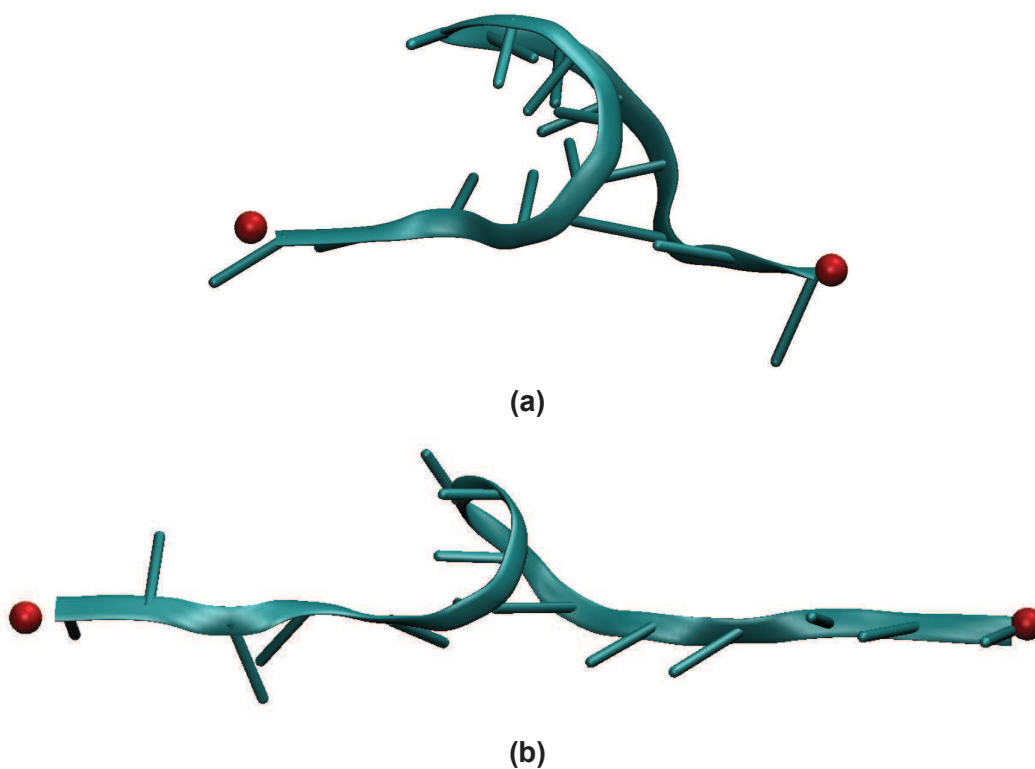


Figura 4.6: a) Horquilla desenrollándose aplicando una fuerza de 100 pN., b) Horquilla desenrollándose aplicando una fuerza de 500 pN.

4.2.1. CORRECCIÓN DE LOS TIEMPOS DE RUPTURA

Se realizaron dos correcciones a los intervalos de tiempo de ruptura para cada ensayo. La primera corrección toma en consideración la fuerza efectiva que actúa sobre cada par de bases para su ruptura. Cuando se aplica la fuerza al átomo SMD, no toda la fuerza se transmite por completo a cada par de bases. Esto va a depender de la orientación que posean los pares con respecto al eje X. En este punto es donde radica la importancia de que la horquilla se desenrolle rápidamente, puesto que si no lo hace la componente de la fuerza que actúa sobre los pares va a ser menor.

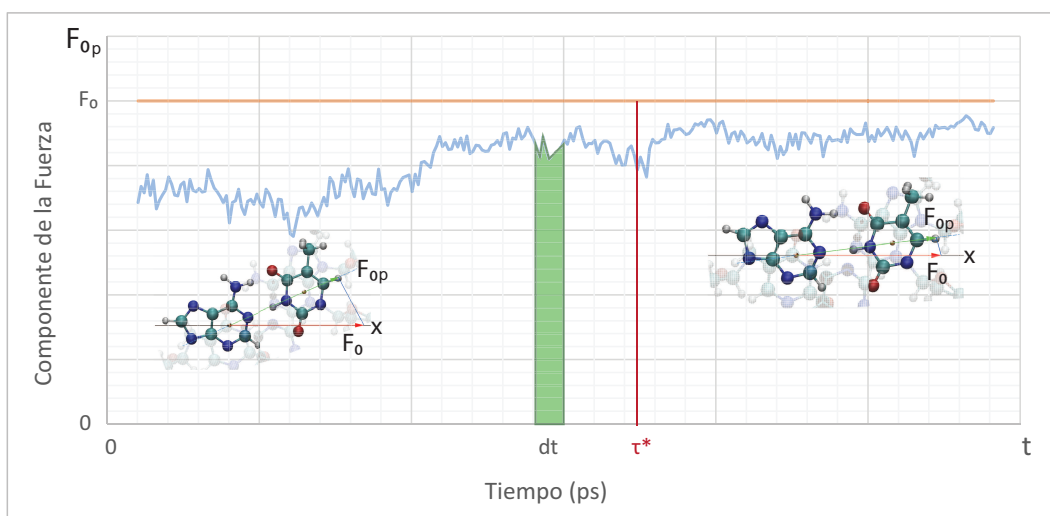


Figura 4.7: Gráfico de la componente de la fuerza que se aplica sobre la primera base en la dirección de la fuerza (color azul) comparando con la fuerza total aplicada (color anaranjado). En las figuras insertas muestra la orientación del par de bases con respecto a la fuerza total F_0 , en el intervalo de tiempo.

En la figura 4.7 se puede ver la diferencia entre la fuerza F_0 aplicada a un par de bases (color naranja) y su componente en la dirección X (color azul). En un comienzo las bases no se encuentran alineadas por ello la componente de la fuerza es mucho menor que el valor F_0 . Pero esto cambia al final del gráfico ya que se alinean de esta forma la componente de la fuerza aumenta. Debido a esto el tiempo medio efectivo disminuirá, para tener en cuenta se usará el teorema del valor medio es decir:

$$F_0 \tau^* = \int_0^{\tau} F_0 \cos \theta dt \quad (4.1)$$

$$\tau^* = \int_0^{\tau} \cos \theta dt \quad (4.2)$$

Cambiando la integral a una sumatoria, tenemos:

$$\tau^* = \sum_{i=1}^N \cos \theta_i \Delta \tau \quad (4.3)$$

Una segunda corrección se realiza al tiempo inicial de las rupturas de los pares. Para esto se considera el ángulo formado entre el centro de masa de cada base con el carbono C1' del azúcar de la respectiva base y el átomo SMD (Figura 4.8).

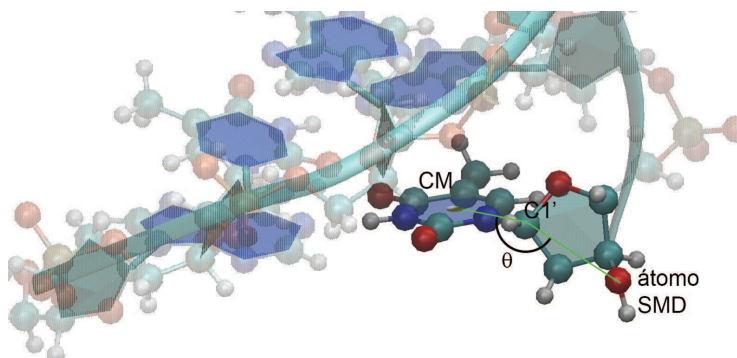


Figura 4.8: Ángulo entre el centro de masa del anillo de la base, el carbono C1' del azúcar y el átomo SMD el cual se utiliza para la corrección del tiempo.

Cuando este ángulo comienza a variar, se considerará que existe la ruptura. Esta corrección se realiza para evitar considerar el tiempo que le toma al esqueleto de la horquilla ajustarse a la fuerza que esta siendo sometido. Estos ajustes son de estiramientos de enlaces, rotaciones de ángulos y rotación de diedros. Las correcciones descritas se encuentran incluidas en los valores de los tiempos presentados en la Tabla 4.1.

4.3. ANÁLISIS DE ENERGÍAS

Como se mencionó anteriormente, las barreras energéticas pueden considerarse como el resultado de la contribución de varias componentes. Para hallar las energías involucradas en la horquilla AACCC4 se realizaron varios cálculos para extraer la energía asociada a los puentes de hidrógeno y apilamiento de bases. Con la ayuda de esta información se espera caracterizar el resto de interacciones que involucran al esqueleto de la molécula, como es la interacción hidrofóbica – hidrofílica, la interacción entre el esqueleto y las bases, las cargas negativas en el esqueleto, entre otros. Como esta información no puede ser obtenida directamente, se calculará usando la diferencia de la energía total de cada par menos las otras dos ya mencionadas.

Tabla 4.1: Tiempos promedio de ruptura corregidos para cada una de las fuerzas. Los tiempos están en ps.

