

IPICYT

**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN NANOCIENCIAS Y MATERIALES

**Desarrollo de un protocolo óptimo para el estudio de
complejos moleculares de ADN-proteína por medio de
Microscopía de Fuerza Atómica**

Tesis que presenta

Nancy Anabel Gerling Cervantes

Para obtener el grado de

Maestra en Nanociencias y Materiales

Director de la Tesis:

Dr. Braulio Gutiérrez Medina

San Luis Potosí, S.L.P., Septiembre de 2013



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Desarrollo de un protocolo óptimo para el estudio de complejos moleculares de ADN-proteína por medio de Microscopía de Fuerza Atómica**” presentada para obtener el Grado de Maestro (a) en Nanociencias y Materiales fue elaborada por **Nancy Anabel Gerling Cervantes** y aprobada el **19 de Septiembre de 2013** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Materiales Avanzados del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Braulio Gutiérrez Medina
(Director de la tesis)

Dra. Olga Araceli Patrón Soberano
(Miembro del Comité Tutorial)

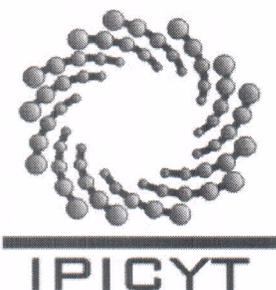
Dr. Miguel Avalos Borja
(Miembro del Comité Tutorial)



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Nanoestructuras I de la División de Materiales Avanzados del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Braulio Gutiérrez Medina.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología 341799 y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 004 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Nanociencias y Materiales está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 19 días del mes de septiembre del año 2013, se reunió a las 17:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

| | | |
|--|-------------------|---------------|
| Dra. Olga Araceli Patrón Soberano | Presidenta | IPICYT |
| Dr. Miguel Avalos Borja | Secretario | IPICYT |
| Dr. Braulio Gutiérrez Medina | Sinodal | IPICYT |

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRA EN NANOCIENCIAS Y MATERIALES

sustentó la C.

Nancy Anabel Gerling Cervantes

sobre la Tesis intitulada:

Desarrollo de un protocolo óptimo para el estudio de complejos moleculares de ADN-proteína por medio de microscopía de fuerza atómica

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Braulio Gutiérrez Medina

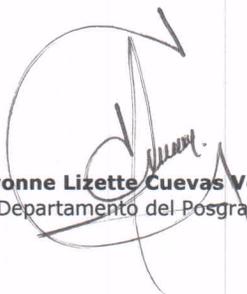
El Jurado, después de deliberar, determinó

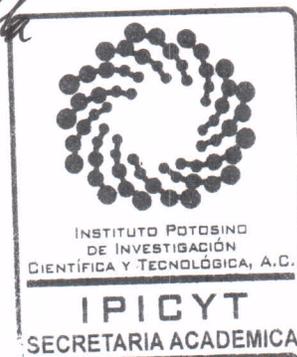
APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 18:20 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 19 días del mes de septiembre de 2013.


Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico


Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado





Constancia de aprobación de la tesis

La tesis ***“Desarrollo de un protocolo óptimo para el estudio de complejos moleculares de ADN-proteína por medio de microscopía de fuerza atómica”*** presentada para obtener el Grado de Maestra en Nanociencias y Materiales fue elaborada por **Nancy Anabel Gerling Cervantes** y aprobada el **diecinueve de e dos mil trece** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Materiales Avanzados del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Braulio Gutiérrez Medina
Director de la tesis

Dra. Olga Araceli Patrón Soberano
Miembro del Comité Tutorial

Dr. Miguel Avalos Borja
Miembro del Comité Tutorial

A mis padres:

María Elena Cervantes Briones y Edmundo Augusto Gerling Gómez del Campo

Gracias por todo el apoyo que siempre me han brindado.

Agradecimientos

Al Dr. Braulio Gutiérrez Medina, por dirigir la elaboración de la presente tesis y por todo el apoyo brindado durante el desarrollo de la misma.

Al Dr. Miguel Avalos Borja por permitirme usar el equipo Jeol JSPM-5200 que se encuentra disponible en el LINAN.

Al Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga y al Biol. Salvador Ambríz Granados por permitirme trabajar en su laboratorio en Biología Molecular y por todo su apoyo brindado.

A mis compañeros de laboratorio Alma Rosa Oaxaca Camacho, Noemí Hernández Candia, Andrés Jiménez Guerra y Miguel Guzmán Altamirano por su ayuda y su amistad brindada.

A CONACYT por la beca proporcionada.

Al comité de becas de la División de Materiales Avanzados por la beca proporcionada.

Contenido

| | |
|---|-----------|
| Constancia de aprobación de la tesis | ii |
| Créditos institucionales | iii |
| Acta de examen | iv |
| Dedicatorias | v |
| Agradecimientos | vi |
| Resumen | x |
| Abstract | xi |
| | |
| CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1. Estructura y función del ADN | 1 |
| 1.2. Antecedentes de interacción ADN-proteína e importancia del estudio . . . | 4 |
| 1.3. Modelos propuestos de interacción entre ADN y proteína | 5 |
| 1.4. Objetivos de la Tesis | 10 |
| | |
| CAPÍTULO 2. ADN LINEAL, ADN CIRCULAR Y PROTEÍNA UDG | 11 |
| 2.1. ADN lineal: Lambda ADN | 11 |
| 2.2. ADN circular: Plásmidos | 12 |
| 2.2.1. Plásmido pCA1 | 14 |
| 2.3. Proteína Uracilo-ADN glicosilasa | 14 |
| | |
| CAPÍTULO 3. MÉTODO EXPERIMENTAL | 18 |
| 3.1. Protocolo de extracción de ADN plasmídico Maxiprep | 18 |
| 3.2. Técnicas experimentales | 20 |
| 3.2.1. <i>Spin-Coating</i> | 20 |
| 3.2.2. Microscopía de Fuerza Atómica | 22 |
| 3.2.2.1. Guía rápida de operación del equipo Jeol JSPM-5200 | 28 |

| | |
|--|-----------|
| 3.3. Protocolos de preparación de muestras para AFM | 32 |
| 3.3.1. Modificación de mica con APTES (AP-mica) | 32 |
| 3.3.2. Preparación de muestras con esferas de poliestireno (PS) | 33 |
| 3.3.3. Preparación de muestras de ADN sobre AP-mica utilizando el método de deposición convencional | 33 |
| 3.3.4. Preparación de muestras de ADN sobre mica utilizando el método de deposición convencional | 34 |
| 3.3.5. Preparación de muestras de λ ADN-UDG sobre mica y AP-mica utilizando el método de deposición de <i>spin-coating</i> | 34 |
| 3.3.6. Preparación de muestras de λ ADN-UDG sobre mica utilizando formaldehído como <i>cross-link</i> y el método de deposición de <i>spin-coating</i> | 35 |
| | |
| CAPÍTULO 4. RESULTADOS | 36 |
| 4.1. Esferas de PS | 36 |
| 4.2. Cadenas del plásmido pCA1 depositado sobre mica y AP-mica | 38 |
| 4.2.1. Mediciones de alturas y longitudes de cadena del plásmido pCA1 | 40 |
| 4.3. Cadenas de λ ADN depositado sobre AP-mica y mica | 42 |
| 4.3.1. Formación de superestructuras de λ ADN sobre AP-mica y mica | 42 |
| 4.3.2. Mediciones de altura y longitudes de cadena del λ ADN | 46 |
| 4.4. Visualización de complejos λ ADN-UDG utilizando la técnica de deposición de <i>spin-coating</i> | 48 |
| 4.4.1. λ ADN y UDG depositados sobre AP-mica y mica | 48 |
| 4.4.2. Mediciones de las alturas de cadena del λ ADN depositado sobre mica | 52 |
| 4.4.3. Mediciones de las alturas de las moléculas de UDG presentes en el sustrato y sobre las cadenas del λ ADN | 54 |
| 4.4.4. Probabilidad de unión de moléculas de UDG sobre las cadenas del λ ADN | 58 |
| | |
| CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN | 60 |
| 5.1. Elección del sustrato para la deposición de esferas de PS y ADN | 60 |
| 5.2. Obtención de superestructuras de ADN sobre mica | 63 |

| | |
|--|-----------|
| 5.3. Obtención de muestras homogéneas mediante el método deposición de <i>spin-coating</i> | 64 |
| 5.4. Medición de alturas del plásmido pCA1 y del λ ADN, menores al valor esperado | 65 |
| 5.5. Medidas de alturas en partículas de UDG presentes sobre el sustrato y sobre las cadenas del λ ADN mediante la técnica de deposición por <i>spin-coating</i> | 67 |
| 5.6. Probabilidad de unión de la proteína UDG sobre cadenas del λ ADN | 68 |
| 5.7. Dobleces inducidos por moléculas de UDG sobre sitios de unión en las cadenas del λ ADN | 74 |
| CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS | 76 |
| REFERENCIAS | 79 |

Resumen

En esta tesis se desarrolló un protocolo óptimo para el estudio de complejos moleculares de ADN-proteína mediante Microscopía de Fuerza Atómica (AFM). La técnica de AFM ha sido extensamente utilizada para el estudio de moléculas biológicas, en particular ADN, debido a su alta resolución espacial y a que permite analizar muestras sin recurrir a tinciones o recubrimientos.

En este trabajo de tesis revisamos diferentes preparaciones de muestras hasta establecer un protocolo óptimo para la visualización de moléculas de ADN (λ ADN y plásmidos) y complejos ADN-proteína, utilizando como proteína modelo la Uracilo-ADN glicosilasa (UDG). Estas moléculas se depositaron sobre dos sustratos: mica y mica modificada con APTES (AP-mica). Se utilizaron dos métodos de deposición: el método convencional y el método de *spin-coating*. Concluimos que la mica es un sustrato favorable para la obtención de moléculas de ADN extendidas y aisladas, caso contrario al uso de AP-mica. Respecto a las técnicas de deposición, con el método convencional se obtienen muestras inhomogéneas y se observó la formación de diferentes superestructuras de ADN sobre mica. El problema de inhomogeneidad en las muestras se resolvió mediante la técnica de *spin-coating*, lo cual nos permitió observar de manera reproducible complejos λ ADN-UDG. En estos experimentos el uso de formaldehído como agente de entrecruzamiento incrementa el número de complejos λ ADN-UDG observados por AFM. Resultados preliminares obtenidos en esta tesis sugieren que el mecanismo de reconocimiento del λ ADN por la UDG no ocurre por deformación del ADN (un mecanismo propuesto para otras proteínas reparadoras de ADN).

Palabras Clave: AFM, ADN, UDG, *spin-coating*, *cross-link*, complejos ADN-proteína.

Abstract

We developed an optimal protocol for studying molecular DNA-protein complexes using Atomic Force Microscopy (AFM). This technique has been used extensively for the study of biological molecules like DNA. It has a high spatial resolution and analyses performed does not require staining or coating samples.

In this work, we used Uracil-DNA glycosylase (UDG), a model protein, and reviewed different sample preparation protocols establishing an optimal protocol for visualizing DNA (λ DNA and plasmids) and DNA-protein complexes. These molecules were deposited onto two substrates, mica and APTES-modified mica (AP-mica). Two methods were used deposition: the conventional method and the method of spin-coating. We conclude mica is a favorable substrate for the obtaining extended and isolated DNA molecules, unlike AP-mica. In regards with the deposition techniques used, the conventional method resulted in inhomogeneous samples and we observed the formation of different DNA superstructures on mica. Inhomogeneities were resolved by spin-coating technique, which allowed us to observe λ DNA-UDG complexes in a reproducible manner. In our experiments, the use of formaldehyde as a crosslinking agent increased the number of λ DNA-UDG complexes observed by AFM. Preliminary results obtained in this work suggest that the mechanism of λ DNA recognition by UDG does not occur by deformation of DNA (a mechanism proposed for other DNA-repair proteins).

Key Words: AFM, DNA, UDG, spin-coating, cross-link, DNA-protein complexes.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

En este Capítulo se mencionan algunos conceptos básicos, antecedentes e importancia de interacción ADN-proteína así como también modelos propuestos para estas interacciones. Por último se mencionan los objetivos de la presente tesis.

1.1. Estructura y función del ADN

El ácido desoxirribonucleico (ADN) es un polímero en el cual está contenida toda la información genética. Esta molécula actúa como una "copia de seguridad" o de respaldo a partir de la cual se van a poder producir las proteínas necesarias para la célula y como sistema para transferir la información a las células hijas [1].

En la época de los trabajos de Watson y Crick se sabía que el ADN era un polímero compuesto de una secuencia de nucleótidos, los cuales están conformados por un grupo fosfato, un azúcar (desoxirribosa) y una base nitrogenada. La principal característica es que se trata de una doble hélice con esqueleto hidrofílico de azúcar-fosfato en el exterior, el cual le confiere su carga negativa a esta molécula [2]. Las bases nitrogenadas son hidrofóbicas y están en el interior, orientadas de tal manera que se forman enlaces de hidrógeno entre purinas y pirimidinas de cadenas opuestas. Las dos bases que forman un par de bases están en el mismo plano y dicho plano es perpendicular al eje de la hélice. En el ADN están presentes 4 bases nitrogenadas (ver Figura 1.1.1): 2 purinas, Adenina (A) y Guanina (G); y 2 pirimidinas, Citocina (C) y Timina (T). El

apareamiento de las bases es específico, siempre A con T y G con C, dando lugar a que las dos hebras de ADN sean complementarias.