Fuerzas (pN)		Par 1	Par 2	Par 3	Par 4	Par 5
100	$\bar{\tau}$	314.372	398.018	389.205	638.406	428.204
	σ	341.056	379.347	246.909	555.808	320.865
150	$\bar{\tau}$	102.136	147.832	278.990	329.238	183.468
	σ	78.484	82.798	182.011	307.059	212.643
200	$\bar{\tau}$	48.198	115.503	82.864	171.053	82.788
	σ	32.851	70.321	33.767	61.088	54.976
250	$\bar{\tau}$	22.635	59.323	57.336	84.746	70.327
	σ	19.374	17.929	20.005	65.495	43.482
300	$\bar{\tau}$	11.453	38.194	39.616	67.800	49.169
	σ	5.071	17.451	15.575	34.121	21.565
350	$\bar{\tau}$	7.331	29.682	33.890	39.995	31.499
	σ	4.466	12.658	18.019	16.632	16.519
400	$\bar{\tau}$	5.099	20.541	22.189	33.429	28.776
	σ	2.594	2.366	9.048	2.752	9.154
450	$\bar{\tau}$	5.645	22.804	19.380	28.259	26.128
	σ	1.229	7.699	4.474	7.717	12.727
500	$\bar{\tau}$	4.266	13.274	19.623	22.370	16.064
	σ	0.745	8.116	7.099	4.423	3.963

4.3.1. ENERGÍAS DE DISOCIACIÓN DE LA HORQUILLA

Para calcular las energías de disociación primero se obtuvo la energía de la horquilla para cada fuerza de las simulaciones realizadas mediante el programa VMD 1.9.1 con la opción "NAMD Energy". A estas energías se las agruparon usando los tiempos de ruptura calculados, es decir en un grupo E_1 tenemos las energías desde la estructura inicial hasta la primera ruptura, un grupo E_2 desde la primera ruptura hasta la segunda, así sucesivamente hasta obtener seis grupos de energía. A cada grupo se le realizó un promedio para cada par de bases de todos los ensayos de fuerza. Luego para el cálculo de la energía de disociación se resta la energía media del grupo \bar{E}_2 de la energía media del grupo \bar{E}_1 y de esta forma se procede para el resto de grupos. Estos resultados se pueden ver en la Tabla 4.2.

Como se puede apreciar, no existe una correlación entre la fuerza y la energía de disociación. Esto permite obtener un promedio global para todas las energías sin considerar la fuerza obteniendo lo que se muestra en la Tabla 4.3.

Tabla 4.2: Energía media de disociación ($kcal/mol$) necesaria para de ruptura de cada una de las fuerzas (\overline{E}), con su respectiva desviación estándar (σ).

Fuerzas (pN)		Par 1	Par 2	Par 3	Par 4	Par 5
100	\overline{E}	-21.06	-32.66	-28.08	-15.23	-25.12
	σ	1.05	1.02	0.95	0.95	1.25
150	\overline{E}	-23.16	-57.41	-23.82	-13.38	-22.26
	σ	1.45	1.17	1.18	1.29	1.80
200	\overline{E}	-10.29	-46.50	-25.83	-5.30	-35.94
	σ	1.48	1.38	1.23	1.40	1.89
250	\overline{E}	-14.24	-38.23	-22.36	-14.97	-17.36
	σ	2.27	1.62	1.46	1.42	2.12
300	\overline{E}	-20.37	-34.52	-17.94	-4.30	-35.53
	σ	2.75	2.22	1.92	1.69	2.31
350	\overline{E}	-5.36	-14.51	-19.99	-29.99	-32.52
	σ	3.50	1.77	1.45	1.71	1.89
400	\overline{E}	-5.30	-32.98	-26.12	-28.10	-24.26
	σ	3.78	2.46	2.05	1.52	2.03
450	\overline{E}	-25.11	-22.03	-17.69	-19.20	-17.55
	σ	3.22	2.32	1.91	1.55	2.19
500	\overline{E}	-14.93	-15.76	-27.00	-22.28	-37.20
	σ	6.00	2.83	2.35	2.45	2.68

Tabla 4.3: Energía media de disociación (\overline{E} en $kcal/mol$) para cada par de bases con su desviación estándar (σ).

	Par 1	Par 2	Par 3	Par 4	Par 5
\overline{E}	-18.640	-38.312	-25.617	-12.125	-26.407
σ	0.714	0.598	0.559	0.548	0.686

4.3.2. COMPONENTES DE ENERGÍA EN LOS PARES DE BASES

Para el estudio de la energía asociada a los puentes de hidrógeno se utilizó un procedimiento similar al cálculo de las energías de disociación de la horquilla, a diferencia que para la opción “NAMD Energy” del programa VMD se utilizó como selección cada uno de los pares de base. De esta forma se obtienen grupos de energías antes y después de la ruptura para cada par de bases, luego a cada grupo se promedia y la diferencia entre éstos dará como resultado la energía de los enlaces de los puentes de hidrógeno. En la Tabla 4.4 se tiene un resumen de las energías de los puentes de hidrógeno que se hallaron.

Se observa que las energías de enlace entre A – T se encuentran en el orden

de las energías de interacción tabulados en la Tabla 2.1. Aunque para la fuerza de 500 pN y primer par existe una menor energía de enlace. Esto se debe a la fuerza tan alta a la cual se encuentra sometida, resultando en una separación de bases casi inmediata, lo que no dio suficientes datos para una mejor aproximación.

Tabla 4.4: Energía media de los puentes de hidrógeno (\overline{E}_H en *kcal/mol*) correspondientes a cada par y fuerza, con su respectiva desviación estándar (σ).

Fuerzas (pN)		Par 1	Par 2	Par 3	Par 4	Par 5
100	\overline{E}_H	-13.623	-16.742	-13.393	-9.859	-4.927
	σ	0.109	0.173	0.231	0.205	0.380
150	\overline{E}_H	-12.173	-17.984	-13.749	-12.975	-11.626
	σ	0.248	0.216	0.250	0.239	0.303
200	\overline{E}_H	-12.169	-19.516	-11.471	-15.359	-13.080
	σ	0.227	0.271	0.437	0.327	0.437
250	\overline{E}_H	-11.612	-19.587	-13.101	-16.689	-11.444
	σ	0.274	0.373	0.506	0.363	0.513
300	\overline{E}_H	-11.544	-17.926	-15.645	-15.448	-16.959
	σ	0.308	0.377	0.689	0.483	0.718
350	\overline{E}_H	-7.908	-18.345	-18.361	-16.558	-15.756
	σ	0.608	0.391	0.576	0.453	0.693
400	\overline{E}_H	-5.887	-16.495	-21.206	-22.435	-16.320
	σ	0.821	0.388	0.637	0.506	0.700
450	\overline{E}_H	-11.509	-16.455	-19.620	-17.787	-11.570
	σ	0.582	0.616	0.682	0.609	0.617
500	\overline{E}_H	-0.576	-14.323	-19.524	-22.413	-19.983
	σ	0.073	0.451	0.569	0.697	0.838

Para la energía de apilamiento, se calculó separando dos pares de bases vecinas, es decir el par 1 con el 2, el 2 con el 3 y así sucesivamente. Luego se procedió a calcular la energía de todo este subsistema en tres etapas. Primero se separa las energías de estos subsistemas de acuerdo a los tiempos encontrados. Luego se resta la energía antes y después de la ruptura de uno de estos pares y por último se le resta las energías de los puentes de hidrógeno de los pares involucrados.

En la Tabla 4.5 se indican las energías de apilamiento entre dos pares vecinos. Aquí se muestran ciertas energías positivas, indicando que estas interacciones no estarían favoreciendo el enlace, sin embargo estas son energías a altas fuerzas, entre 400 y 500, por lo que el rompimiento fue muy violento dando poca información para realizar estos cálculos con una mejor precisión.

Si comparamos los resultados de esta tabla con los datos de la tabla 2.2 se

observa que están en el mismo orden de magnitud. Además existe una gran concordancia entre los valores encontrados y los reportados por Šponer *et al.* [60] en las energías de apilamiento en bases sumergidas en agua.

Tabla 4.5: Energía media de apilamiento entre dos pares de bases (\bar{E}_a en *kcal/mol*), con su respectiva desviación estándar (σ).

Fuerzas (pN)		Par 1·2	Par 2·3	Par 3·4	Par 4·5	Par 5·6
100	\bar{E}_a	-4.461	-6.312	-11.846	-7.690	-13.235
	σ	0.248	0.332	0.351	0.409	0.673
150	\bar{E}_a	-3.101	-6.830	-8.957	-7.173	-8.197
	σ	0.474	0.393	0.390	0.413	0.687
200	\bar{E}_a	-2.234	-7.559	-7.553	-4.447	-11.693
	σ	0.548	0.570	0.685	0.599	0.971
250	\bar{E}_a	-1.407	-7.386	-3.816	-4.543	-8.845
	σ	0.657	0.711	0.789	0.675	1.294
300	\bar{E}_a	-2.719	-4.788	-5.509	-0.269	-10.009
	σ	0.617	0.863	1.062	0.920	1.269
350	\bar{E}_a	-6.819	-2.903	-5.371	-2.523	-5.134
	σ	1.021	0.774	0.830	0.828	1.058
400	\bar{E}_a	-1.815	-0.513	+1.221	-0.720	-3.767
	σ	1.183	0.845	1.011	0.894	1.180
450	\bar{E}_a	-0.824	-1.857	-1.858	-4.577	+1.848
	σ	1.563	1.118	1.040	0.981	1.001
500	\bar{E}_a	-3.393	-0.859	+1.109	+4.079	-0.427
	σ	2.861	0.874	0.968	1.221	1.352

4.3.3. ENERGÍA DEL ESQUELETO DE LA HORQUILLA

Para encontrar el aporte energético del esqueleto de la horquilla se restan los valores de la interacción de los puentes de hidrógeno (Tabla 4.4), apilamiento de bases (Tabla 4.5) de la energía total de interacción de los pares de base (Tablas 4.2). Estos resultados se detallan en la Tabla 4.6.

Como se puede ver, en este caso se tienen energías tanto negativas como positivas. Las negativas indican que el esqueleto ayuda a la estabilidad de las bases, sin embargo las energías positivas estarían en contra de la formación de la estructura. Esto se puede deber a deformaciones en la horquilla al momento de la separación forzada. Ciertas bases o el esqueleto, pudieron haber adquirido una posición que no favorecía a la energía de enlace. Por ejemplo, se observó en ciertas simulaciones que el lazo de la horquilla provoca una gran deformación en la bases del sexto

par (C-G) y a veces alcanzaba hasta el quinto par (A-T) causando una separación más rápida que el promedio.

Tabla 4.6: Energía media del aporte de energía del esqueleto de la horquilla a la ruptura de las bases (\overline{E}_e en *kcal/mol*), con su respectiva desviación estándar (σ).

Fuerzas (pN)		Par 1..2	Par 2..3	Par 3..4	Par 4..5	Par 5..6
100	\overline{E}_e	2.977	9.607	2.845	-2.318	6.962
	σ	1.080	1.088	1.038	1.059	1.466
150	\overline{E}_e	7.887	32.593	1.117	-6.765	2.440
	σ	1.541	1.250	1.272	1.379	1.950
200	\overline{E}_e	-4.108	19.421	6.810	-14.509	11.167
	σ	1.593	1.513	1.472	1.559	2.167
250	\overline{E}_e	1.219	11.253	5.439	-6.258	-2.926
	σ	2.383	1.806	1.738	1.614	2.535
300	\overline{E}_e	6.106	11.803	-3.215	-11.414	8.560
	σ	2.840	2.408	2.300	1.982	2.728
350	\overline{E}_e	-9.371	-6.737	-3.738	10.909	11.629
	σ	3.692	1.967	1.767	1.952	2.275
400	\overline{E}_e	-2.406	15.968	6.130	4.947	4.172
	σ	4.044	2.630	2.369	1.833	2.450
450	\overline{E}_e	12.777	3.717	-3.788	-3.169	7.825
	σ	3.631	2.652	2.282	1.934	2.487
500	\overline{E}_e	10.960	0.579	8.580	3.942	16.787
	σ	6.644	2.993	2.606	2.824	3.115

4.4. ANÁLISIS DE REGRESIÓN DEL TIEMPO DE RUPTURA VS. LA FUERZA

4.4.1. REGRESIÓN LINEAL

Como se indicó previamente, la teoría de Kramers y Bell predicen un comportamiento lineal entre el logaritmo del tiempo de ruptura versus la fuerza aplicada. Es por ello que en la sección 3.10 se llega a la ecuación:

$$\ln \tau = \ln \alpha + \beta f \quad (4.4)$$

Donde $\ln \alpha = \ln \tau_0 + E_b/k_B T$, $\beta = -\frac{x_\beta}{k_B T}$, E_b es la barrera energética que deben vencer las bases para separarse, τ_0 es el tiempo que le toma al sistema atravesar la barrera energética en ausencia de la fuerza.

La regresión lineal fue calculada para cada par usando los datos de la Tabla 4.1, pero no se consideraron los valores de tiempos medios para las fuerzas de 100 y 150 pN por tener una desviación estándar muy grande. Se obtuvieron los valores de las constantes $\ln \alpha$ y β (Tabla 4.7), así como los valores de la prueba χ^2 y el coeficiente de correlación R^2 para verificar la linealidad de las curvas.

Tabla 4.7: Valor de las constantes obtenidas del ajuste lineal de mínimos cuadrados, junto a su respectiva Desviación Estándar (σ) y el valor de χ^2 y R^2 para la función ajustada.

	α		β		χ^2	R^2
	Valor	σ	Valor	σ		
Par 1	5.035	0.455	-0.00776	0.00125	0.01290	0.8850
Par 2	5.770	0.293	-0.00644	0.00081	0.00253	0.9276
Par 3	5.297	0.199	-0.00505	0.00055	0.00118	0.9446
Par 4	6.172	0.254	-0.00643	0.00070	0.00154	0.9443
Par 5	5.489	0.164	-0.00531	0.00045	0.00075	0.9652

Se puede observar en la figura 4.9 que los datos no se ajustan a una línea (línea verde), esto se aprecia mejor con los valores de R^2 quienes se encuentran alrededor de 0.93 y los de χ^2 alrededor de 3.8×10^{-3} . Es por eso que se procede a realizar una regresión cuadrática.

4.4.2. REGRESIÓN CUADRÁTICA

La regresión cuadrática se la define de la forma:

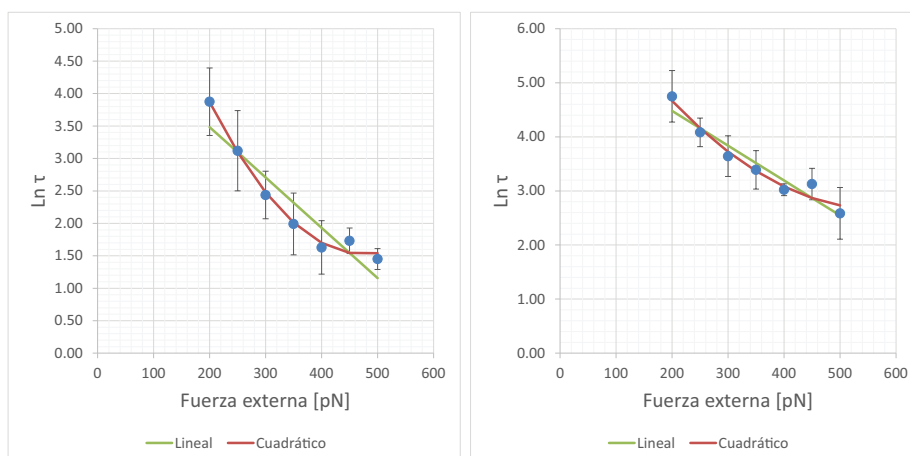
$$\ln \tau = \ln \alpha + \beta f + \gamma f^2 \tag{4.5}$$

Donde los parámetros $\ln \alpha$, β y γ se los halla en la regresión y se los presenta en la Tabla 4.8. Aquí aumentó el coeficiente de correlación R^2 a 0.98 así como disminuyó el valor de χ^2 hasta 7.7×10^{-4} lo que indica que hay un mejor ajuste.

Tabla 4.8: Valor de las constantes obtenidas en la regresión cuadrática, junto a su respectiva desviación estándar (σ) y el valor de χ^2 y R^2 para la función ajustada.

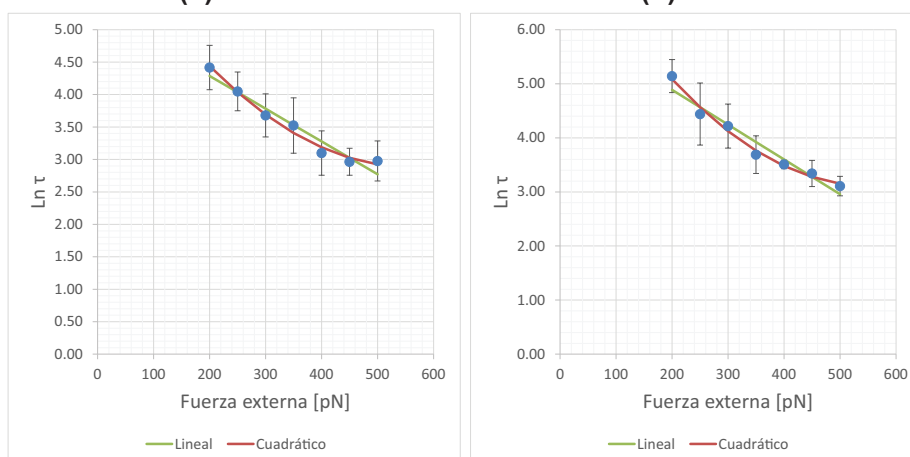
	$\ln \alpha$		β		γ		χ^2	R^2
	Valor	σ	Valor	σ	Valor	σ		
Par 1	8.495	5.74×10^{-1}	-0.0293	3.47×10^{-3}	3.076×10^{-5}	4.91×10^{-6}	0.00120	0.9893
Par 2	7.440	8.50×10^{-1}	-0.0168	5.13×10^{-3}	1.485×10^{-5}	7.28×10^{-6}	0.00124	0.9645
Par 3	6.659	4.26×10^{-1}	-0.0135	2.57×10^{-3}	1.210×10^{-5}	3.65×10^{-6}	0.00031	0.9852
Par 4	7.948	5.10×10^{-1}	-0.0175	3.08×10^{-3}	1.579×10^{-5}	4.36×10^{-6}	0.00036	0.9870
Par 5	5.704	6.71×10^{-1}	-0.0066	4.05×10^{-3}	1.905×10^{-6}	5.74×10^{-5}	0.00073	0.9661

Los coeficientes correspondientes a la regresión que se hallaron, se encuentran muy cercanos entre sí, lo que lleva a pensar que tal vez sean iguales. Lo mismo se



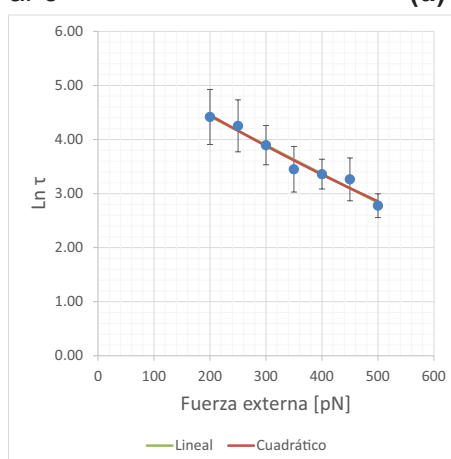
(a) Par 1

(b) Par 2



(c) Par 3

(d) Par 4



(e) Par 5

Figura 4.9: Gráficos de los puntos obtenidos en las simulaciones (●), regresión lineal (Línea verde) y cuadrática (Línea roja) para cada par de bases.

aprecia en la Figura 4.10 donde se muestran estos coeficientes con sus respectivas desviaciones estándar. Por ejemplo para el coeficiente β se observa que los pares del 2 al 5 tienen valores muy cercanos y sus desviaciones se sobreponen. Por ello se realizaron pruebas de hipótesis con un nivel de significación de 0.05, de la siguiente manera:

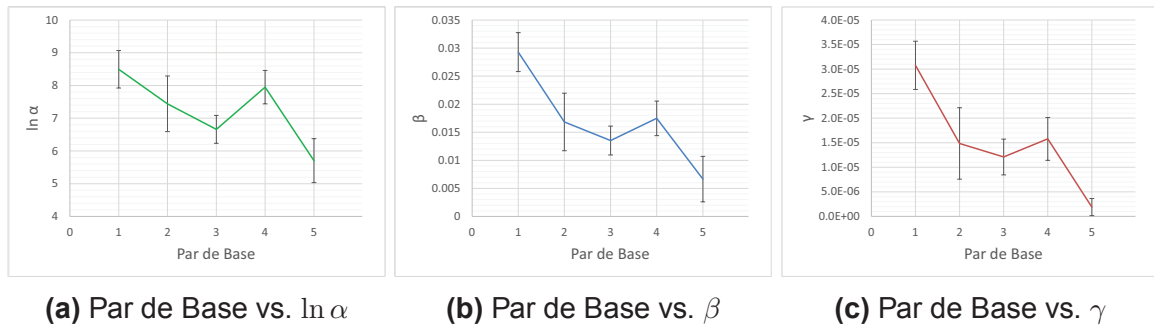


Figura 4.10: Gráficos para cada par de bases con respecto a $\ln \alpha$, β y γ con su respectiva desviación estándar.

$$H_0 : \mu_1 = \mu_2 \tag{4.6}$$

$$H_1 : \mu_1 \neq \mu_2 \tag{4.7}$$

Entonces, se rechaza la hipótesis nula si el estadístico t de dos colas y 8 grados de libertad se encuentra entre: $t_{0.025,8} < -2.306$ ó $t_{0.025,8} > 2.306$. Los valores de los estadísticos para cada combinación de par es el que se muestra en las tablas 4.9, 4.10 y 4.11.

Tabla 4.9: Pruebas de Hipótesis al 5 % de significancia de los coeficientes $\ln \alpha$. Si el valor se encuentra dentro del rango $[-2.306, 2.306]$ H_0 se acepta (Letra en negrilla).

Par	1	2	3	4	5
1		2.299	5.744	1.592	7.068
2	2.299		1.838	-1.146	3.585
3	5.744	1.838		-4.341	2.687
4	1.592	-1.146	-4.341		5.957
5	7.068	3.585	2.687	5.957	

Esto resulta en que los pares de bases 1-2, 1-4, 2-3, 2-4 del $\ln \alpha$ son estadísticamente semejantes con un 5 % de significancia. Así mismo ocurre para las combinaciones 2-3, 2-4, 3-4 de las constantes β y γ .

Tabla 4.10: Pruebas de Hipótesis al 5 % de significancia de los coeficientes β . Si el valor se encuentra dentro del rango [-2.306,2.306] H_0 se acepta (Letra en negrilla).

Par	1	2	3	4	5
1		4.495	8.170	5.695	9.498
2	4.495		1.292	-0.241	3.486
3	8.170	1.292		-2.210	3.204
4	5.695	-0.241	-2.210		4.764
5	9.498	3.486	3.204	4.764	

Tabla 4.11: Pruebas de Hipótesis al 5 % de significancia de los coeficientes γ . Si el valor se encuentra dentro del rango [-2.306,2.306] H_0 se acepta (Letra en negrilla).

Par	1	2	3	4	5
1		4.052	6.819	5.095	12.375
2	4.052		0.755	-0.248	3.867
3	6.819	0.755		-1.450	5.639
4	5.095	-0.248	-1.450		6.606
5	12.375	3.867	5.639	6.606	

4.5. PARÁMETRO τ_0

Para encontrar el parámetro τ_0 , el cual da información del tiempo que le toma a los pares de base cruzar la barrera energética para poder separarse, se tiene:

$$\ln \alpha = \ln \tau_0 + E_{b_i}/k_B T \quad (4.8)$$

De esta ecuación se conocen todos los parámetros para hallar τ_0 . El $\ln \alpha$ se calculó en la regresión cuadrática (Tabla 4.8), E_{0_i} es la altura de las barreras energéticas es decir las energías de disociación para cada fuerza (Tabla 4.3), k_B es la constante de Boltzmann y T es 300 K. De aquí se despeja el valor de τ_0 de la Ecuación 4.8, obteniendo los resultados detallados en la Tabla 4.12.

Tabla 4.12: Coeficiente τ_0 (ps) encontrado a partir de los datos obtenidos en las simulaciones.

Ruptura	Par 1	Par 2	Par 3	Par 4	Par 5
E_b^*	18.640	38.312	25.617	12.124	26.407
$E_b/k_B T$	31.267	64.265	42.970	20.338	44.296
$\ln(\alpha)$	8.495	7.440	6.659	7.948	5.704
$\ln(\tau_0)$	-22.772	-56.825	-36.311	-12.390	-38.592
τ_0 en (s)	1.290×10^{-22}	2.095×10^{-37}	1.699×10^{-28}	4.160×10^{-18}	1.737×10^{-29}

*Energía de la ruptura, Tabla 4.3

Como se puede ver existe un rango muy amplio entre los diferentes τ_0 , los cuales tienen un rango entre $[2.1 \times 10^{-37}, 4.2 \times 10^{-18}]$. Sin embargo estos valores son muy pequeños si los comparamos con frecuencia de intento de escape para los sólidos ($\tau_0 \sim 10^{-13}$) [48] o con la frecuencia de intento de escape asociada a la ruptura de ligandos–receptores con una barrera de $8.53 \text{ kcal mol}^{-1}$ ($\tau_0 = 10^{-8}$) [48].

Además hay que recalcar que todas estas rupturas, según lo que se encontró en la sección 4.4.2, se tratan de rupturas estadísticamente iguales por lo que deberían dar resultados parecidos. Pero existe gran variación entre estas, lo que indica que la función es muy sensible a cualquier diferencia en la energía de las barreras energéticas. Por esto si se desea mejorar los valores de τ_0 es necesario mejorar la energía involucrada en la ruptura y esto se lograría realizando más ensayos de fuerzas.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN

El proceso de desplegamiento de la horquilla AACC4 ha sido estudiado utilizando fuerzas externas con el fin de caracterizar las barreras energéticas asociadas a cada par de bases. El tiempo de ruptura promedio de los pares de bases A–T va desde 638.4 ps hasta 4.2 ns para las diferentes fuerzas.

Para cada par se examinaron las componentes de energía involucradas en la ruptura y se obtuvo la energía de interacción de los puentes de hidrógeno para cada par. Para fuerzas entre 100 y 250 pN se tiene una energía de 12.596 ± 1.152 Kcal/mol, por lo que se puede decir que comparando con los datos encontrados en la literatura [51–57] se obtiene un error menor al 10 %. El resto de casos, este error aumenta debido a la rapidez de la separación de las bases. También se obtuvo valores para la energía de apilamiento de las bases 4.578 ± 8.657 Kcal/mol, las cuales se encuentran en el mismo orden que la literatura [60], aunque el error relativo es mayor al 20 %. Una de las causas para este error es que se utilizaron los valores de energía de los puentes de hidrógeno que se hallaron previamente. Así mismo se calculó la energía de interacción para separar cada par de bases es decir la barrera energética que cada base debe vencer para poder separarse. Éstas estuvieron entre 12.125 y 38.312 Kcal/mol donde el valor más alto se encuentra en el segundo par. También se obtuvo la energía que aporta la estructura a la estabilidad del sistema. Sin embargo no es una cantidad que se pueda obtener directamente, sino se calculó usando la energía total de interacción menos las energías de los puentes de hidrógeno y apilamiento de bases. Esta energía contiene todas las interacciones que ocurren dentro de la horquilla como es el efecto hidrofóbico – hidrofílico, cargas negativas del esqueleto y estiramiento del esqueleto. Como resultado se encontró una energía de 9.042 ± 23.551 Kcal/mol es decir para ciertos pares, el esqueleto va a ayudar a la formación de la estructura, mientras que en otras ocasiones estará en contra. Las causas para este comportamiento pueden ser la deformación de la cadena al ser estirada y la inestabilidad generada por el lazo de la horquilla

especialmente en los pares 5 y 6.

Para analizar el proceso de disociación se utilizó inicialmente la teoría de Kramers y Bell, la cual predice un comportamiento lineal entre el logaritmo natural del tiempo medio de ruptura y la fuerza aplicada al sistema. No obstante, los datos exhiben un comportamiento lineal únicamente para el par 5, de ahí el resto de valores posee con un R^2 entre [0.885,0.944]. Por ello se realiza una regresión cuadrática, encontrando que los valores de R^2 suben hasta [0.965,0.989] lo que indica que la función se ajusta mejor. De igual forma los valores de χ^2 bajan en promedio desde 3.8×10^{-3} hasta 7.7×10^{-4} los cuales indican que ésta una mejor aproximación.

El comportamiento cuadrático puede interpretarse de dos maneras. La primera es considerando que la teoría de Kramers y Bell es una aproximación de una función general de la fuerza. Mientras esta teoría presenta una mejor descripción cuando se tienen fuerzas pequeñas del orden de decenas de piconewtons, falla más allá de este límite. Es decir lo que encontramos son los términos de una aproximación por series de Taylor alrededor del cero de esta función general. Una segunda interpretación es considerar que el entorno de la horquilla consta de múltiples barreras de energía y cada una de estas posee un comportamiento lineal con la fuerza. Aplicando el método de los cumulantes [73] a esta representación, se puede obtener el valor medio de las barreras energéticas y su distribución y de esta manera predecir el comportamiento de este conjunto de barreras. Sin embargo, como se tienen cálculos únicamente para nueve fuerzas, no es posible seguir con éste análisis ya que el número de incógnitas sería mayor que los datos que se posee. Es por eso que para encontrar la forma de estas barreras es necesario un mayor número de fuerzas y mejor aún utilizar fuerzas menores a 200 pN con desviaciones estándar pequeñas, lo que se lograría con mas ensayos de las fuerzas.