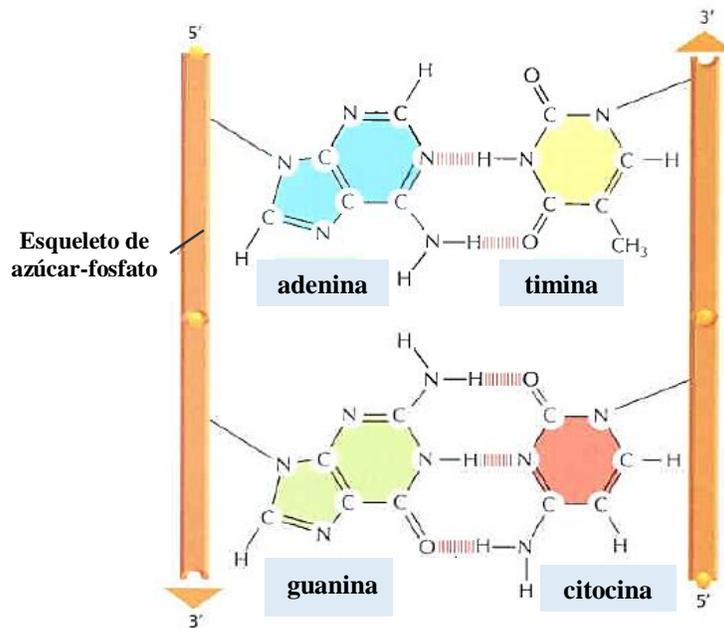


Figura 1.1.1. Bases nitrogenadas que conforman el ADN. Figura modificada de la referencia [3].

Con los estudios de cristalografía por refracción de rayos X llevados a cabo por Maurice Wilkins y Rosalind Franklin se reveló que el ADN es una hélice que da un giro cada 3.4 nm y que la distancia entre pares de bases es de 0.34 nm. Un dato importante es que el diámetro de la hélice es de 2 nm, sugiriendo que está compuesta no por una, sino por dos cadenas de ADN [4]. La hélice del ADN presenta dos surcos helicoidales externos, uno de ellos ancho y profundo llamado surco mayor, y el otro estrecho y poco profundo llamado surco menor. Las proteínas que interactúan con el ADN lo hacen, mayoritariamente, por el surco mayor, que es lo suficientemente amplio como para permitir que las moléculas proteicas entren en contacto con las bases. La estructura descrita por Watson y Crick (ver Figura 1.1.2) es la que adopta el ADN en condiciones de baja fuerza iónica y de humedad elevada (92% de humedad relativa) y corresponde al B-ADN.

Sin embargo, además de la forma B, el ADN puede adoptar otras estructuras, algunas de ellas son la forma A y la forma Z (ver Figura 1.1.3):

- A-ADN: Es la estructura que adopta cuando está menos hidratado (65-75% de humedad relativa). En este caso, el diámetro de la molécula es mayor (2.3 nm) y los pares de bases están más juntos y ya no son perpendiculares al eje de la molécula, sino que adoptan un ángulo de unos 20°.
- Z-ADN: Es una estructura que se encuentra cuando alternan purinas y pirimidinas en la secuencia. En este caso, el diámetro de la molécula es menor y las cadenas principales de la molécula discurren en "zig-zag" con una trayectoria levógira. En ésta conformación, el diámetro de la hélice es de 1.8 nm [5].

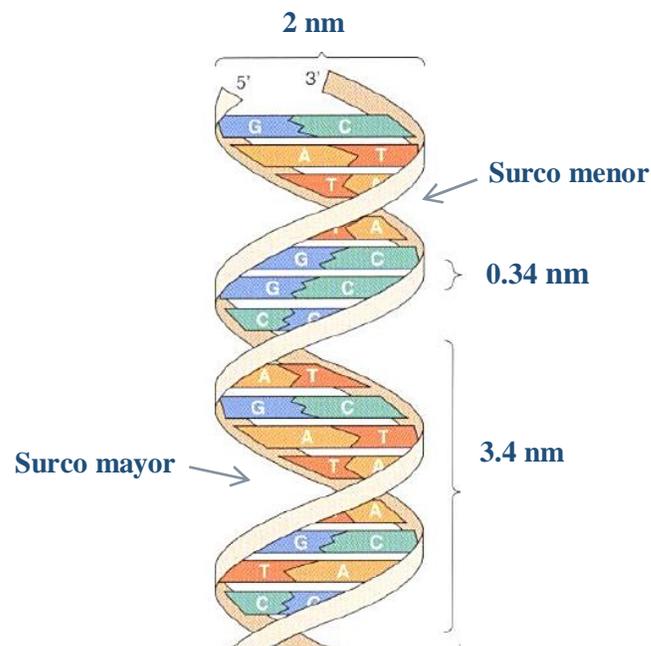


Figura 1.1.2. Representación de la doble hélice del ADN (B-ADN). Figura modificada de la referencia [4].

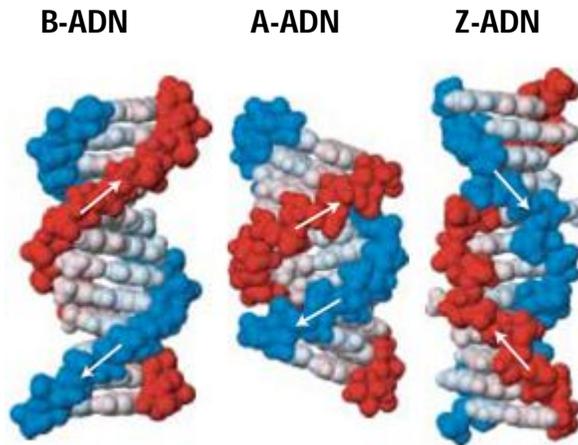


Figura 1.1.3. Representación de las diferentes estructuras del ADN (conformación A, B y Z). Figura modificada de la referencia [6].

1.2. Antecedentes de interacción ADN-proteína e importancia del estudio

Las interacciones entre ADN y proteína pueden llevarse a cabo de manera específica o no específica. Ambos tipos de interacciones están mediadas por diferentes fuerzas como son puentes de hidrógeno, interacciones iónicas, van der Waals, hidrofóbicas etc. En el caso de las interacciones no específicas, la secuencia de nucleótidos no es importante. Un ejemplo de éste tipo de interacciones es la que se da entre el ADN y unas proteínas llamadas histonas, donde la interacción ocurre entre los grupos funcionales de las proteínas y el esqueleto de azúcar-fosfato del ADN. Las interacciones específicas entre ADN y proteína dependen de la secuencia y orientación de las bases en el ADN [7].

Estas interacciones entre ADN y proteína son de gran importancia para regular muchos procesos que se llevan a cabo dentro de las células, como son la transcripción, replicación, reparación y reordenamiento del ADN [8]. Por lo tanto, la identificación y el estudio de la naturaleza de estas interacciones, es un requisito de suma importancia para entender la base molecular de cómo estos procesos biológicos fundamentales se llevan a cabo [9].

Tradicionalmente, las técnicas implementadas para la identificación y caracterización de estas interacciones ADN-proteína han sido, en su mayoría,

limitadas a estudios bioquímicos [10]. Recientemente se han implementado otras técnicas como FRET [9], NMR [11, 12, 13], microscopía de fluorescencia [14], entre otras. Una de estas técnicas es la Microscopía de Fuerza Atómica, la cual es la metodología utilizada en esta tesis.

Desde que se inventó, la Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) [15] ha sido ampliamente utilizada para la visualización y estudio de moléculas biológicas y sus interacciones. Los detalles de operación de esta técnica son el tema del Capítulo 3. Anteriormente, ya se han realizado estudios de moléculas de ADN por AFM utilizando diferentes sustratos para su inmovilización, como son el oro, grafito pirolítico altamente orientado (HOPG), vidrio y mica [16]. El sustrato más común que se ha utilizado para poder inmovilizar moléculas de ADN es la mica, ya que tiene una gran superficie atómicamente plana y el ADN puede unirse a ella bajo condiciones de buffers comunes. Se ha demostrado que el ADN se une mejor a la superficie de la mica en presencia de concentraciones milimolares de cationes divalentes [17]. Además, el tipo de protocolo a seguir para la deposición de moléculas de ADN sobre mica, puede llevar a la observación de diferentes conformaciones de ADN sobre el sustrato, como ya ha sido reportado en estudios previos realizados con AFM por Ye et al. [18] y Vesenska et al. [19]. Por lo tanto, la elección de un buen protocolo de preparación de muestras es muy importante.

En este trabajo de tesis, el sustrato que se eligió para la inmovilización de moléculas de ADN y su posterior visualización con AFM es la mica, ya que es de fácil preparación y solamente se tiene que elegir el buffer y el método de deposición adecuados.

1.3. Modelos propuestos de interacción entre ADN y proteína

En particular, hay dos preguntas básicas por contestar en cuanto a éste tema y son: ¿cómo la proteína busca el sitio correcto de unión a la molécula de ADN? y una vez que llega la proteína al ADN, ¿cuáles son los determinantes de reconocimiento entre proteína y el sitio específico en el ADN para que la proteína pueda comenzar a realizar su función? Ya han sido propuestos diversos modelos

que tratan de explicar cómo es que se lleva a cabo el proceso de unión y reconocimiento de las proteínas a la molécula de ADN.

En cuanto a la primera pregunta, las proteínas que interaccionan con secuencias específicas de ADN deben localizar sus sitios de entre un gran número de secuencias alternativas. Sin embargo, estas proteínas se pueden unir a sitios específicos en moléculas largas de ADN a tasas extremadamente rápidas. Para que esto ocurra, la proteína debe encontrar su objetivo, inicialmente uniéndose a cualquier sitio a lo largo de la cadena de ADN y a continuación trasladarse a un sitio específico mediante procesos intramoleculares (ver Figura 1.3.1). Secuencias no específicas en la molécula del ADN pueden así capturar la proteína y transmitirla a la secuencia específica [20]. Para esto, se han propuesto diversos mecanismos en que la proteína por procesos de difusión facilitada llega a la molécula de ADN, una vez que llega ahí la proteína recorre la cadena de ADN deslizándose sobre ella en 1D. Otra manera sería en 3D, donde la proteína se encuentra en constante unión y des-unión de la cadena de ADN, hasta reconocer el sitio específico donde tenga que empezar a realizar su función. Sin embargo, se ha propuesto que las enzimas no pueden viajar de sitios no específicos a sitios específicos únicamente por pasos en 1D, sino que también deben moverse a través del espacio 3D, y hacer la búsqueda más eficiente [21].

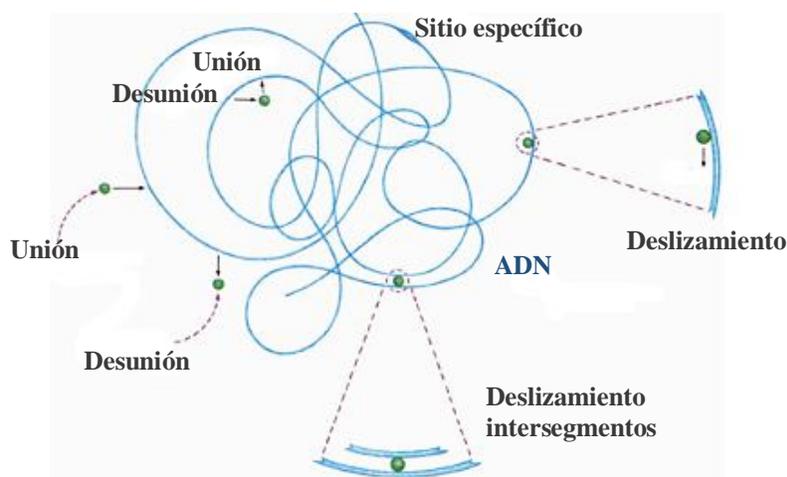


Figura 1.3.1. Representación esquemática de la búsqueda del sitio específico de unión en el ADN por una proteína (círculos verdes). Figura modificada de la referencia [22].

El proceso de reconocimiento que se plantea en la segunda pregunta ha sido extensamente estudiado, pero aún quedan muchas cuestiones por resolver. El reconocimiento de la secuencia específica por la proteína en la molécula de ADN involucra dos mecanismos, el de lectura directa y el de lectura indirecta de la secuencia en el ácido nucleico. Las proteínas pueden reconocer secuencias específicas en el ADN no sólo directamente a través del contacto entre las bases y aminoácidos, sino también indirectamente. Hay por ejemplo, numerosos informes en los que la mutación de una base no en contacto con cualquiera de los aminoácidos, afecta la afinidad de la unión entre ADN y proteína. En ese sentido, las proteínas pueden reconocer una secuencia de ADN a través de contactos mediados por agua, a través de las características conformacionales dependientes de la secuencia específica (por ejemplo, la flexión geométrica de los pares de bases), y / o a través de la distorsión inducida por la unión de la proteína al ADN (flexibilidad) [23]. Por ejemplo, los contactos que se dan entre las proteínas y las bases de los nucleótidos son llamados contactos de lectura directa (lectura de bases) porque dependen directamente de la secuencia en la molécula del ADN. La lectura directa ocurre con mayor frecuencia en el surco mayor de la cadena de ADN, ya que hay mayor especificidad comparada con el surco menor debido al patrón de los donantes y aceptores de enlaces de hidrógeno disponibles. Este reconocimiento puede involucrar uniones puente de hidrógeno directamente desde las cadenas laterales de las proteínas, con el esqueleto del polipéptido, a través de moléculas de agua, o también puede depender de interacciones hidrofóbicas. Anteriormente, se había pensado que las moléculas de agua jugaban un papel significativo en las interacciones ADN-proteína. La mayoría de las moléculas de agua en áreas alrededor de la interface ADN-proteína son liberadas al medio exterior después de haberse formado el complejo ADN-proteína, pero se desconoce en gran medida si el proceso contribuye a la especificidad de la unión. Se ha encontrado en numerosas estructuras cristalinas, que frecuentemente quedan atrapadas moléculas de agua en el área interfacial después de la formación del complejo ADN-proteína. Un análisis exhaustivo de numerosas moléculas de agua presentes dentro de 109 complejos ADN-proteína, han

mostrado que menos de un 2 % de moléculas de agua sirven para unir las cadenas laterales y las bases, mientras que el 76 % se utilizan para estabilizar, ya sea a la proteína o al ADN por separado. La baja frecuencia de las interacciones mediadas por agua y la alta frecuencia de formaciones de enlaces de hidrógeno, ya sea con la proteína o con el ADN, sugiere que el papel principal del agua es solvatar los átomos de la proteína y del ADN en la interface, y no para mediar contactos entre la proteína y el ADN [23].