Los valores de $\ln \alpha$, β y γ hallados en la regresión cuadrática son diferentes, pero si se considera sus desviaciones estándar, algunos de estos se superponen. De esta manera se encontró que los pares 1-2, 1-4, 2-3 y 2-4 son estadísticamente iguales con el 5 % de significancia. Es decir los pares 1, 2 y 4 son semejantes, lo que implica que tienen una barrera energética similar. Para el caso de los parámetros β y γ , se halló que los pares 2, 3 y 4 son iguales. Esto se debe a que estos nucleótidos se encuentran en el interior de la horquilla, por ende las interacciones que poseen son similares entre ellas. De igual forma se observó que los pares 1 y 5 son muy diferentes del resto ya que se encuentran uno en el extremo de la horquilla y el otro cerca del lazo.

En términos de la primera interpretación se analizó el parámetro τ_0 el cual brinda información acerca del tiempo que le toma a la cadena en realizar un intento de escape. Se encontró que todos los pares poseen un tiempo de intento de escape

extremadamente pequeño en un rango que va desde 2.10×10^{-37} s hasta los 4.16×10^{-18} s. Pero estos valores están por debajo de los τ_0 calculados para sólidos ($\tau_0 \sim 10^{-13}$ s) [48] y de ligandos–receptores ($\tau_0 = 10^{-8}$ s) [48] lo que indica que existe dificultad para encontrar este parámetro. El problema principal con el cálculo de éste es que depende mucho del valor de energía de enlace que se halló previamente, ya que variaciones leves de energía se transforman en tiempos muy distintos. Por ello, estos cálculos mejorarían si se realizaran más ensayos de las fuerzas ya que esto ayudaría a tener una mejor estimación de las energías de interacción teniendo una mejor estimación para τ_0 .

En resumen, se encontró que para el rango de fuerzas utilizado en este estudio la teoría de Kramers – Bell no se cumple, ya que el logaritmo del tiempo de ruptura y la fuerza no son lineales sino sigue una forma cuadrática. Esto se puede explicar de dos formas, que existe una función general de la fuerza y la teoría de K–B es un caso particular o si bien se cumple pero como una superposición de barreras energéticas. Sin embargo, para explorar la segunda posibilidad se necesitarán realizar más simulaciones, por ello el análisis se lo realizó con la primera opción. De esta manera se halló valores para las barreras energéticas E_0 y la constante τ_0 los cuales dan información acerca de la disociación a fuerza cero. Pero se obtiene una gran dispersión de valores de τ_0 a pesar que se trata de bases estadísticamente iguales. Lo que muestra que para una mejor aproximación se necesitan más ensayos de las fuerzas o minorar la fuerza aplicada.

ANEXOS

ANEXO A

PINZAS ÓPTICAS

En las últimas décadas el estudio de moléculas individuales a tenido grandes avances debido al rápido desarrollo de instrumentos que permiten manipularlas de una manera muy precisa [36, 74–78]. Estos aparatos permiten medir fuerzas intermoleculares e incluso intervenir en las reacciones de las macromoléculas [7, 24]. Entre estos instrumentos tenemos a las pinzas ópticas, las cuales poseen varias aplicaciones como limitar o restringir el movimiento de objetos microscópicos, así como organizarlos, ensamblarlos o modificarlos [79]. Esto es porque el instrumento permite controlar partículas de dimensiones muy pequeñas – alrededor de $1\ \mu\text{m}$ – a las cuales se las puede someter de forma muy precisa a fuerzas de tensión en un rango que va de 0.2 a 200 pN [29].

Por ello, las pinzas ópticas tienen una gran variedad de aplicaciones, por ejemplo son capaces de ejercer fuerzas remotas en células vivas o partes internas de las células o a biomoléculas sin infringir un daño estructural detectable [80]. Así mismo permiten estudiar las propiedades mecánicas de partes del citoplasma de las células, así como los flagelos de bacterias, membranas de células nerviosas, la actina del citoesqueleto de las células rojas y cadenas ADN [37, 77, 80].

A.1. PRINCIPIO BÁSICO DE LAS PINZAS ÓPTICAS

Las pinzas ópticas basan su funcionamiento en la trampa óptica. Esta utiliza presión de radiación, generada por luz coherente de un láser, para mantener una partícula esférica transparente cerca del punto focal. La presión de radiación se origina debido a la refracción que produce la luz al momento de atravesar la superficie transparente de una partícula [35].

Para ilustrar esto, se puede imaginar una esfera con un alto índice de refracción que se encuentra irradiada por un láser de haz gaussiano (haz muy intenso en su centro y con un punto focal muy pequeño). Además la esfera se encuentra fuera

del punto focal del láser como se muestra en la figura A.1a. Para hallar la fuerza a la cual se encuentra sometida, se considera dos rayos de luz “a” y “b” que inciden simétricamente en la esfera generando las fuerzas F_a y F_b en dirección del cambio de momento. Debido a la refracción a través de la partícula, los haces se invierten empujando la esfera hacia el centro del haz. A estas fuerzas se las puede definir usando dos ejes, uno en dirección del láser que se denomina F_{scat} y la otra en dirección del gradiente de luz F_{grad} .

Considerando por ahora solo el eje del gradiente se observa que mientras exista una diferencia entre los haces “a” y “b” la partícula siempre tendrá una fuerza en dirección del máximo gradiente, lo cual provocará el movimiento de la esfera hacia el centro del haz.

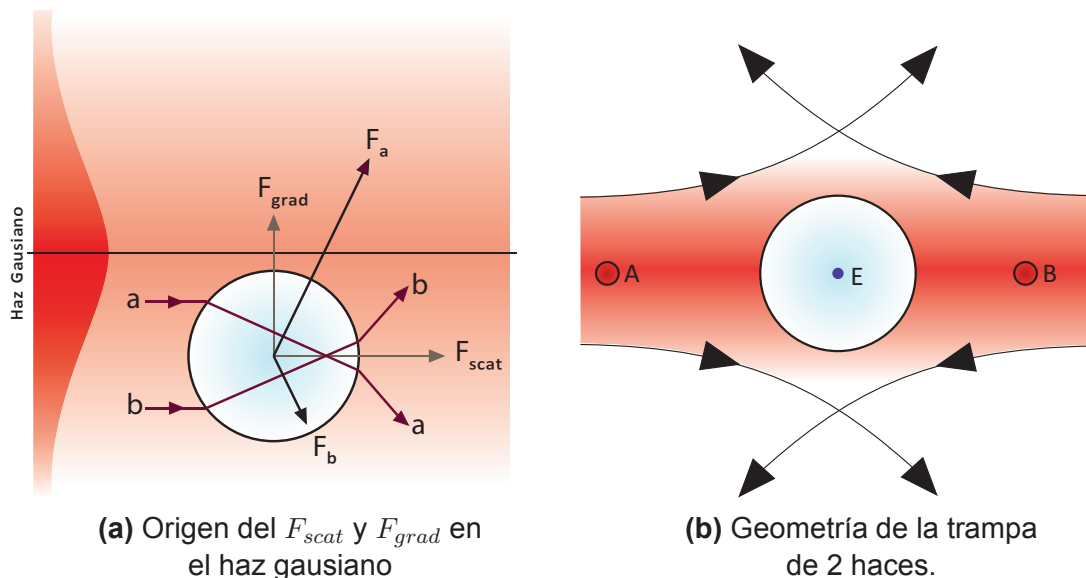


Figura A.1: Esquema de la trampa óptica. Adaptado de [80, pág. 2]

Con este proceso se logra que la partícula se mantenga en su centro, pero todavía existe la componente de la fuerza F_{scat} . Para eliminar esta esta componente se usan dos láseres tal como se puede ver en la Figura A.1b. Esto ayudará a que mientras el haz “A” empuja la esfera fuera de la posición de equilibrio “E” el láser “B” volverá a ubicarla en la posición de equilibrio. Dando como resultado que la esfera siempre se encuentre en la posición “E”.

En ambito experimental, estas partículas esfericas transparentes son dieléctricos tal como cuentas de poliestireno de tamaños micrométricos. Estas se unen a las moléculas de interés mediante reacciones bioquímicas permitiendo su manipulación. Estas pinzas ópticas pueden utilizarse con una sola trampa de luz o ayudándose de una micropipeta o incluso con la ayuda de una segunda trampa óptica [81].