Inicialmente, basados en estudios de difracción de rayos X realizados en más de 1500 estructuras de complejos de ADN-proteína, se resolvió que el surco mayor de la hélice del ADN ofrece un juego de donadores y aceptores de enlaces de hidrógeno específicos de bases y grupos no polares, que pueden ser reconocidos por un juego complementario de donadores y aceptores presentes en las cadenas laterales de los aminoácidos.

Las proteínas, utilizan un amplio rango de motivos estructurales de unión al ADN como el motivo de homeodominios hélice-giro-hélice (*helix-turn-helix*, HTH) para reconocer al ADN (ver Figura 1.3.2). Muchas proteínas también contienen segmentos flexibles fuera del núcleo globular que intermedian importantes interacciones específicas y no específicas. Sin embargo, no hay una simple correspondencia uno a uno entre el ADN y las secuencias de proteínas. Por lo tanto, la lectura directa por sí misma, puede no ser suficiente para dar cuenta de las características específicas de las interacciones ADN-proteína [24].

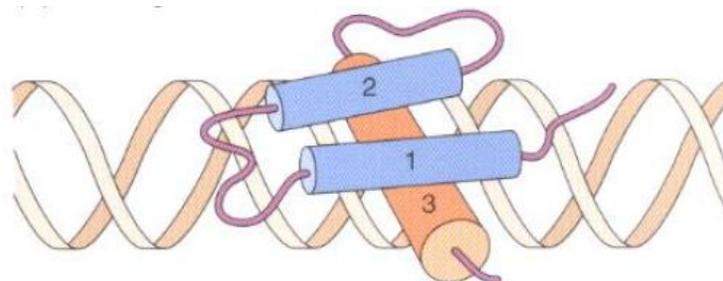


Figura 1.3.2. Representación esquemática del motivo estructural HTH, uno de varios motivos presentes en una gran variedad de proteínas de unión al ADN. La hélice 3 es la que realiza la mayor parte de los contactos con el ADN, mientras que las hélices 1 y 2 se apoyan encima y estabilizan la interacción. Figura adaptada de la referencia [4].

En el reconocimiento por lectura indirecta (lectura de forma, que puede ser local o global), la estructura y flexibilidad del ADN son los que determinan la especificidad y estabilidad del complejo ADN-proteína. Las variaciones en la forma del ADN dependen de las interacciones químicas de cada par de bases, lo que resulta en una única firma conformacional del ADN. La lectura de forma local depende de dos variaciones principales como son surco menor estrecho y torceduras en la cadena de ADN, mientras que la lectura de forma global es cuando el sitio de unión al ADN no se encuentra en la estructura ideal del B-ADN. Ejemplos de estas estructuras son el A-ADN, Z-ADN y el ADN doblado. Sin embargo, para entender completamente el reconocimiento entre ADN y proteína, debe tenerse en cuenta la estructura tridimensional de ambas moléculas [24].

En estudios previos realizados con AFM, se ha propuesto que algunas proteínas (en particular proteínas reparadoras de daños en ADN) recorren la molécula de ADN doblándolo hasta encontrar un cambio en la flexibilidad y así poder comenzar su función. En este tipo de estudios se ha mostrado de manera directa que la proteína es capaz de doblar sitios a lo largo de la cadena de ADN. En la Figura 1.3.3 podemos observar imágenes de AFM donde se presentan este tipo de doblamientos sobre las cadenas de ADN [25].

Aunque se conoce la estructura de muchos complejos de ADN-proteína, el mecanismo de unión y reconocimiento no ha sido establecido del todo, por lo que se continúa investigando cuales son los mecanismos que rigen la naturaleza de estas interacciones. En nuestro caso nos interesa estudiar el mecanismo de reconocimiento de una proteína reparadora de ADN, la Uracilo-ADN glicosilasa (UDG), utilizando la técnica de AFM. En particular es importante saber si el mecanismo propuesto de reconocimiento por medio de deformación del ADN ocurre en esta proteína.

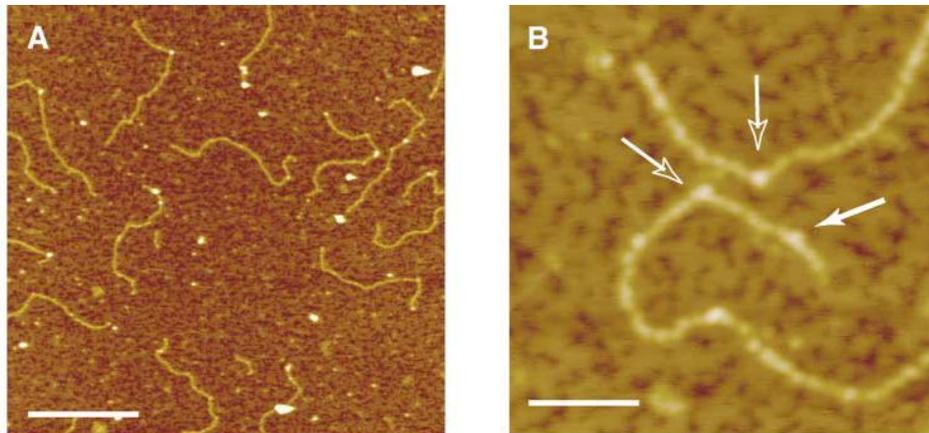


Figura 1.3.3. (A y B) Imágenes de AFM usando modo *tapping* en aire, de proteína hOGG1 unida a fragmentos de ADN de 1234 pb depositados sobre mica. En B) se pueden observar sitios de doblamiento sobre las cadenas de ADN debidos a la unión de la proteína. Escala de la barra: A) 250 nm y B) 50 nm. Figura adaptada de la referencia [25].

1.4. Objetivos de la Tesis

El objetivo de la Tesis es la visualización de moléculas de ADN y el estudio de la formación de complejos de ADN con una proteína reparadora de ADN utilizando la técnica de Microscopía de Fuerza Atómica (AFM). Para lograrlo nos planteamos 3 objetivos particulares:

1. Revisar dos modos básicos de operación del AFM disponible en el LINAN: modo de contacto y modo *tapping*.
2. Establecer un protocolo óptimo para la visualización de moléculas de ADN de dos tipos: lineal y circular.
3. Establecer un protocolo óptimo para visualizar la interacción de la proteína Uracilo-ADN glicosilasa con moléculas lineales de ADN y observar si el reconocimiento del sitio de unión se lleva a cabo por deformación del ADN.

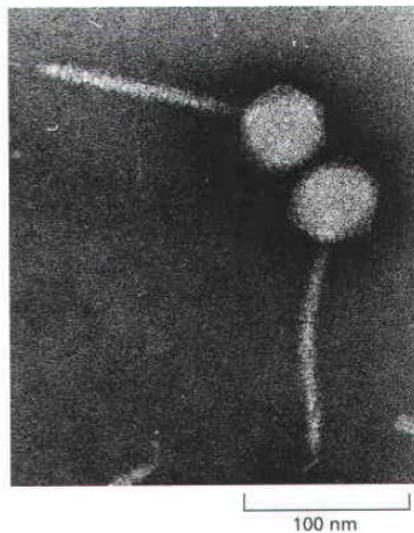
CAPÍTULO 2

ADN LINEAL, ADN CIRCULAR Y PROTEÍNA UDG

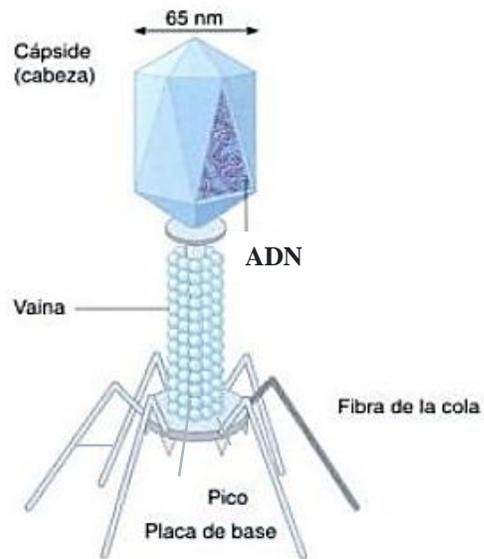
En este Capítulo se presentan conceptos básicos y una descripción sobre las principales moléculas a estudiar en la presente tesis, como son: el Lambda ADN, el plásmido pCA1 y la proteína UDG. Además, se describe la función de la proteína UDG, así como también algunos posibles mecanismos de reconocimiento de la UDG por la molécula de ADN.

2.1. ADN lineal: Lambda ADN

El fago Lambda es un virus complejo (bacteriófago o fago, ver Figura 2.1.1a) que pertenece a la familia *Siphoviridae*. El bacteriófago Lambda tiene como material genético una molécula de ADN lineal bicatenario (Lambda ADN) de aproximadamente 48,000 pares de bases (pb) [26]. Este bacteriófago está compuesto por una cabeza icosaédrica (en donde se encuentra el material genético) que está formada por dos proteínas, la gpE y la gpD, y una cola delgada y flexible compuesta principalmente por una proteína denominada gpV [27]. En la Figura 2.1.1b se pueden observar los principales componentes de un bacteriófago. El fago lambda después de infectar una célula de *E. coli*, se replica para producir enormes cantidades de virus infecciosos, que finalmente, rompen las células bacterianas (lisis) liberando alrededor de un millón de bacteriófagos. Sin embargo, el fago lambda tiene ambas alternativas en su ciclo de vida, puede escoger entre la vía lítica y la vía lisogénica [26].



a)



b)

Figura 2.1.1. a) Micrografía electrónica del fago lambda. Figura adaptada de la referencia [3] y b) Principales componentes de un bacteriófago. Figura adaptada de la referencia [28].

In vitro se puede obtener el material genético de este virus a partir de la infección en células *E. coli*. Para el desarrollo de la presente tesis se compró un Lambda ADN (λ ADN) de Invitrogen, el cual ya viene totalmente purificado. El λ ADN mide 48,502 pb, su peso molecular es de 32×10^6 Da y su concentración es de 600 ng/ μ L. El λ ADN de fue almacenado a 4°C para su posterior análisis.

2.2. ADN circular: Plásmidos

Los plásmidos son moléculas circulares de ADN de doble cadena o de cadena sencilla que se encuentran naturalmente en varias especies de bacterias, como la *E. coli* (ver Figura 2.2.1). Estos elementos genéticos son extracromosomales, se replican de manera independiente del cromosoma bacteriano y codifican para una gran variedad de enzimas que confieren resistencia a antibióticos y metales pesados, degradan complejos orgánicos y/o producen toxinas, etc. Dadas estas características, los plásmidos han sido empleados como vectores o vehículos de

clonación de moléculas de ADN foráneas que permiten el transporte y manipulación del mismo.

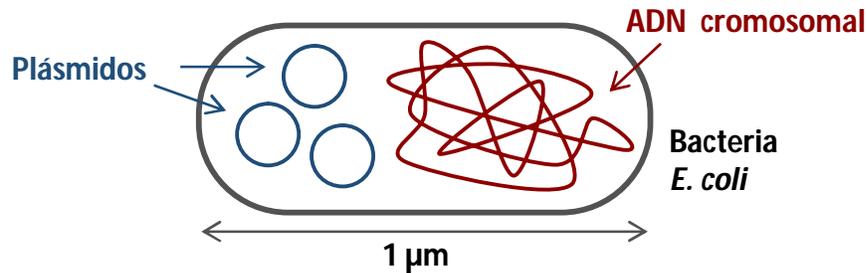


Figura 2.2.1. Plásmidos presentes en una bacteria de *E. coli*.

Entre las propiedades de los plásmidos que favorecen su utilización como vector de clonación se incluyen:

1. Su pequeño tamaño (generalmente de 5,000 pb a diferencia del ADN cromosomal del orden de 4,000,000 pb) hace que el ADN sea fácil de aislar y manipular.
2. Su naturaleza circular hace que el ADN sea más estable durante la extracción.
3. Su origen de replicación es independiente del control directo de la replicación del cromosoma bacteriano.
4. Se aumenta de manera eficiente la extracción del ADN plasmídico debido a su múltiple número de copias.
5. La presencia de marcadores seleccionables, como genes de resistencia a antibióticos, hace más fácil la detección y selección de las bacterias que contienen plásmidos.

En cuanto a la estructura modular, todo plásmido comprende básicamente las siguientes características:

1. Un origen de replicación autónomo que permita un alto número de copias por bacteria.
2. Genes de resistencia a antibióticos.
3. Marcadores de selección.

4. Un sitio múltiple de clonación, caracterizado por la presencia de sitios únicos para enzimas de restricción, no encontrados en ninguna otra región del plásmido [29].

2.2.1. Plásmido pCA1

El plásmido pCA1 utilizado en la presente tesis, es un plásmido que codifica para una proteína que es la cinesina dimérica, la cual está conformada por un total de 401 aminoácidos. El tamaño del plásmido pCA1 es de 3,683 pb y fue obtenido a partir de células *E. coli* ya transformadas con el plásmido de interés (pCA1) [30]. Estas células *E. coli* ya transformadas fueron cultivadas para su posterior lisis y extracción del ADN plasmídico siguiendo el protocolo Maxiprep, el cual se describe con detalle en el Capítulo 3.

La concentración y pureza del ADN fue determinada por medio de un espectrofotómetro de UV-Vis (Nanodrop). Las muestras del plásmido purificado se guardaron a -20°C para su posterior análisis.

2.3. Proteína Uracilo-ADN glicosilasa

La ADN glicosilasa es una familia de enzimas que reconoce formas específicas de bases dañadas en la molécula de ADN, como la hipoxantina causada por la desaminación de la adenina, uracilo por la desaminación de la citosina, dímeros de pirimidina, purinas alquiladas y bases dañadas por la constante exposición del ADN a diversos factores como son la oxidación o radiación ionizante, productos químicos etc. [4].