ANEXO B

“Script” de Traslación de una Molécula

Este script permite trasladar la molécula en alguna dirección, además escribe las nuevas coordenadas en formato pdb. Para utilizarlo se modifica las expresiones ox, oy, oz por las cantidades en picómetros en las que se requiera mover al sistema.

```
# Procedure for generating a string of a given
# length from a number
proc formatnumber {number length} {
  set x [expr round(1000*$number)/1000.0]
  set n [expr $length -[string length $x]]
  for {set i 0} {$i < $n} {incr i} {set x '$x'}
  return $x
}

# Generating a line with new coordinates
proc newcoor {x y z line file} {
  set x [formatnumber $x 8]
  set y [formatnumber $y 8]
  set z [formatnumber $z 8]
  set s1 [string range $line 0 29]
  set s2 [string range $line 54 80]
  set newline $s1$x$y$z$s2
  puts $file $newline
}

# Main Program
set file [lindex $argv 0]
set infile [open hairpini.pdb r]
set outfile [open hairpinii.pdb w]
puts $outfile "REMARK pdb file for extracted from $file"
set text {}
while {$text != 'HETATM'} {
  set pos [tell $infile]
  gets $infile line
  set text [string range $line 0 5]
```

```
}
seek $infile $pos start
gets $infile line
set res [expr [string range $line 22 25]]
while {[string last "HETATM" $line] != -1} {
  if {[string last "U_" $line] != -1} then {
    set ox [string range $line 30 37]
    set oy [string range $line 38 45]
    set oz [string range $line 46 53]
  }
  gets $infile line
}

set ox [expr 0.752]
set oy [expr 0.360]
set oz [expr 0.509]

seek $infile $pos start
gets $infile line
set count 1
set res [expr [string range $line 22 25]]
while {[string last "HETATM" $line] != -1 && $count < 600} {
  set x [expr [string range $line 30 37] - $ox]
  set y [expr [string range $line 38 45] - $oy]
  set z [expr [string range $line 46 53] - $oz]
  newcoor $x $y $z $line $outfile
  set count [expr $count +1]
  gets $infile line
}
puts $outfile "END"
close $outfile
```

ANEXO C

“Script” de Rotación de una Molécula

Este script permite rotar la molécula alrededor del eje Z, además escribe las nuevas coordenadas en formato pdb. Para utilizarlo se modifica la expresión de *theta* por el ángulo deseado en el que se desea rotar. Para rotar en otra dirección lo que se hace es cambiar las expresiones de X, Y, Z por las fórmulas de rotación adecuada.

```
proc formatnumber {number length} {
  set x [expr round(1000*$number)/1000.0]
  set n [expr $length -[string length $x]]
  for {set i 0} {$i < $n} {incr i} {set x '$x'}
  return $x
}

# Generating a line with new coordinates
proc newcoor {x y z line file} {
  set x [formatnumber $x 8]
  set y [formatnumber $y 8]
  set z [formatnumber $z 8]
  set s1 [string range $line 0 29]
  set s2 [string range $line 54 80]
  set newline $s1$x$y$z$s2
  puts $file $newline
}

# Main Program
set file [lindex $argv 0]
set infile [open hairpinii.pdb r]
set outfile [open hairpiniii.pdb w]
puts $outfile 'REMARK pdb file for extracted from $file'
set text {}
while {$text != "HETATM"} {
  set pos [tell $infile]
  gets $infile line
  set text [string range $line 0 5]
}
}
```



```

seek $infile $pos start
gets $infile line
set res [expr [string range $line 22 25]]
set theta [expr -0.03395286]
seek $infile $pos start
gets $infile line
set count 1
set res [expr [string range $line 22 25]]
while {[string last "HETATM" $line] != -1 && $count < 600} {
  set x [expr [string range $line 30 37]*
    sin($theta)+[string range $line 38 45]*cos($theta)]
  set y [expr [string range $line 30 37]*
    sin($theta)+[string range $line 38 45]*cos($theta)]
  set z [expr [string range $line 46 53]]
  newcoor $x $y $z $line $outfile
  set count [expr $count +1]
  gets $infile line
}
puts $outfile "END"
close $outfile

```

Para rotación en el eje X:

```

set x [expr [string range $line 30 37]*
  cos($phi)+[string range $line 46 53]*sin($phi)]
set y [expr [string range $line 30 37]*
  sin($theta)+[string range $line 38 45]*cos($theta)]
set z [expr -[string range $line 30 37]*
  sin($phi)+[string range $line 46 53]*cos($phi)]

```

En el eje Y:

```

set x [expr [string range $line 30 37]*
  cos($phi)+[string range $line 46 53]*sin($phi)]
set y [expr [string range $line 38 45]]
set z [expr -[string range $line 30 37]*
  sin($phi)+[string range $line 46 53]*cos($phi)]

```

ANEXO D

“Script” para Generar la Caja de Agua

Para este script se necesita que el archivo PDB y PSF tengan el mismo nombre, en este caso se llama *hairpin*. La caja de agua se genera entre los puntos (-10.735 -11.238 -24.173) y (124.0 38.14 18.257) que son las coordenadas de los dos extremos de la diagonal del paralelepípedo.

```
set molename hairpin
mol new ${molname} .psf
mol addfile ${molname} .pdb
package require solvate
solvate ${molname} .psf ${molname} .pdb -minmax {
  {-10.735 -11.238 -24.173}{124.0 38.14 18.257} } -o hairpin_wb
```

ANEXO E

Archivo de Configuración de NAMD para la Minimización

```
#####  
## ADJUSTABLE PARAMETERS ##  
#####  
  
structure      ../ Structures / hairpin_wbi . psf  
coordinates    ../ Structures / hairpin_wbi . pdb  
  
#output  
outputname     hairpin_min  
outputenergies 50  
dcdfreq       500  
  
#####  
## SIMULATION PARAMETERS ##  
#####  
  
# force field  
paraTypeCharmm on  
parameters     ../ Structures / par_all27_prot_lipid_na . inp  
exclude        scaled1-4  
1-4scaling     1.0  
  
# PME (for full-system periodic electrostatics)  
PME            yes  
PMEGridSizeX  192  
PMEGridSizeY  72  
PMEGridSizeZ  72  
  
# approximations  
switching      on  
switchdist    10  
cutoff         14  
pairlistdist  15  
margin         1  
  
#integrator
```

```
timestep          1.0
stepspercycle     20
fullElectFrequency 5

# Periodic Boundary Conditions
cellBasisVector1 131.025  0.0  0.0
cellBasisVector2  0.0  49.209  0.0
cellBasisVector3  0.0   0.0  42.321
cellOrigin       58.773  12.998 -3.113

# fixed atoms
fixedAtoms        on
fixedAtomsCol     B
wrapAll           on

#####
## EXECUTION SCRIPT ##
#####

#protocol
temperature       0

#minimization
minimize          10000
```

ANEXO F

Archivo de Configuración de NAMD para la Calentamiento

```
#####  
## ADJUSTABLE PARAMETERS ##  
#####  
  
structure      ../ Structures / hairpin_wbi . psf  
coordinates    ../ Structures / hairpin_wbi . pdb  
bincoordinates  ../ Minimization / hairpin_min . coor  
  
#output  
outputenergies 100  
outputname     hairpin_heat  
dcdfreq       1000  
  
#####  
## SIMULATION PARAMETERS ##  
#####  
  
# force field  
paraTypeCharmm on  
parameters     ../ Structures / par_all27_prot_lipid_na . inp  
exclude        scaled1-4  
1-4scaling     1.0  
  
# PME (for full-system periodic electrostatics)  
PME            yes  
PMEGridSizeX  192  
PMEGridSizeY  72  
PMEGridSizeZ  72  
  
# approximations  
switching      on  
switchdist     10  
cutoff         14  
pairlistdist   15  
margin         1
```

```
# integrator
timestep          1.0
stepspercycle     20
fullElectFrequency 5

# fixed atoms
fixedAtoms        on
fixedAtomsCol     B
fixedAtomsForces  on

# periodic boundary conditions
extendedSystem    ../ Minimization / hairpin_min .xsc
wrapAll          on

#####
## EXECUTION SCRIPT                                ##
#####

#protocol
temperature       0
reassignFreq      25
reassignIncr      0.375
reassignHold      300

#script
run               20000
```

ANEXO G

Archivo de Configuración de NAMD para la Equilibración

```
#####  
## ADJUSTABLE PARAMETERS ##  
#####  
  
structure      ../ Structures / hairpin_wbi . psf  
coordinates    ../ Structures / hairpin_wbi . pdb  
bincoordinates ../ Heating / hairpin_heat . coor  
  
#output  
outputenergies 5000  
outputname     hairpin_eq1  
dcdfreq       10000  
  
#####  
## SIMULATION PARAMETERS ##  
#####  
  
# force field  
paraTypeCharmm on  
parameters     ../ Structures / par_all27_prot_lipid_na . inp  
exclude        scaled1-4  
1-4scaling     1.0  
  
# PME (for full-system periodic electrostatics)  
PME            yes  
PMEGridSizeX  192  
PMEGridSizeY  72  
PMEGridSizeZ  72  
  
# approximations  
switching      on  
switchdist    10  
cutoff         14  
pairlistdist  15  
margin         1
```

```
# integrator
timestep          1.0
stepspercycle    20
fullElectFrequency 5

# fixed atoms
fixedAtoms        on
fixedAtomsCol     B
fixedAtomsForces  on

# periodic boundary conditions
extendedSystem    ../Heating/hairpin_heat.xsc
wrapAll           on

#####
## EXECUTION SCRIPT                                ##
#####

#protocol
binvelocities     ../Heating/hairpin_heat.vel
langevin          on
langevinTemp      300
langevinDamping   50
LangevinPiston    on
LangevinPistonTarget 1.01325
LangevinPistonPeriod 200
LangevinPistonDecay 50
LangevinPistonTemp 300
useFlexibleCell   yes

#script
run               2000000
```


ANEXO H

Archivo de Configuración de NAMD para la Ruptura de las Bases a Fuerza Constante

```
#####  
## ADJUSTABLE PARAMETERS ##  
#####  
  
#molecular system  
structure          ../ ../ Structures / hairpin_wbi . psf  
coordinates        force100 . pdb  
bincoordinates     ../ ../ Equilibration / hairpin_eq10 . coor  
  
#output  
outputname         cfp100D1  
outputenergies     1000  
dcdfreq            2000  
  
#Constant Force  
constantforce      on  
consforcefile      force100 . pdb  
  
#####  
## SIMULATION PARAMETERS ##  
#####  
  
# force field  
paraTypeCharmm     on  
parameters         ../ Structures / par_all27_prot_lipid_na . inp  
exclude            scaled1-4  
1-4scaling         1.0  
  
# PME (for full-system periodic electrostatics)  
PME                yes  
PMEGridSizeX       192  
PMEGridSizeY       72  
PMEGridSizeZ       72
```

```
# approximations
switching          on
switchdist        10
cutoff            14
pairlistdist      15
margin            1

# integrator
timestep          1.0
stepspercycle     20
fullElectFrequency 5

# fixed atoms
fixedAtoms        on
fixedAtomsCol     B
fixedAtomsForces  on

#boundary conditions
extendedSystem    .../.../Equilibration/hairpin_eq10.xsc
wrapAll          on

#####
## EXECUTION SCRIPT                                ##
#####

#protocol
binvelocities     .../.../Equilibration/hairpin_eq10.vel

#script
run               400000
```