El uracilo puede surgir en el ADN por incorporaciones ocasionales en lugar de una timina durante la síntesis del ADN y también por desaminación de la citosina. Ya que el uracilo no forma parte del ADN, esta mutación puede ser detectada y reparada por escisión de bases. La Uracilo-ADN glicosilasa (UDG) es una proteína monomérica que está involucrada en el mecanismo de reparación por escisión de bases en moléculas de ADN que contienen uracilos. La escisión del uracilo del

ADN es catalizada por la ADN glicosilasa rompiendo el enlace glucosídico que une la pentosa con la base (ver Figura 2.3.1). Esta reacción produce un uracilo libre y un sitio apirimidínico (un azúcar sin base llamado sitio AP). Estos sitios son reparados por la AP endonucleasa, que rompe de forma adyacente al sitio AP. La desoxirribosa restante por tanto se elimina, y el espacio de una sola base resultante es rellenado por la ADN polimerasa y la ligasa [4].

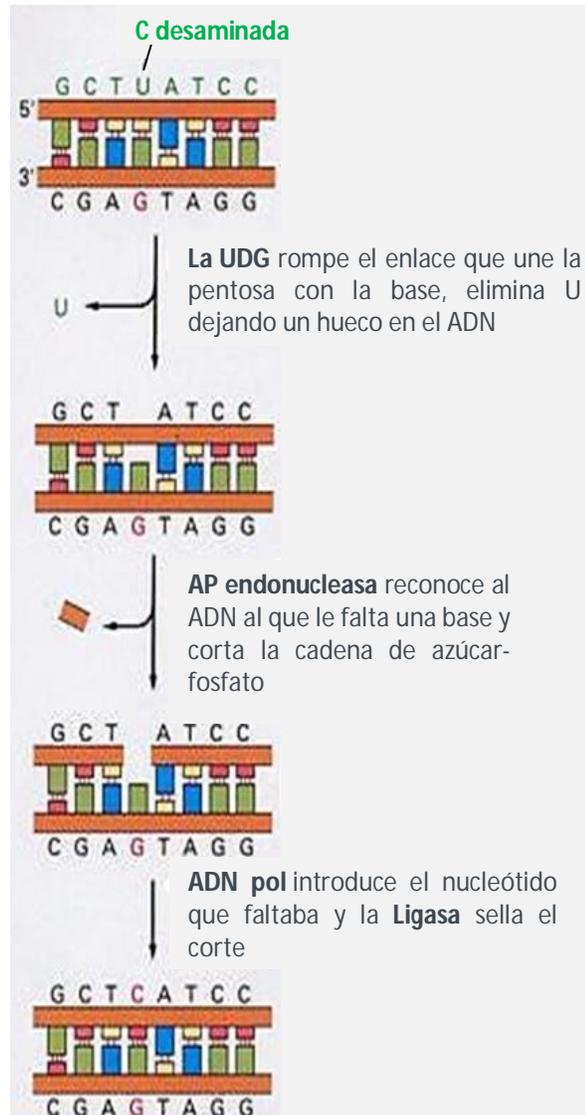


Figura 2.3.1. Mecanismo de reparación por escisión de bases. Figura modificada de la referencia [3].

Recientemente se han realizado estudios para estudiar el mecanismo de reconocimiento del ADN por la UDG a nivel molecular. Estudios dinámicos y estructurales de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) han establecido que la enzima Uracilo-ADN glicosilasa detecta el uracilo en la doble cadena de ADN por la captura de la base a medida que emerge parcialmente de la cadena debido a movimientos térmicos respiratorios del ADN [31]. Se ha sugerido que algunas glicosilasas probablemente detectan nucleótidos dañados específicos a través del surco menor del ADN por un mecanismo de exploración procesivo, que implica la unión al surco menor, compresión del esqueleto de azúcar-fosfato y torsión del ADN [32]. Estudios estructurales han revelado que la proteína UDG tiene un sitio activo altamente específico para el uracilo. Esto evita que la proteína escinda cualquier otra base normal presente en el ADN. La enzima se une al uracilo volteando el nucleótido y sacándolo de la doble hélice y en el sitio activo a través del surco mayor del ADN. Un bucle de leucina bien conservado en la superficie de la enzima interactúa con el surco menor del ADN. La leucina altamente conservada se intercala en el espacio vacío en la hélice una vez que el uracilo se ha jalado hacia afuera. Se ha sugerido que la compresión en el esqueleto del ADN (la cual esta mediada por bucles bien conservados en enzimas) es la responsable de jalar hacia el exterior el nucleótido que contiene uracilo [33].

Parte del mecanismo de reconocimiento ADN-proteína implica conocer la forma por medio de la cual la proteína se transporta hasta el sitio de unión. Se ha reportado que para la proteína UDG el tiempo de residencia es de aproximadamente $T_R = 5$ ms en cadenas no dañadas de ADN. Esto quiere decir que una vez que la proteína UDG se encuentra con una cadena de ADN, inicia su búsqueda recorriendo el ADN durante un tiempo (T_R) de 5 ms antes de desprenderse [34]. Estas proteínas poseen una débil afinidad micromolar a cadenas de ADN que carecen de bases dañadas específicamente. Para identificar sitios dañados en la molécula del ADN, la proteína puede asistirse de un fenómeno llamado difusión facilitada, y para proteínas monoméricas con un solo sitio de unión al ADN, puede ocurrir por dos vías generales. La primera ruta implica que la proteína se deslice a lo largo del esqueleto de azúcar-fosfato del

ADN, lo cual sirve para reducir la búsqueda tridimensional y procesarla en una sola dimensión a lo largo del contorno lineal del ADN. Debido a que la difusión en 1D es un proceso que está impulsado térmicamente, cada paso que la proteína realiza a lo largo del contorno del ADN tiene la misma probabilidad de estar dirigiéndose en la dirección hacia algún sitio de lesión, o lo contrario, en la dirección opuesta alejándose de los daños [34].

Por lo tanto, una propiedad distintiva del deslizamiento en 1D es que la probabilidad de una proteína de llegar a un sitio específico después de salir de una posición definida en el contorno del ADN, disminuye en proporción al cuadrado del número de pasos de pares de bases entre el sitio inicial y dañado (n^2). Esta propiedad de deslizamiento en 1D hace que sea un proceso extremadamente lento y altamente redundante para la búsqueda de sitios dañados en largos tramos a lo largo de la cadena de ADN, pero es ideal para secuencias de barrido locales. La segunda vía consiste en facilitar saltos intramoleculares a lo largo de la cadena del ADN. Este mecanismo sirve para reducir el volumen del proceso de búsqueda, pero en contraste con la vía de 1D, la probabilidad de que la proteína se encuentre con un sitio dañado después de salir de una posición determinada en el ADN disminuye con la inversa de la distancia entre los sitios iniciales y dañado ($1/r$). La vía de saltos es más eficiente que la de deslizarse sobre largas distancias, ya que no involucra la búsqueda repetitiva en la misma secuencia del ADN. Las enzimas por lo tanto no pueden viajar de sitios no específicos a sitios específicos únicamente por pasos en 1D, en su lugar deben moverse a través del espacio 3D. Experimentos recientes con una ADN glicosilasa indican que estos mecanismos de transporte se encuentran presentes en el proceso de búsqueda del sitio específico [34].

Para el desarrollo experimental de la tesis, se utilizó una proteína de Bio Labs totalmente purificada de *Archaeoglobus fulgidus* (Afu UDG) clonada y sobre-expresada en células *E. coli*, la cual se guardó a -20°C . El peso molecular de la proteína es de 22,717 Da y la concentración del vial original (*stock*) es de 20.8 ng/ μL .

CAPÍTULO 3

MÉTODO EXPERIMENTAL

En este Capítulo se describe el protocolo utilizado en la extracción del plásmido pCA1, las principales técnicas experimentales utilizadas, así como los protocolos de preparación de muestras para AFM, tanto para las esferas de poliestireno como para el plásmido pCA1, λ ADN y la proteína UDG.

Para la deposición de moléculas biológicas sobre el sustrato se utilizaron 2 métodos: método de deposición convencional (la muestra se seca con aire comprimido) y el método de *spin-coating* (la muestra se hace girar a una cierta velocidad, obteniendo una muestra seca al final).

3.1. Protocolo de extracción de ADN plasmídico Maxiprep

Para la obtención del ADN plasmídico pCA1 se siguió el protocolo Maxiprep, el cual permite obtener grandes concentraciones de ADN (> 500 μ g) a diferencia del protocolo Miniprep (del orden de 100 μ g) [35].

Los pasos del protocolo son los siguientes (las soluciones I, II y III se incluyen en el *kit*):

1. Inocular en 200 mL de medio LB con antibiótico una colonia bacteriana.
2. Centrifugar el cultivo en botellas *sorvall* a 6,000 rpm durante 10 min.
3. Eliminar el sobrenadante y resuspender en solución I con agitación utilizando vortex.
4. Agregar 10 mL de la solución II y mezclar por inversión.
5. Incubar 5 min a temperatura ambiente.

6. Adicionar 7.5 mL de la solución III y mezclar por inversión.
7. Incubar en hielo 10 min.
8. Centrifugar a 10,000 rpm durante 10 min.
9. Transferir el sobrenadante a tubos *sorvall* estériles.
10. Agregar 18 mL de isopropanol frío (4°C).
11. Reposar 20 min en hielo.
12. Centrifugar a 10,000 rpm durante 20 min y eliminar el sobrenadante.
13. Lavar con etanol al 70%.
14. Centrifugar a 10,000 rpm durante 5 min.
15. Eliminar el sobrenadante.
16. Resuspender en Buffer TE, pH 8. Pasar a tubos *ependorf*.
17. Adicionar 1 vol de fenol, mezclar con vortex.
18. Centrifugar a 13,000 rpm durante 3 min.
19. Transferir la fase superior a un tubo nuevo.
20. Agregar 1 volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y mezclar en vortex.
21. Centrifugar a 13,000 rpm durante 3 min.
22. Transferir la fase superior a tubos nuevos y agregar 10 µL de RNasa 10 mg/mL e incubar por 30 min a temperatura ambiente.
23. Agregar 1/10 de acetato de sodio a 3 M y 2 volumen de etanol absoluto.
24. Incubar en hielo 15 min.
25. Centrifugar a 13,000 rpm durante 10 min.
26. Lavar la pastilla con etanol al 70%.
27. Centrifugar a 13,000 rpm durante 3 min y tirar el sobrenadante.
28. Resuspender en 300-500 µL de buffer TE, pH 8.
29. Posteriormente purificar el plásmido por columna utilizando un *kit clean-up* [36].

3.2. Técnicas experimentales

3.2.1. *Spin-Coating*

La técnica de *spin-coating* constituye una de las formas más simples y utilizadas para preparar películas delgadas (<10 nm de espesor) sobre sustratos planos. Se emplea generalmente cuando el material a depositar es de naturaleza polimérica y no puede ser depositado mediante evaporación térmica sin evitar su descomposición [37].

Esta técnica de fabricación de películas delgadas conduce a la obtención de recubrimientos bastante uniformes, planos y de alta calidad. No obstante, pueden surgir en la película inhomogeneidades, esto debido a posibles causas como el uso de soluciones de partida demasiado complejas o que contengan impurezas.

El proceso de *spin-coating* (ver Figura 3.2.1.1) se puede resumir en 4 etapas:

1. Se deposita un cierto volumen de la solución a ser depositada sobre un sustrato limpio e inmovilizado, cubriendo toda la superficie. La cantidad de material que aporta este volumen está en exceso en relación a la cantidad que finalmente formará la película.
2. El sustrato se acelera hasta alcanzar la velocidad de rotación final deseada. Debido a la fuerza centrífuga generada en el movimiento rotatorio, la solución se esparce sobre toda la superficie del sustrato y parte de ésta es expulsada.
3. El sustrato gira a velocidad constante produciendo un adelgazamiento gradual del fluido, generalmente uniforme sobre toda la superficie. El espesor final de la película va a estar en función de diversos factores como son la tensión superficial y viscosidad del fluido, la velocidad de rotación, etc.
4. El soporte continúa girando a velocidad constante haciendo que el disolvente se evapore [38].

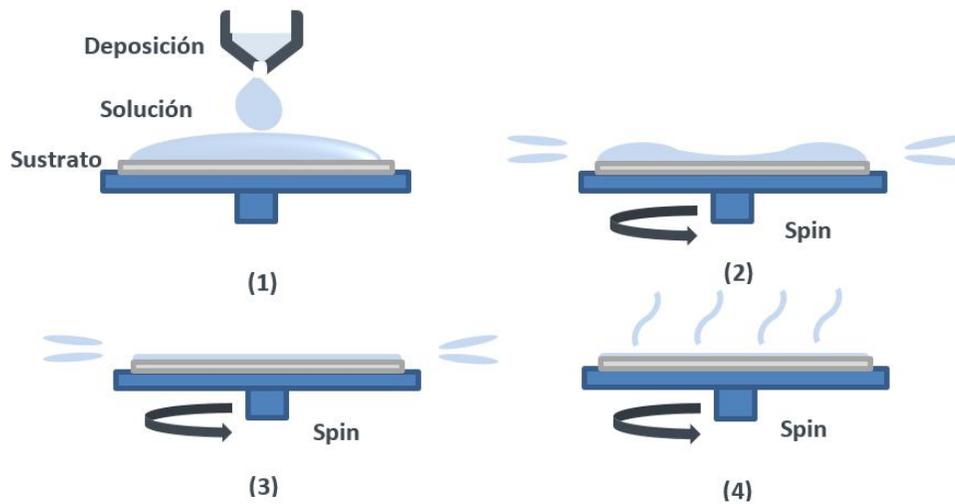


Figura 3.2.1.1. Principales etapas del proceso de deposición de películas delgadas mediante la técnica de *spin-coating*.