Referencias

- [1] G. M. BLACKBURN. *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*. Royal Society of Chemistry, 2006.
- [2] J. D. WATSON and F. H. C. CRICK. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature*, 171(4356):737 – 738, 1953.
- [3] C. K. MATHEWS, K. VAN HOLDE, and K. G. AHERN. *Bioquímica*. Pearson Educación, S. A., Madrid, tercera edición edition, 2003.
- [4] R. R. SINDEN. *DNA structure and function*. Academic Press, 1994.
- [5] H. CLAUSEN-SCHAUMANN, M. RIEF, C. TOLKSDORF, and H.E. GAUB. Mechanical Stability of Single DNA Molecules. *Biophysical Journal*, 78(4):1997 – 2007, 2013.
- [6] PAC. Basic Terminology of Stereochemistry (IUPAC Recommendations 1996). *Pure Appl. Chem.*, 68(12):2193 – 2222, 1996.
- [7] S. ENGEL. *Folding and unfolding of a triple-branch DNA hairpin molecule with four conformational states by mechanical stretching*. PhD thesis, Technische Universität Ilmenau, 2010.
- [8] Z. SUO and K. A. JOHNSON. DNA Secondary Structure Effects on DNA Synthesis Catalyzed by HIV-1 Reverse Transcriptase. *Journal of Biological Chemistry*, 273(42): 27259 – 27267, 1998.
- [9] R. M. WADKINS. Targeting DNA Secondary Structures. *Current Medicinal Chemistry*, 7:1 – 15, 2000.
- [10] A. CONSTANTINO, M. TARSOUNAS, J.K. KAROW, R. M. BROSH, V. A. BOHR, I. D. HICKSON, and S. C. WEST. Werner's syndrome protein (WRN) migrates Holliday junctions and co-localizes with RPA upon replication arrest. *EMBO reports*, 1(1):80 – 84, 2000.
- [11] H. HAN and L.H. HURLEY. G-quadruplex DNA: a potential target for anti-cancer drug design. *Biochemical Society Transactions*, 29(5):136 – 142, 2000.

- [12] L. H. HURLEY. Secondary DNA structures as molecular targets for cancer therapeutics. *Biochemical Society Transactions*, 29(6):692 – 696, 2001.
- [13] C. W. HILBERS, C. A. G. HAASNOOT, S. H. de BRUIN, J. J. M. JOORDENS, G. A. VAN DER MAREL, and J. H. VAN BOOM. Hairpin formation in synthetic oligonucleotides. *Biochimie*, 67:685 – 695, 1985.
- [14] B. NGUYEN and D. WILSON. The Effects of Hairpin Loops on Ligand – DNA Interactions. *J. Phys. Chem. B*, 113:14329 – 14335, 2009.
- [15] D. RENTZEPERIS, K. ALESSI, and L. A. MARKY. Thermodynamics of DNA hairpins: contribution of loop size to hairpin stability and ethidium binding. *Nucleic Acids Research*, 21(11):2683 – 2689, 1993.
- [16] S. J. GREEN, D. LUBRICH, and J. TURBERFIELD. DNA Hairpins: Fuel for Autonomous DNA Devices. *Biophysical Journal*, 91:2966 – 2975, 2006.
- [17] E. ZAZOPOULOS, E. LALLI, D. M. STOCCO, and P. SASSONE-CORSI. DNA binding and transcriptional repression by DAX-1 blocks steroidogenesis. *Nature*, 390:311 – 315, 1997.
- [18] S. J. FROELICH-AMMON, K. C. GALE, and N. OSHEROFF. Site-specific cleavage of a DNA hairpin by topoisomerase II. DNA secondary structure as a determinant of enzyme recognition/cleavage. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(10):7719 – 7725, 1994.
- [19] A. T. JONSTRUP, T. THOMSEN, Y. WANG, B. R. KNUDSEN, J. KOCH, and A. H. ANDERSEN. Hairpin structures formed by alpha satellite DNA of human centromeres are cleaved by human topoisomerase II α . *Nucl. Acids Res.*, 36(19):6165 – 6174, 2008.
- [20] T. Q. TRINH and R. R. SINDEN. The influence of primary and secondary DNA structure in deletion and duplication between direct repeats in Escherichia coli. *Genetics*, 134 (6335):409 – 422, 1993.
- [21] K. C. GALE and N. OSHEROFF. Uncoupling the DNA cleavage and religation activities of topoisomerase II with a single-stranded nucleic acid substrate: evidence for an active enzyme-cleaved DNA intermediate. *Biochemistry*, 29(41):9538 – 9545, 1990.
- [22] R. M. WADKINS, B. VLADU, and C. TUNG. Actinomycin D Binds to Metastable Hairpins in Single-Stranded DNA. *Biochemistry*, 37(34):11915 – 11923, 1998.
- [23] M. MANOSAS, X. G. XI, D. BENSIMON, and V. CROQUETTE. Active and passive mechanisms of helicases. *Nucleic Acids Research*, 38(16):5518 – 5526, 2010.
- [24] U. BOCKELMANN, P. THOMEN, B. ESSEVAZ-ROULET, V. VIASNOFF, and F. HESLOT. Unzipping DNA with Optical Tweezers: High Sequence Sensitivity and Force Flips. *Biophysical Journal*, 82(3):1537 – 1553, 2002.

- [25] G. U. LEE, L. A. CHRISEY, and R. J. COLTON. Direct measurement of the forces between complementary strands of DNA. *Science*, 266:771 – 773, 1994.
- [26] M. RIEF, H. CLAUSEN-SCHAUMANN, and H. E. GAUB. Sequence-dependent mechanics of single DNA molecules. *Nat. Struct. Biol.*, 6:346 – 349, 1999.
- [27] M. C. WILLIAMS and I. ROUZINA. Force spectroscopy of single DNA and RNA molecules. *Current opinion in structural biology*, 12(3):330 – 336, 2002.
- [28] A. ASHKIN, K. SCHÜTZE, J. M. DZIEDZIC, U. EUTENEUER, and M. SCHLIWA. Force generation of organelle transport measured in vivo by an infrared laser trap. *Nature*, 348: 346 – 348, 1990.
- [29] M. P. SHEETZ. *Laser Tweezers in Cell Biology, Methods in Cell Biology*, volume 55. New York: Academic Press, 1997.
- [30] S. B. SMITH, L. FINZI, and C. BUSTAMANTE. *Science. Direct mechanical measurements of the elasticity of single DNA molecules by using magnetic beads*, 258:1122 – 1126, 1992.
- [31] G. BINNIG, C. F. QUATE, and C. GERBER. Atomic force microscope. *Phys. Rev. Lett.*, 56:930, 1986.
- [32] M. B. VIANI, T. E. SCHAFFER, G. T. PALOCZI, L. I. PIETRASANTA, B. L. SMITH, J. B. THOMPSON, M. RICHTER, M. RIEF, H. E. GAUB, K. W. PLAXCO, A. N. CLELAND, H. G. HANSMA, and P. K. HANSMA. Fast imaging and fast force spectroscopy of single biopolymers with a new atomic force microscope designed for small cantilevers. *Review of Scientific Instruments*, 70(11):4300–4303, 1999.
- [33] M.B. VIANI, T.E. SCHAFFER, A. CHAND, M. RIEF, H. E. GAUB, and K. HANSMA, P. Small cantilevers for force spectroscopy of single molecules. *J. Appl. Phys.*, 86:2258 – 2262, 1999.
- [34] C. BUSTAMANTE, S. B. SMITH, J. LIPHARDT, and D. SMITH. Single-molecule studies of DNA mechanics. *Current Opinion in Structural Biology*, 10(3):279 – 285, 2000.
- [35] D. ALLAWAY, N. A. SCHOFIELD, and P. S. POOLE. Optical traps: shedding light on biological processes. *Biotechnology Letters*, 22(11):887 – 892, 2000.
- [36] C. BUSTAMANTE, Z. BRYANT, and S. B. SMITH. Ten years of tension: single-molecule DNA mechanics. *Nature*, 421(6921):423–427, 2003.
- [37] A. MOSSA, M. MANOSAS, N. FORNS, J. M. HUGUET, and F. RITORT. Dynamic force spectroscopy of DNA hairpins: I. Force kinetics and free energy landscapes. *J. Stat. Mech.*, 2009, 2009.

- [38] T. SCHLICK. *Molecular modeling and simulation: An interdisciplinary guide*, volume 21. Springer, 2010.
- [39] X. ZHANG and R. M. WADKINS. DNA Hairpins Containing the Cytidine Analog Pyrrolo-dC: Structural, Thermodynamic, and Spectroscopic Studies. *Biophysical Journal*, 96(5):1884 – 1891, 2009.
- [40] A. R. LEACH. *Molecular Modelling: Principles and Applications*. Pearson Education EMA, second edition, 2001.
- [41] C. LEVINTHAL. *Mössbauer spectroscopy in biological systems, proceedings of a meeting held at Allerton House, Monticello, Illinois*. University of Illinois Press, 1969.
- [42] J. N. ONUCHIC, Z. LUTHEY-SCHULTEN, and P. G. WOLYNES. Theory of protein folding: the energy landscape perspective. *Annual Review of Physical Chemistry*, 48: 545 – 600, 1997.
- [43] D. J. WALES and T. V. BOGDAN. Potential Energy and Free Energy Landscapes. *J. Phys. Chem. B*, 110(42):20765 – 20776, 2006.
- [44] D. J. WALES. *Energy landscapes*. Cambridge University Press, 2003.
- [45] M. A. MILLER and D. J. WALES. Energy landscape of a model protein. *Journal of Chemical Physics*, 111:6610 – 6616, 1999.
- [46] P. HÄNGGI, P. TAKNER, and M. BORKOVEC. Reaction-rate theory: fifty years after Kramers. *Reviews of Modern Physics*, 62:251 – 342, 1990.
- [47] H. A. KRAMERS. Brownian Motion in a Field of Force and the Diffusion Model of Chemical Reaction. *Physica*, 7:284 – 304, 1940.
- [48] G. I. BELL. Models for the specific adhesion of cells to cells. *Science*, 200(4342):618 – 627, 1978.
- [49] E. EVANS and K. RITCHIE. Dynamic Strength of Molecular Adhesion Bonds. *Biophysical Journal*, 72:1541 – 1555, 1997.
- [50] C. DANILOWICZ, V. W. COLJEE, C. BOUZIGUES, D. K. LUBENSKY, D. R. NELSON, and M. PRENTISS. DNA unzipped under a constant force exhibits multiple metastable intermediates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(4):1694–1699, 2003.
- [51] J. P. LEWIS and O. F. SANKEY. Geometry and Energetics of DNA Basespairs and Triplets from First Principle Quantum Molecular Relaxations. *Biophysical Journal*, 69: 1068 – 1076, 1995.

- [52] K. B. BRAVAYA, O. KOSTKO, M. AHMED, and A. I. KRYLOV. The effect of π -stacking, H-bonding, and electrostatic interactions on the ionization energies of nucleic acid bases: adenine–adenine, thymine–thymine and adenine–thymine dimers. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 12, 2010.
- [53] J. LANGLET, P. CLAVERIE, F. CARON, and J. C. BOEUVE. Interactions between nucleic acid bases in hydrogen bonded and stacked configurations: the role of the molecular charge distribution. *Int. J. Quantum Chem Symp.*, 19:299 – 338, 1981.
- [54] S.-P. JIANG, R. L. JEMIGAN, K.-L. TING, J.-L. SYI, and G. RAGHUNATHAN. Stability and cooperativity of nucleic acid base triplets. *J. Biomol. Struct. & Dyn.*, 12:383–399, 1994.
- [55] V. I. POLTEV and N. V. SHULYUPINA. Simulation of interactions between nucleic acid bases by refined atom-atom potential functions. *J. Biomol. Struct. & Dyn.*, 3:739 – 765, 1986.
- [56] V. B. ZHURKIN, G. RAGHUNATHAN, N. B. ULYANOV, R. D. Camerini-Otero, and R. L. Jernigan. A parallel DNA triplex as a model for the intermediate in homologous recombination. *J. Mol. Biol.*, 239:181 – 200, 1994.
- [57] I. K. YANSON, A. B. TEPLITSKY, and L. F. SUKHODUB. Experimental studies of molecular interactions between nitrogen bases of nucleic acids. *Biopolymers*, 18:1149, 1979.
- [58] J. ŠPONER, J. E. ŠPONER, A. MLÁDEK, P. JUREČKA, P. BANÁŠ, and M. OTYEPKA. Nature and magnitude of aromatic base stacking in DNA and RNA: Quantum chemistry, molecular mechanics, and experiment. *Biopolymers*, 99:978 – 988, 2013.
- [59] V. R. COOPER, T. THONHAUSER, A. PUZDER, E. SCHRÖDER, B. I. LUNDQVIST, and D. C. LANGRETH. Stacking Interactions and the Twist of DNA. *Journal of the American Chemical Society*, 130:1304 – 1308, 2007.
- [60] J. ŠPONER, P. JUREČKA, I. MARCHAN, F. J. LUQUE, M. OROZCO, and P. HOBZA. Nature of Base Stacking: Reference Quantum-Chemical Stacking Energies in Ten Unique B-DNA Base-Pair Steps. *Chem. Eur. J.*, 12:2854 – 2865, 2006.
- [61] E. G. LEWARS. *Computational Chemistry: Introduction to the Theory and Applications of Molecular and Quantum Mechanics*. Springer, 1 edition edition, 2003.
- [62] JR. A. D. MACKERELL, N. BANAVALI, and N. FOLOPPE. Development and current status of the CHARMM force field for nucleic acids. *Biopolymers*, 56(4):257 – 265, 2001.

- [63] D. A. CASE, T. A. DARDEN, T. E. CHEATHAM-III, C. L. SIMMERLING, J. WANG, R. E. DUKE, R. LUO, R. C. WALKER, W. ZHANG, K. M. MERZ, B. ROBERTS, S. HAYIK, A. ROITBERG, G. SEABRA, J. SWAILS, A. W. GOETZ, I. KOLOSSVÁRY, K. F. WONG, F. PAESANI, J. VANICEK, R. M. WOLF, J. LIU, X. WU, S. R. BROZELL, T. STEINBRECHER, H. GOHLKE, Q. CAI, X. YE, J. WANG, M.-J. HSIEH, G. CUI, D. R. ROE, D. H. MATHEWS, M. G. SEETIN, R. SALOMON-FERRER, C. SAGUI, V. BABIN, T. LUCHKO, S. GUSAROV, A. KOVALENKO, , and P. A. KOLLMAN. *AMBER 12. University of California and San Francisco*, 2012.
- [64] M. BHANDARKAR, A. BHATELE, E. BOHM, R. BRUNNER, F. BUELENS, C. CHIPOT, A. DALKE, S. DIXIT, G. FIORIN, P. FREDDOLINO, P. GRAYSON, J. GULLINGSRUD, A. GURSOY, D. HARDY, C. HARRISON, J. HENIN, W. HUMPHREY, D. HURWITZ, N. KRAWETZ, S. KUMAR, D. KUNZMAN, C. LEE, C. MEI, M. NELSON, J. PHILLIPS, O. SAROOD, A. SHINOZAKI, G. ZHENG, and F. ZHU. *NAMD Users Guide*, 2010.
- [65] D. VAN-DER-SPOEL, E. LINDAHL, B. HESS, G. GROENHOF, A. E. MARK, and H. J. C. BERENDSEN. GROMACS: Fast, flexible, and free. *Journal of Computational Chemistry*, 26(16):1701 – 1718, 2005.
- [66] J. C. PHILLIPS, R. BRAUN, W. WANG, J. GUMBART, E. TAJKHORSHID, E. VILLA, C. CHIPOT, R. D. SKEEL, L. KALE, and K. SCHULTEN. Scalable molecular dynamics with NAMD. *Journal of Computational Chemistry*, 26:1781 – 1802, 2005.
- [67] D. E. CULLER, J. P. SINGH, and A. GUPTA. *Parallel computer architecture: a hardware/software approach*. Morgan Kaufmann Publishers, 1999.
- [68] P. P. EWALD. Evaluation of optical and electrostatic lattice potentials. . *Ann. Phys.*, 64: 253 – 287, 1921.
- [69] W. HUMPHREY, A. DALKE, and K. SCHULTEN. VMD - Visual Molecular Dynamics. *J. Molec. Graphics*, 14:33 – 38, 1996.
- [70] National Partnership for Advanced Computational Infrastructure. Rolled Tacos (5.3) for Linux, 2010. URL <http://www.rocksclusters.org>.
- [71] T. ISGRO, J. PHILLIPS, M. SOTOMAYOR, and E. VILLA. *NAMD Tutorial, Windows Version*, 2009.
- [72] C. J. CRAMER. *Essentials of computational chemistry: theories and models*. Wiley, 2004.
- [73] D. BRITO. *Determinación de tamaños de liposomas en solución mediante el análisis y de las funciones de autocorrelación asociada a la dispersión de luz*. PhD thesis, Escuela Politécnica Nacional, 2013.

- [74] M. L. BENNINK, S. H. LEUBA, G. H. LENO, J. ZLATANOVA, B. G. DE GROOTH, and J. GREVE. Unfolding individual nucleosomes by stretching single chromatin fibers with optical tweezers. *Nature Structural Biology*, 8(7):606 – 610, 2001.
- [75] J. DAI and M. P. SHEETZ. Mechanical properties of neuronal growth cone membranes studied by tether formation with laser optical tweezers. *Biophysical Journal*, 68(3): 988996, 1995.
- [76] Z. LI, B. ANVARI, M. TAKASHIMA, P. BRECHT, J. H. TORRES, and W. E. BROWNELL. Membrane tether formation from outer hair cells with optical tweezers. *Biophys J.*, 82 (3):1386 – 1395, 2002.
- [77] C. VEIGEL, J. E. MOLLOY, S. SCHMITZ, and J. KENDRICK-JONES. Load-dependent kinetics of force production by smooth muscle myosin measured with optical tweezers. *Nature Cell Biology*, 5(11):980 – 986, 2003.
- [78] K. SVOBODA, C. F. SCHMIDT, B. J. SCHNAPP, and S. M. BLOCK. Direct observation of kinesin stepping by optical trapping interferometry. *Nature*, 365(6448):721 – 727, 1993.
- [79] M. J. LANG and S. M. BLOCK. Resource Letter: LBOT-1: Laser-based optical tweezers. *American Journal of Physics*, 71(3):201 – 215, 2003.
- [80] A. ASHKIN. Optical trapping and manipulation of neutral particles using lasers. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94(10):4853 – 4860, 1997.
- [81] J. R. MOFFITT, Y. R. CHEMLA, S. B. SMITH, and C. BUSTAMANTE. Recent Advances in Optical Tweezers. *Annual Review of Biochemistry*, 77:205 – 208, 2008.