En este trabajo de tesis, se utilizó la técnica de *spin-coating* para la deposición de ADN y proteína sobre mica. Normalmente, en la deposición por *spin-coating* se emplea un equipo especializado en la técnica en donde es posible controlar parámetros tales como la velocidad de rotación, la temperatura, condiciones de humedad, entre otras. Desafortunadamente, en el IPICYT no se cuenta con este equipo. Debido a esto se implementó una alternativa económica para lograr la deposición. Se utilizó un taladro de mano DREMEL 300 (ver Figura 3.2.1.2) con el porta brocas hacia arriba. En lugar de una broca se utilizó una plataforma plana que se fijó al porta brocas. Sobre la plataforma se colocó la muestra fijándola con cinta adhesiva. La velocidad utilizada fue de aproximadamente 8,000 rpm la cual se ajustó con un variac, el cual regula el voltaje de alimentación del DREMEL.

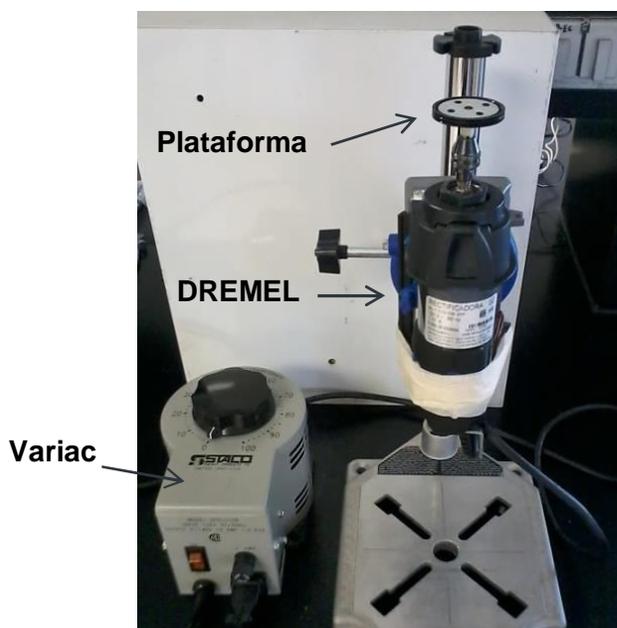


Figura 3.2.1.2. Fotografía del equipo DREMEL 300 ubicado en el laboratorio de Nanoestructuras I del IPICYT.

3.2.2. Microscopía de Fuerza Atómica

El microscopio de barrido por sonda, por sus siglas en inglés SPM (Scanning Probe Microscopes), se define como un grupo de instrumentos usados para obtener imágenes con resolución atómica y medir las propiedades del material de interés, en superficies químicas y biológicas. Las imágenes en SPM se obtienen por las interacciones de la punta con la superficie de la muestra. Estas interacciones modifican propiedades físicas en la punta las cuales son registradas y se utilizan para reconstruir una imagen. Las dos formas primarias del SPM son Microscopía de Tunelamiento (STM) y Microscopía de Fuerza Atómica (AFM).

El STM fue introducido por Gerd Binnig y Heinrich Rohrer en el año de 1982 en los laboratorios de la IBM en Zurich [39]. Binnig y Rohrer encontraron una manera de visualizar imágenes de la estructura de superficies a resolución atómica. Lo que usaron fueron elementos piezoeléctricos para mover una punta muy aguda (en la cual idealmente se tiene un solo átomo en la punta) a una pequeña distancia (0.4-0.7 nm) sobre la superficie. Un potencial de retroalimentación existe entre la punta y la muestra. Debido a esto, los electrones pueden experimentar el

efecto túnel de la superficie de la muestra a la punta y una imagen de la topografía de la muestra puede ser construida por medio de la detección de esta corriente de tunelamiento. Dos modos de operación son posibles: corriente constante y altura constante [40]. Esta técnica es conocida como Microscopía de Tunelamiento (STM), invención por la cual Binnig y Rohrer obtuvieron el premio Nobel en física en el año de 1986. Aunque ésta técnica es muy eficiente y se puede obtener una resolución atómica, su desventaja es que solo puede caracterizar muestras que sean conductoras eléctricamente [41].

En 1986 Gerd Binnig y Christoph Gerber de la IBM y Calvin Quate de la Universidad de Stanford desarrollaron el primer Microscopio de Fuerza Atómica, en el cual es posible analizar muestras que no sean conductoras eléctricamente [15]. Desde su aparición en los años 80, el AFM ha sido un equipo importante para la elucidación de la nanoestructura de materiales. Basado en la interacción local entre la punta y la superficie de una muestra, proporciona imágenes tridimensionales de superficies con alta resolución espacial en tiempo real. Debido a esto, el AFM es utilizado en la caracterización de materiales para determinar sus propiedades físicas.

Un equipo de AFM típicamente consta de 3 partes principales: cabezal, scanner y base. En el cabezal se encuentran varios instrumentos ópticos: un láser, un fotodiodo y dos espejos. Uno de los espejos refleja el láser para que llegue a la punta, y el otro espejo para direccionar al láser al centro del fotodiodo, el cual detecta deflexiones en el cantilever debido a las interacciones (atractivas o repulsivas) de la punta con la muestra. La señal eléctrica proporcionada por el fotodiodo es utilizada tanto para construir la imagen como para determinar fuerzas de interacción [42]. En la Figura 3.2.2.1 podemos observar los principales componentes de un AFM.

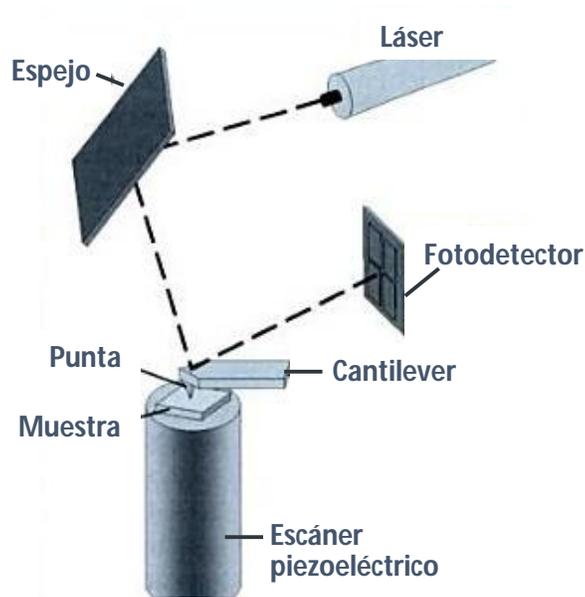


Figura 3.2.2.1. Principales componentes de un AFM. Figura modificada de la referencia [43].

El AFM monitorea la superficie de la muestra con una punta con radio de curvatura generalmente menor a 10 nm que se localiza al final de un cantilever, de 100 a 200 micras de longitud (ver Figura 3.2.2.2). Las fuerzas de interacción entre los átomos de la punta y la muestra (como fuerzas electrostáticas, van der Waals, interacciones dipolo-dipolo) provocan la deflexión del cantilever, simultáneamente un detector mide esta deflexión a medida que la punta se desplaza sobre la superficie de la muestra generando una micrografía de la superficie [42].

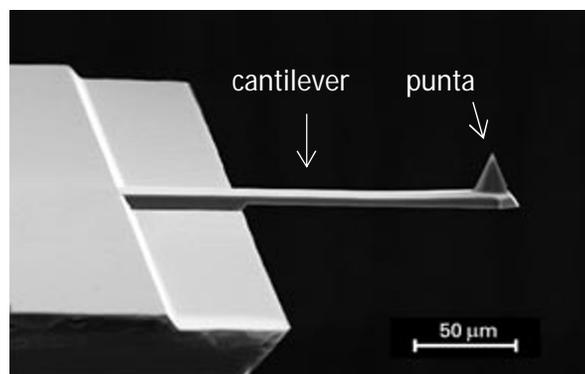


Figura 3.2.2.2. Imagen SEM de uno de los tipos de puntas utilizadas para el escaneo de muestras en AFM. Figura adaptada de la referencia [44].

El Microscopio de Fuerza Atómica utiliza múltiples modos de operación de acuerdo a las características físicas de la muestra y de las propiedades a medir.

- ❖ Modo de Contacto: Mide la topografía de la muestra deslizando la punta (en contacto permanente) sobre la superficie de la muestra.
- ❖ Modo *Tapping*: Este modo de operación es utilizado para analizar muestras cuyo estudio en el modo de contacto resulta problemático. En este modo la punta no está en contacto continuo con la superficie de la muestra sino en contacto intermitente o discreto. De esta manera se reduce la interacción entre la punta y la muestra, por lo tanto es ideal para analizar materiales blandos.

Existen otros modos de operación de los SPM, de los cuales los más utilizados son:

- ❖ Modo Imagen de Fase: Proporciona una imagen contrastada generada por las diferencias de adhesión en la superficie de la muestra o diferencias en las características mecánicas en la superficie de las muestras.
- ❖ Modo de No Contacto: Mide la topografía de acuerdo a las fuerzas de van der Waals que existen entre la superficie de la muestra y la punta.
- ❖ Fuerza Magnética: Mide el gradiente de fuerza magnética sobre la superficie de la muestra.
- ❖ Fuerza Eléctrica: Mide el gradiente de fuerza eléctrica sobre la superficie de la muestra.
- ❖ Potencial de Superficie: Mide el gradiente de campo eléctrico generado por distintos átomos en la superficie de muestra.
- ❖ Fuerza Lateral: Mide la fuerza de fricción entre la punta y la superficie de las muestras.
- ❖ Microscopía de Tunelamiento: Mide la topografía de superficie de la muestra utilizando la corriente de tunelamiento.
- ❖ Microscopía Electroquímica: Mide la estructura de la superficie y las propiedades de los materiales conductores inmersos en soluciones electrolíticas.

- ❖ Litografía: Se emplea una punta especial para grabar información sobre la superficie de una muestra [45].

Con el AFM se obtiene no solamente información espacial lateral (x-y) sino también información espacial vertical (z), generando así imágenes tridimensionales (3D) de la superficie de la muestra. Dependiendo del tipo de muestra analizada, se pueden obtener resoluciones para x-y que van en el rango de 0.1 - 1 nm y en la dirección z de 0.01 nm [39]. El concepto de resolución del AFM es diferente a la de microscopios basados en algún tipo de radiación. Recordemos que la resolución de un instrumento es la separación mínima detectable entre dos objetos próximos. Existe una distinción importante entre imágenes obtenidas mediante ondas y las obtenidas mediante técnicas de barrido con una sonda (punta). La primera está limitada por efectos de difracción y las últimas principalmente por la geometría de la sonda y de la muestra. Tanto la altura de la muestra y la geometría de la punta pueden afectar la capacidad de resolución como se muestra en la Figura 3.2.2.3 [46].

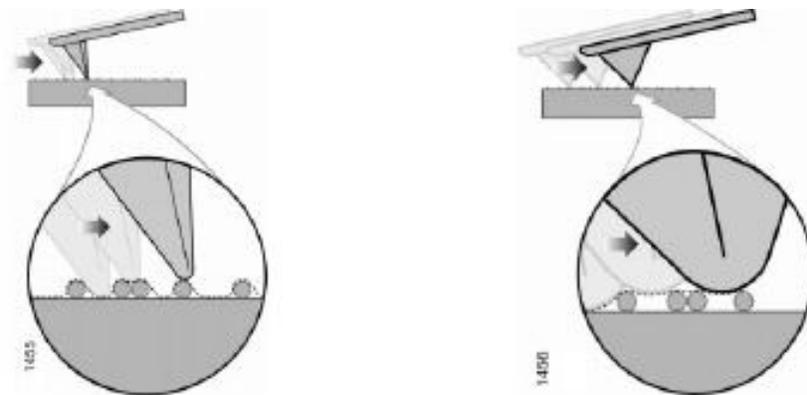


Figura 3.2.2.3. Efecto de la geometría de la punta en la resolución de un AFM. Figura adaptada de la referencia [45].

Al igual que cualquier otra técnica, la microscopía de AFM tiene sus ventajas y sus limitaciones. Algunas de las ventajas del AFM son las siguientes:

1. Se pueden analizar muestras en aire y en líquido, lo que hace posible analizar muestras biológicas en ambientes fisiológicos.

2. Comparado con microscopía electrónica de barrido (SEM), se puede obtener un mayor contraste topográfico, se pueden hacer mediciones directas de alturas y no es necesario ningún tipo de recubrimiento o tratamientos especiales que puedan resultar en la destrucción o alteración de la muestra [47].
3. Comparado con microscopía electrónica de transmisión (TEM), provee imágenes tridimensionales, además de que no es necesario preparaciones laboriosas para las muestras ni tratamientos especiales [47].

Algunas de las desventajas del AFM:

1. La mayor desventaja del AFM comparado con el microscopio electrónico, es un área de visualización limitada. El microscopio electrónico puede mostrar un área de escaneo del orden de mm^2 y una profundidad de campo del orden de mm. El AFM sólo puede registrar rugosidades de la muestra menores a unos pocos micrómetros y un área máxima de visualización de alrededor de $125 \mu\text{m} \times 125 \mu\text{m}$, dependiendo del tipo de escáner utilizado.
2. Velocidades de escaneo lentas (del orden de minutos por imagen).
3. Posibles formaciones de artefactos debidos a la geometría de la punta, vibraciones mecánicas y acústicas, histéresis del piezoeléctrico etc. [47].

Las imágenes de AFM que se presentan en este estudio fueron obtenidas utilizando un microscopio JEOL JSPM-5200 (disponible en el LINAN, IPICYT) equipado con el escáner estándar STD, utilizando el modo de operación *tapping* en aire y a temperatura ambiente. Para el escaneo de las muestras se usaron puntas de silicio (MikroMasch, NSC14/AIBS) con un radio de curvatura $< 10 \text{ nm}$, constante elástica y frecuencia de resonancia típica de 5.7 N/m y 160 kHz respectivamente.

En la imagen de la Figura 3.2.2.4 se muestra el Microscopio de Fuerza Atómica utilizado durante el desarrollo del presente trabajo.



Figura 3.2.2.4. Fotografía del Microscopio de Fuerza Atómica JEOL JSPM-5200 disponible en el Laboratorio Nacional de Investigaciones en Nanociencias y Nanotecnología (LINAN) del IPICYT.

3.2.2.1. Guía rápida de operación del equipo Jeol JSPM-5200

A continuación mostramos una serie de pasos que sirven como guía rápida para operar el equipo de AFM disponible en el LINAN, de manera básica en dos modos de operación, como son el modo de *Tapping* y el modo de Contacto.

Modo de *Tapping*

1. Colocar la muestra en la parte correspondiente sobre el escáner y el *tip-holder* con la punta correspondiente en el cabezal, en la Figura 3.2.2.1.1 se pueden ubicar las principales partes en el AFM.

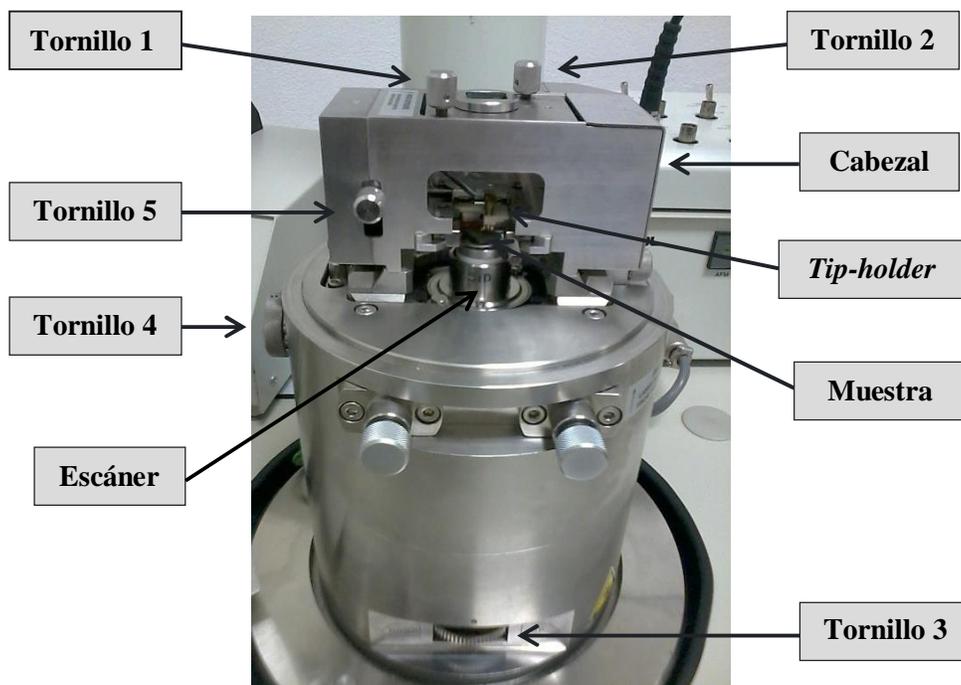


Figura 3.2.2.1.1. Partes principales del microscopio Jeol JSPM-5200 utilizado en esta tesis.

2. Encender la consola, después encender el láser que se encuentra en la caja de AFM AMP y dejar calentar durante 20 min; mientras tanto encender el CPU y el monitor de la computadora.
3. Colocar la perilla de la caja AMP en SUM, posteriormente posicionar el láser sobre la punta del cantiléver ajustando los 2 tornillos que se encuentran arriba del cabezal (tornillo 1 y tornillo 2 de la Figura 3.2.2.1.1), de modo tal que el valor desplegado en la caja del amplificador sea el valor negativo más alto posible. Al final de la alineación, el láser debe quedar como se muestra en la figura 3.2.2.1.2.



Figura 3.2.2.1.2. Luz del láser posicionado sobre la punta después de ser alineada.

4. Aproximar manualmente la punta sobre la superficie de la muestra lo más cerca posible (aprox. 2 mm) girando el tornillo 3 (ver Figura 3.2.2.1.1) que se encuentra en la base del microscopio. Tener cuidado de no colisionar la punta con la superficie de la muestra ya que se corre el riesgo de romper la punta.
5. Abrir el programa WinSPM (*Scanning*), dar click en *SPM Scan*, después click en *Reset SPM* y finalmente *OK*. Este paso es necesario para inicializar todos los parámetros a una configuración inicial)
6. *Click* en *SPM Scan*, después en *Scan*, y luego en *AC Mode*. Ajustar la posición en z a que se encuentre lo más cercana a cero posible. Acomodar los parámetros de Tamaño de Escaneo, Velocidad, Filtro y *Loop Gain* (no son los mismos para todas las muestras).
7. Después *click* en *Adjust PD* y ajustar con los tornillos lateral y del frente del cabezal (tornillo 4 y 5 de la Figura 3.2.2.1.1) para que el círculo rojo que se despliega en la pantalla negra quede en el centro del recuadro azul (ver Figura 3.2.2.1.3).

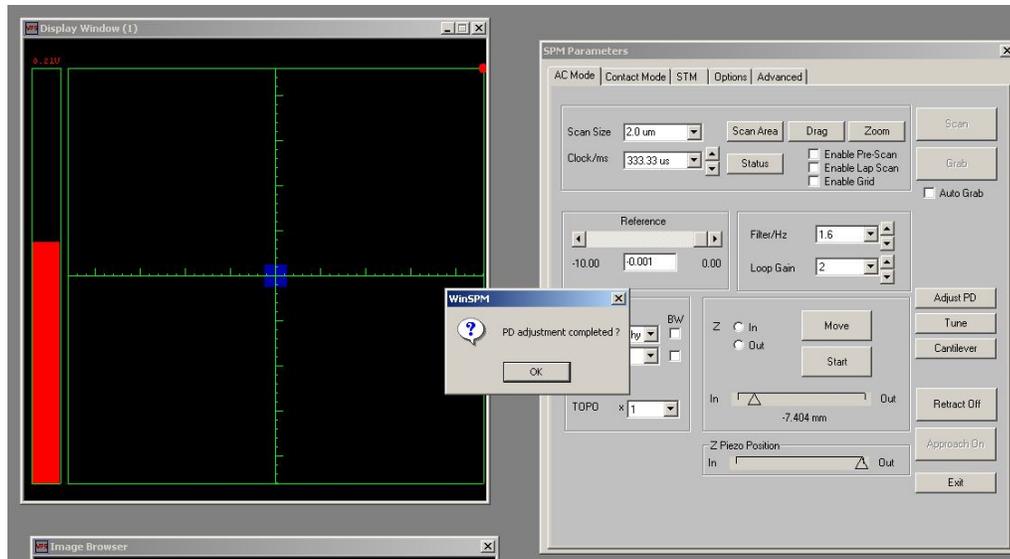


Figura 3.2.2.1.3. Pantallas para el ajuste del láser en el centro del fotodetector en el modo *tapping*.

8. *Click* en *Tune* (se obtiene la frecuencia de resonancia de la punta, parámetro necesario para el instrumento), después en *Retract Off* (necesario para habilitar el botón de *Approach On*), luego *Approach On* (la punta se aproxima a la superficie de la muestra) y finalmente en *Scan* (se obtiene la imagen).

Modo de Contacto

Seguir los pasos 1 a 5 de la misma manera que en el modo de *tapping*, pero en el paso 6 dar *click* en *SPM Scan*, después en *Scan* y luego en *Contact Mode*. Checar igualmente la posición en z y ajustar los parámetros de Tamaño de Escaneo, Velocidad, Filtro y *Loop Gain*. *Click* en *Adjust PD* y ajustar con los tornillos 4 y 5 de la Figura 3.2.2.1.1 a que el círculo rojo que se despliega en la pantalla negra quede en el centro del recuadro azul (ver Figura 3.2.2.1.4), *click* en *Retract Off*, después *Approach On* y finalmente *Scan*.

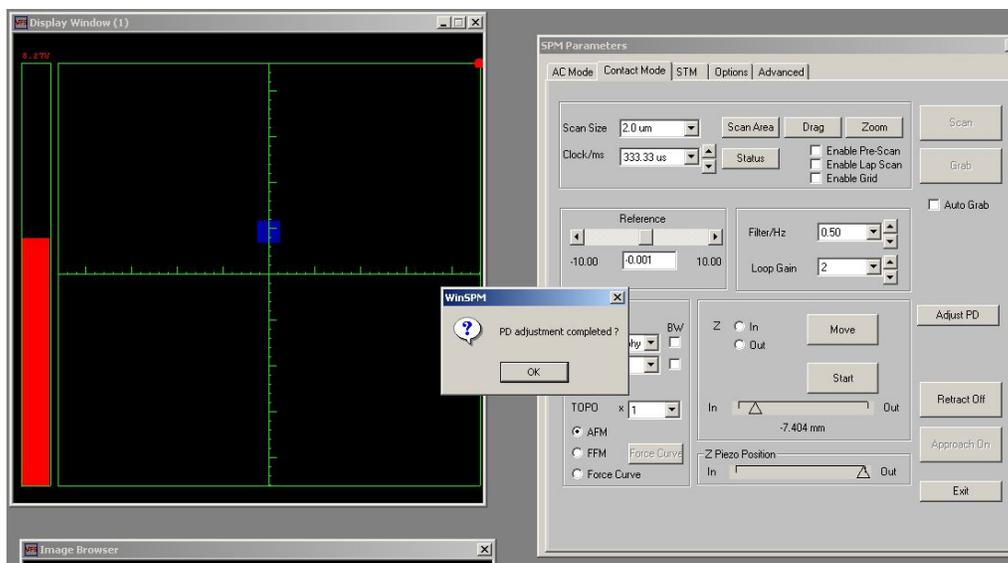


Figura 3.2.2.1.4. Pantallas para el ajuste del láser en el centro del fotodetector en el modo de contacto.

3.3. Protocolos de preparación de muestras para AFM

3.3.1. Modificación de mica con APTES (AP-mica)

La modificación de la superficie de la mica se llevó a cabo con APTES (3-Aminopropiltriethoxisilano). El APTES se utiliza generalmente para silanizar superficies de distintos materiales como mica, vidrio, óxidos metálicos etc. Con este procedimiento se obtienen recubrimientos de superficies a través del auto-ensamble con moléculas de alcoxisilano organofuncionales, obteniendo superficies con grupos amino expuestos [48].

El uso de APTES para la modificación de mica se realizó utilizando dos métodos distintos (todo se realizó en campana de extracción):

1. Modificación directa por solución:

Se preparó una solución de 0.1% v/v de APTES (Sigma Aldrich) en agua Milli Q. Aproximadamente 16 μ L de la solución de APTES se depositaron sobre mica previamente clivada dejando incubar en cámara de humedad

durante 20-30 min. Posteriormente se lava la mica con agua Milli Q y se seca colocándola cerca de una fuente de calor durante 10 min [49].

2. Modificación por medio de vapor:

Se preparó una solución de 2% de APTES v/v con ETOH y se colocó en una caja de Petri junto con las micas previamente clivadas, cuidando que las micas no toquen la solución. Se dejan toda la noche para que el vapor de APTES cubra la superficie expuesta de las micas.

3.3.2. Preparación de muestras con esferas de poliestireno (PS)

Se preparó una dilución de 1:20 de esferas de PS (0.32 μm , Spherotech Inc.) con agua Milli Q y se sonicó durante 20 minutos. Después se colocaron aproximadamente 16 μL de esta dilución sobre AP-mica dejando incubar toda la noche en cámara de humedad. Por último se lavó la mica con agua Milli Q y se secó la muestra con calor para su posterior análisis con AFM.

3.3.3. Preparación de muestras de ADN sobre AP-mica utilizando el método de deposición convencional

- λ ADN:

40 μL de solución de 5 ng/ μL de λ ADN en Buffer TE (10 mM de Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA) fueron depositados sobre AP-mica y se dejó incubar durante 15 min, después se lavó la mica con aproximadamente 15 mL de agua Milli Q y se secó con aire comprimido para su posterior análisis con AFM.

- Plásmido pCA1:

El procedimiento de preparación de muestras con el plásmido pCA1 es el mismo que para el λ ADN, solo que en este caso el plásmido se mezcló con una solución de 10 mM de NaCl para obtener una concentración final de 10 ng/ μL .

3.3.4. Preparación de muestras de ADN sobre mica utilizando el método de deposición convencional

- λ ADN:

40 μL de solución de 0.25-5 $\text{ng}/\mu\text{L}$ de λ ADN en Buffer de deposición (50 mM de HEPES pH 7.5, 10 mM de MgCl_2) [50] fueron depositados sobre mica previamente clivada y se dejó incubar durante 10 min, posteriormente se lavó la mica con aproximadamente 15 mL de agua Milli Q. Por último se secó la mica con aire comprimido para su posterior análisis con AFM.

- Plásmido pCA1:

El procedimiento de preparación de muestras con el plásmido pCA1 es el mismo que para el λ ADN, solo que en éste caso el plásmido pCA1 se diluye en Buffer TE (10 mM de Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA) y después se mezcla con 1 volumen de una solución de 2 mM de MgCl_2 [51], para obtener una concentración final de 2.5 $\text{ng}/\mu\text{L}$.

3.3.5. Preparación de muestras de λ ADN-UDG sobre mica y AP-mica utilizando el método de deposición de *spin-coating*

- Deposición sobre mica

Se incubaron 2 μL de 10 $\text{ng}/\mu\text{L}$ de λ ADN en Buffer TE con 5 μL de 0.06 $\text{ng}/\mu\text{L}$ de UDG en Buffer TE, dejando reposar durante 10 min a 4°C. Posteriormente se mezcló la incubación con 38 μL de Buffer de deposición (50 mM de HEPES pH 7.5, 10 mM de MgCl_2) obteniendo así concentraciones finales de ADN y UDG en solución de 0.44 $\text{ng}/\mu\text{L}$ y 6.5×10^{-3} $\text{ng}/\mu\text{L}$ respectivamente. Se colocó la solución sobre mica clivada previamente montada sobre el sistema de *spin-coating*. La solución se dejó incubar durante 2 min, se giró a 8,000 rpm durante 2 segundos, después se colocaron 40 μL de agua Milli Q y finalmente se giró durante 2 minutos para posteriormente ser analizada por AFM.

- Deposición sobre AP-mica

2 μL de 10 $\text{ng}/\mu\text{L}$ de λ ADN en Buffer TE se mezclaron con 5 μL de 0.06 $\text{ng}/\mu\text{L}$ de UDG en Buffer Thermo Pol II (20 mM de Tris-HCL, 10 mM de KCl, 10 mM $(\text{NH})_4\text{SO}_4$, 0.1 % de Triton X-100, pH 8.8), después estos 7 μL se mezclaron con 38 μL de Buffer TE, obteniendo así concentraciones finales de 0.44 $\text{ng}/\mu\text{L}$ de λ ADN y 0.006 $\text{ng}/\mu\text{L}$ de UDG. Estos 45 μL finales se incubaron a 65°C durante 4 horas, terminado el tiempo de incubación se pasó rápidamente a hielo. Posteriormente se depositaron los 45 μL sobre AP-mica previamente montada sobre el sistema de *spin-coating* y se realizó el mismo procedimiento anterior para la deposición sobre mica.

3.3.6. Preparación de muestras de λ ADN-UDG sobre mica utilizando formaldehído como *cross-link* y el método de deposición de *spin-coating*

Se incubaron 2 μL de 10 $\text{ng}/\mu\text{L}$ de λ ADN en Buffer TE con 5 μL de 0.06 $\text{ng}/\mu\text{L}$ de UDG en Buffer TE durante 5 min a temperatura ambiente, después se le agregaron 2 μL de formaldehído al 1% y se incubó durante 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente se paró la reacción de *cross-link* con 0.5 μL de Glicina a 2.5 M y se mezcló todo con 36 μL de Buffer de deposición (50 mM de HEPES pH 7.5, 10 mM de MgCl_2), obteniendo así concentraciones finales de ADN y UDG en solución de 0.44 $\text{ng}/\mu\text{L}$ y 6.5×10^{-3} $\text{ng}/\mu\text{L}$ respectivamente. Se colocó la solución sobre mica clivada previamente montada sobre el sistema de *spin-coating*. La solución se dejó incubar durante 2 min, se giró a 8,000 rpm durante 2 segundos, después se colocaron 40 μL de agua Milli Q y finalmente se giró durante 2 minutos para posteriormente ser analizada por AFM.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS

Todas las imágenes de AFM fueron obtenidas utilizando el modo de operación *tapping* en aire y a temperatura ambiente.

Las imágenes de esferas de poliestireno (PS) fueron analizadas por medio del *software* WinSPM Processing del equipo Jeol JSPM-5200.

Para el análisis y procesamiento de las imágenes con ADN se utilizó el *software* WSxM y Gwyddion. Las imágenes fueron procesadas únicamente con *flattening* (con esta operación se obtiene un *background* uniforme). El *software* Gwyddion fue utilizado para el análisis de alturas en las imágenes de ADN y el programa Imagej se utilizó para realizar medidas en la longitud de las moléculas de ADN. Todas las mediciones de altura y longitud se reportan utilizando el promedio aritmético \pm la desviación estándar.

Los programas utilizados se pueden encontrar de manera gratuita en la red:

- WSxM: <http://www.nanotec.es/products/wsxm/>
- Gwyddion: <http://gwyddion.net/>
- Imagej: <http://imagej.nih.gov/ij/>

4.1. Esferas de PS

Las muestras de esferas de PS sirvieron para conocer algunas técnicas de preparación de muestras similares a las que se utilizan para preparar ADN. Las imágenes de esferas de PS depositadas sobre AP-mica se presentan en la Figura 4.1.1, donde se puede observar una monocapa de esferas sobre la superficie del

sustrato. En la imagen 3D de la Figura 4.1.2 podemos observar la distribución en las alturas que presentaron las esferas, las cuales están en el rango de los tamaños especificados por el fabricante que es de $0.32\ \mu\text{m}$ (Spherotech Inc.). En la Figura 4.1.3 se muestra un corte horizontal de las esferas de PS. En el perfil podemos observar las partes superiores de las esferas, donde se muestra que efectivamente se trata de partículas completamente redondeadas.

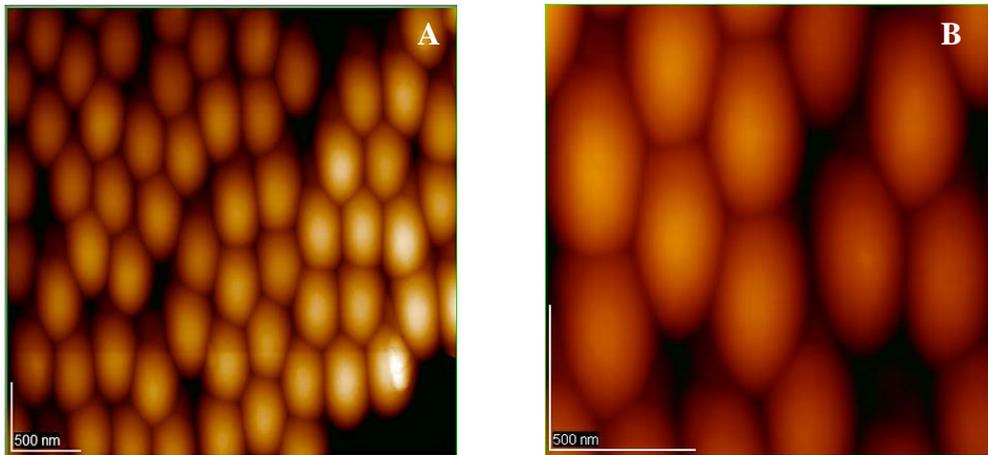


Figura 4.1.1. (A y B) Imagen topográfica de AFM de esferas de PS depositadas sobre AP-mica.

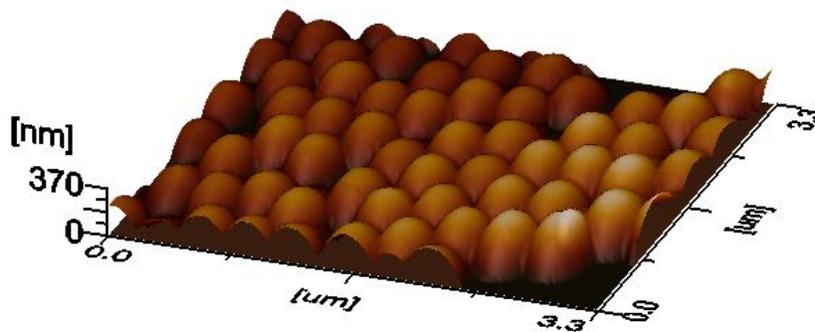


Figura 4.1.2. Imagen en 3D de esferas de PS depositadas sobre AP-mica.

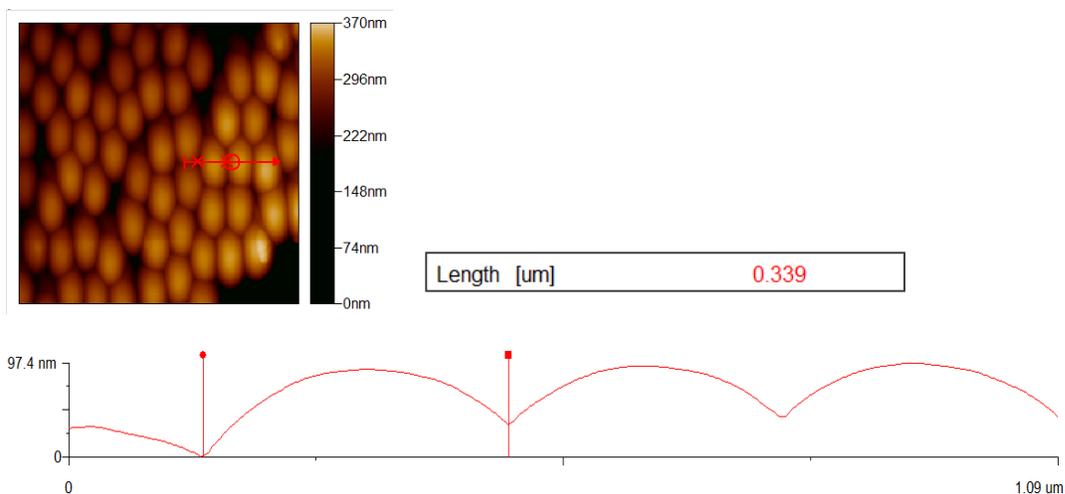


Figura 4.1.3. Imagen de corte horizontal de esferas de PS depositadas sobre AP-mica. En el perfil se muestra el análisis de la parte superior de una de las esferas la cual presentó una longitud de 0.339 μm .

4.2. Cadenas del Plásmido pCA1 depositado sobre mica y AP-mica

Las imágenes obtenidas por AFM del plásmido pCA1 depositado sobre AP-mica y mica se pueden observar en la Figura 4.2.1. Los plásmidos depositados sobre AP-mica mostraron estructuras condensadas en forma de anillos y algunas partículas globulares (ver Figura 4.2.1A). En contraste, los plásmidos depositados sobre mica presentan cadenas circulares relajadas (ver Figura 4.2.1B, C y D). Un hecho que llama la atención es que en algunas imágenes se pueden observar regiones más oscuras o huecos (como por ejemplo en la Figura 4.2.1C), sugiriendo que posiblemente las moléculas de ADN se encuentran embebidas en algún tipo de residuo de sales proveniente del buffer utilizado en la preparación de muestras (ver Capítulo 5). En la Figura 4.2.2 se muestra un corte horizontal sobre una de las regiones del hueco, en el perfil se pueden observar dos moléculas de ADN y el hueco que queda en el centro, la altura medida del escalón de sal fue de 0.78 ± 0.03 nm (medida obtenida ajustando una línea horizontal a una sección del escalón).

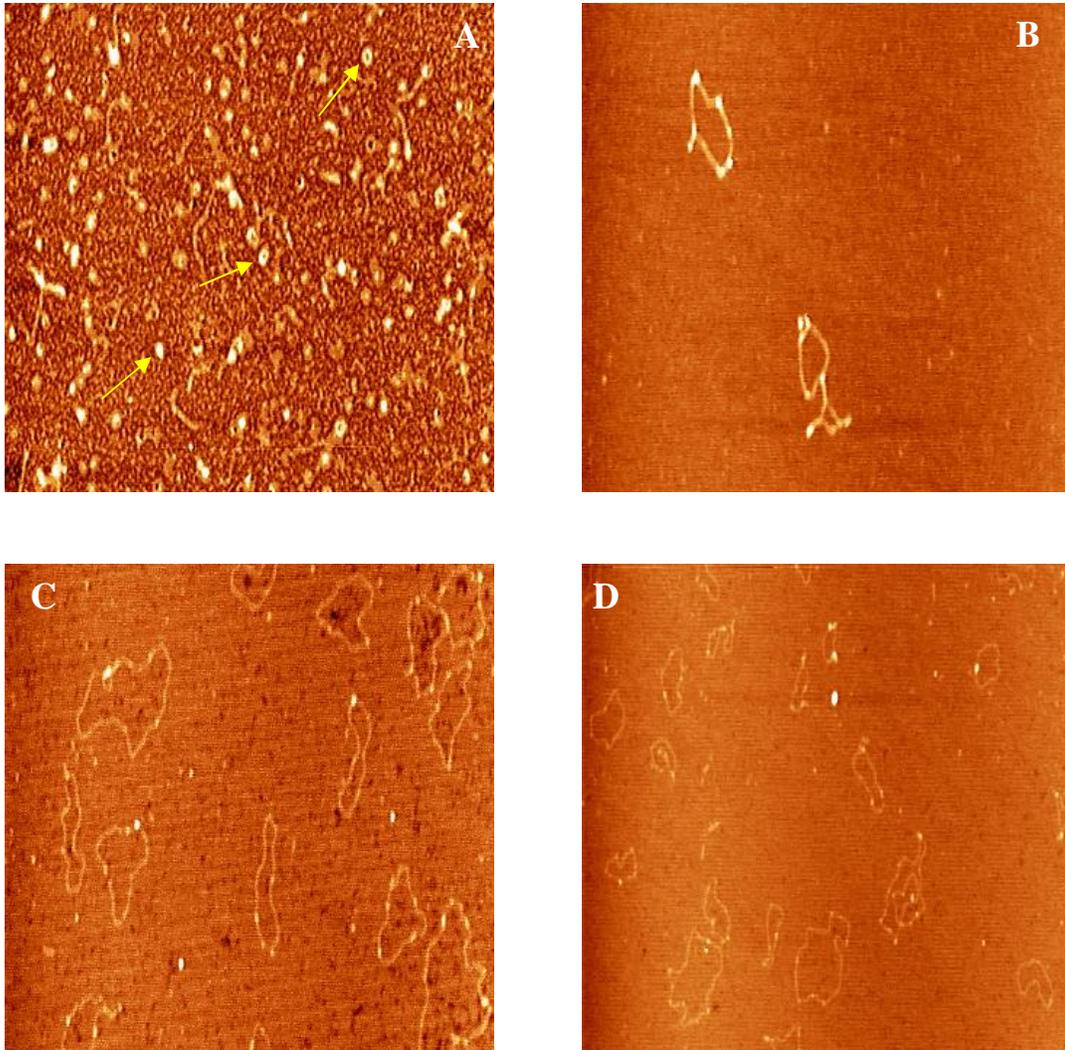


Figura 4.2.1. Imágenes topográficas obtenidas por AFM de moléculas del plásmido pCA1. A) Plásmidos condensados sobre AP-mica en solución con cationes monovalentes (Na^{1+}), algunas de las partículas globulares y en forma de anillos están marcadas con flecha amarilla. B, C y D) Plásmidos relajados sobre mica usando cationes divalentes (Mg^{2+}). Tamaño de la imagen: A) $3.11 \mu\text{m} \times 3.11 \mu\text{m}$, B) $3.24 \mu\text{m} \times 3.24 \mu\text{m}$, C) $3.43 \mu\text{m} \times 3.43 \mu\text{m}$ y D) $5.5 \mu\text{m} \times 5.5 \mu\text{m}$.

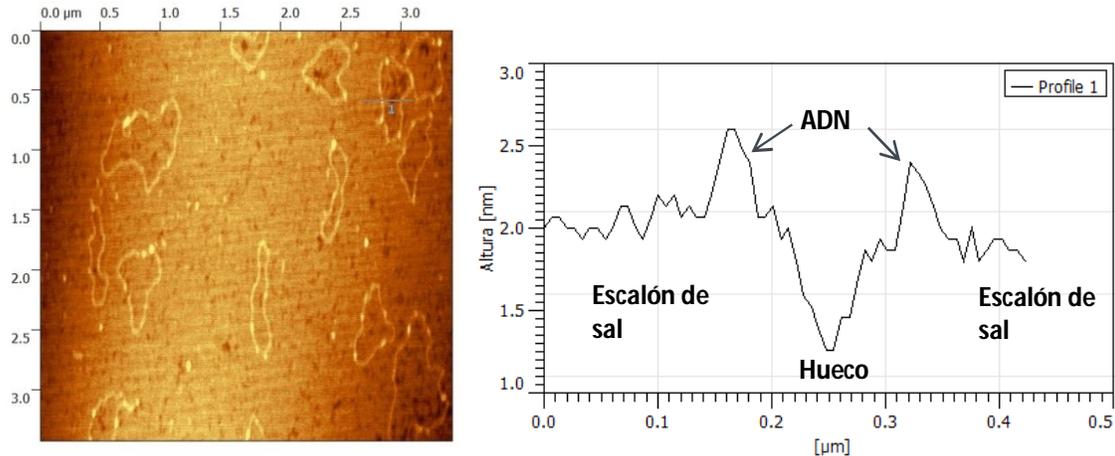


Figura 4.2.2. Perfil de altura sobre una región (marcada con línea horizontal) del hueco que se presenta en la Figura 4.2.1C, abarcando dos moléculas de ADN quedando un hueco en el centro.

4.2.1. Mediciones de alturas y longitudes de cadena del plásmido pCA1

Sabemos que la longitud del plásmido pCA1 es de 3,683 pb y que la distancia entre pares de bases es de 0.34 nm, por lo tanto, la longitud del plásmido es de aprox. 1,252 nm. La medida de las longitudes de los plásmidos depositados sobre mica, fue realizada con la ayuda del programa Imagej, usando la herramienta de “segmented line” que permite ir realizando trazos con segmentos sobre los objetos a medir. En la Figura 4.2.1.1 se muestra un ejemplo de cómo se realizaron las medidas para uno de los plásmidos utilizando este software, donde podemos observar que las líneas azules cubren el contorno de la cadena del plásmido dando como resultado la longitud de cadena, que para este ejemplo resultó ser de aproximadamente 2010 nm. Todos los valores de las alturas de partículas reportados fueron obtenidos trazando una línea recta sobre el objeto a medir en las imágenes de AFM (al hacer esta operación se obtiene el perfil de la partícula) y posteriormente ajustando una gaussiana sobre el perfil. El valor reportado de altura de partículas corresponde al valor de la amplitud de la gaussiana.

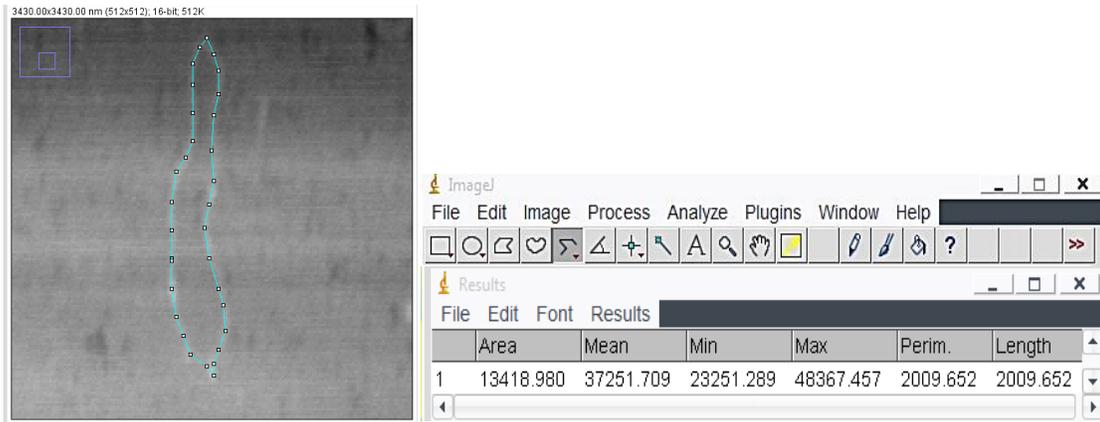


Figura 4.2.1.1. Medida de la longitud de uno de los plásmidos depositados sobre mica utilizando el programa de análisis de imágenes Imagej. En el recuadro de resultados se muestra que la longitud del plásmido fue de 2009.652 nm.

El valor promedio obtenido al medir la altura y longitud de los plásmidos depositados sobre mica fue de 0.5 ± 0.2 nm y 1687 ± 424 nm. En los histogramas de la Figura 4.2.1.2 se muestran las distribuciones de los valores obtenidos al medir las longitudes de cadena de los plásmidos, así como también la distribución de los valores obtenidos en alturas de las cadenas.

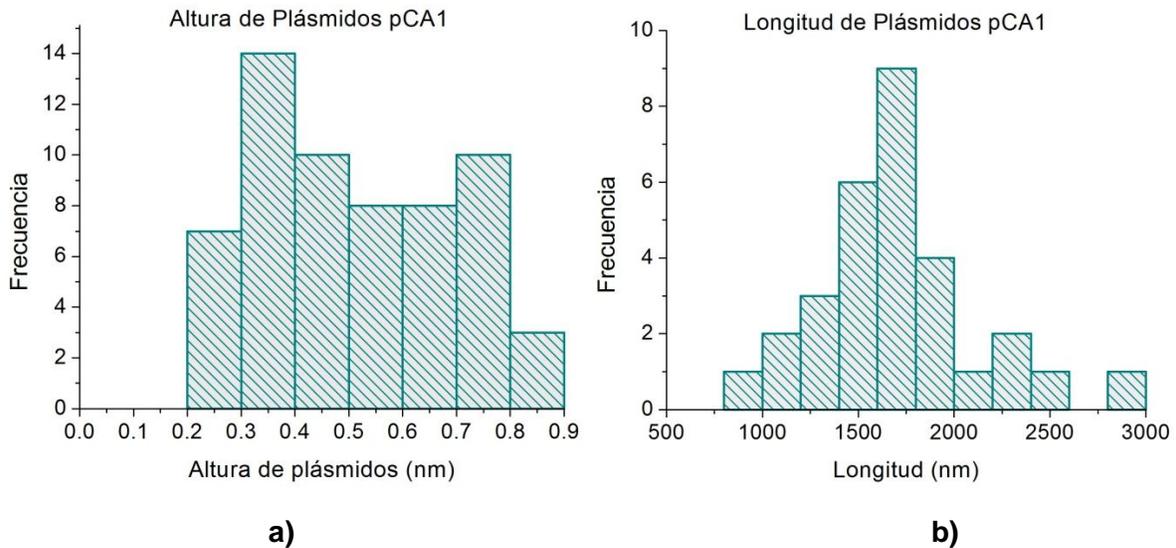


Figura 4.2.1.2. Histogramas de los valores obtenidos al medir a) alturas y b) longitudes de los plásmidos depositados sobre mica.

4.3. Cadenas de λ ADN depositado sobre AP-mica y mica

Dependiendo del tipo de preparación de muestras, obtuvimos la formación de diferentes patrones o superestructuras de moléculas de λ ADN depositado sobre AP-mica y mica, así como también moléculas aisladas de λ ADN.

4.3.1. Formación de superestructuras de λ ADN sobre AP-mica y mica

En la Figura 4.3.1.1 se pueden observar moléculas condensadas (anillos y partículas globulares) de λ ADN depositadas sobre AP-mica.

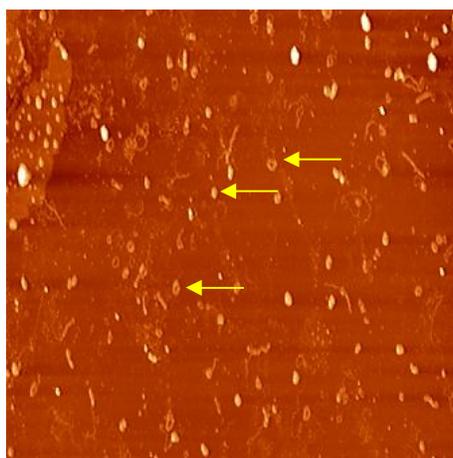


Figura 4.3.1.1. Imagen topográfica obtenida por AFM de moléculas condensadas de λ ADN en AP-mica. Algunas de las partículas condensadas en forma de anillos y partículas globulares están marcadas con flecha amarilla. Tamaño de la imagen: 10.4 μm x 10.4 μm .

En la Figura 4.3.1.2 se presenta una serie de imágenes de muestras de λ ADN depositado sobre mica donde podemos observar la coexistencia de diferentes estados conformacionales de esta molécula, formando una variedad de redes y patrones sobre mica. Todas las imágenes presentadas se realizaron utilizando el mismo protocolo de preparación de muestras. Algunas de las muestras analizadas con AFM, presentaron diferentes formaciones de superestructuras de ADN en la

misma muestra. Un ejemplo de la coexistencia de diferentes patrones de redes de ADN es la que se presenta en la imagen A y E de la Figura 4.3.1.2, las cuales corresponden a barridos en diferentes áreas de una sola muestra.

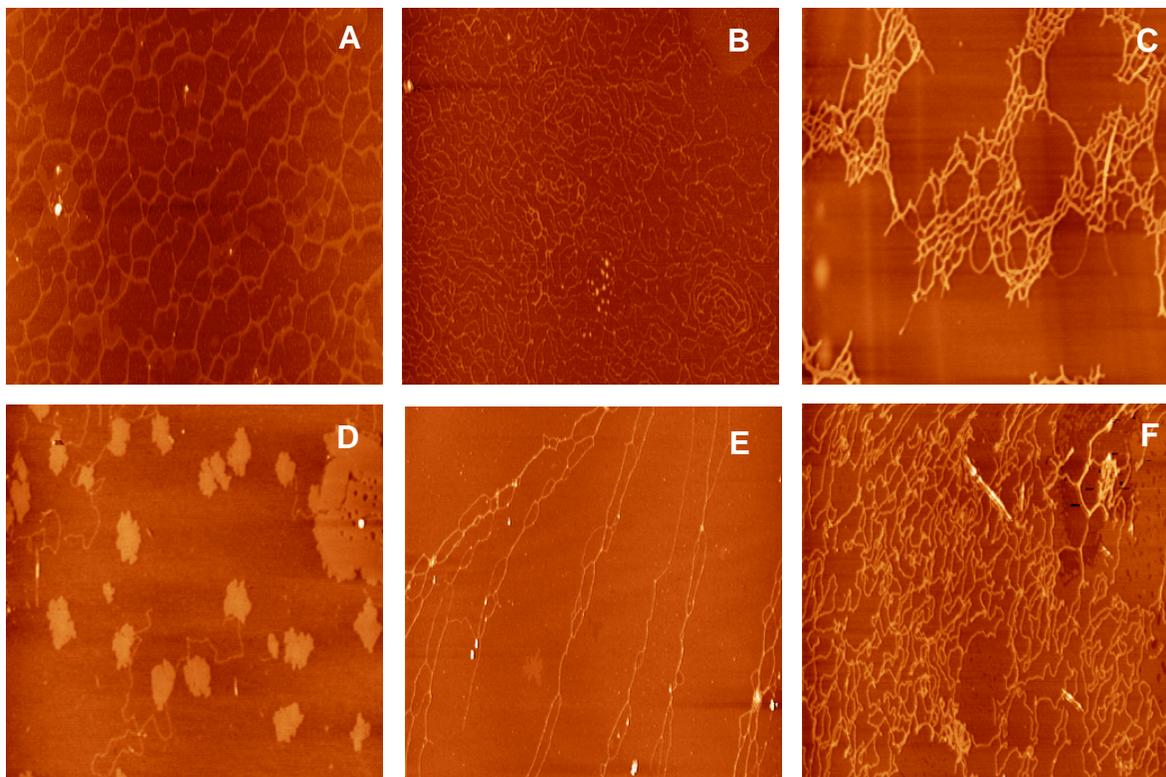


Figura 4.3.1.2. Imágenes topográficas obtenidas por AFM de λ ADN depositado sobre mica. A, B, C, D, E y F) Formación de diversos patrones de redes sobre mica en buffer de deposición: 50 mM HEPES pH 7.5, 10 mM $MgCl_2$. La concentración de ADN utilizada y el tamaño de la imagen correspondiente son: A) 3 ng/ μ L, 9 μ m x 9 μ m, B) 1 ng/ μ L, 6.03 μ m x 6.03 μ m, C) 5 ng/ μ L, 7 μ m x 7 μ m, D) 1 ng/ μ L, 6.41 μ m x 6.41 μ m, E) 3 ng/ μ L, 10 μ m x 10 μ m y F) 2 ng/ μ L, 7 μ m x 7 μ m.

En la Figura 4.3.1.3 se presentan algunas imágenes del λ ADN depositado sobre mica, donde se pueden observar cadenas de ADN extendidas y algunas moléculas de ADN aisladas. Además, en las imágenes B y C de la Figura 4.3.1.3 podemos observar islas o huecos cuyo origen probablemente se debe a la presencia de una capa residual proveniente de los buffers de deposición cubriendo la superficie de la mica, haciendo que la mayoría de las moléculas de ADN queden

embebidas de igual manera como ya se había visto anteriormente para el plásmido pCA1.

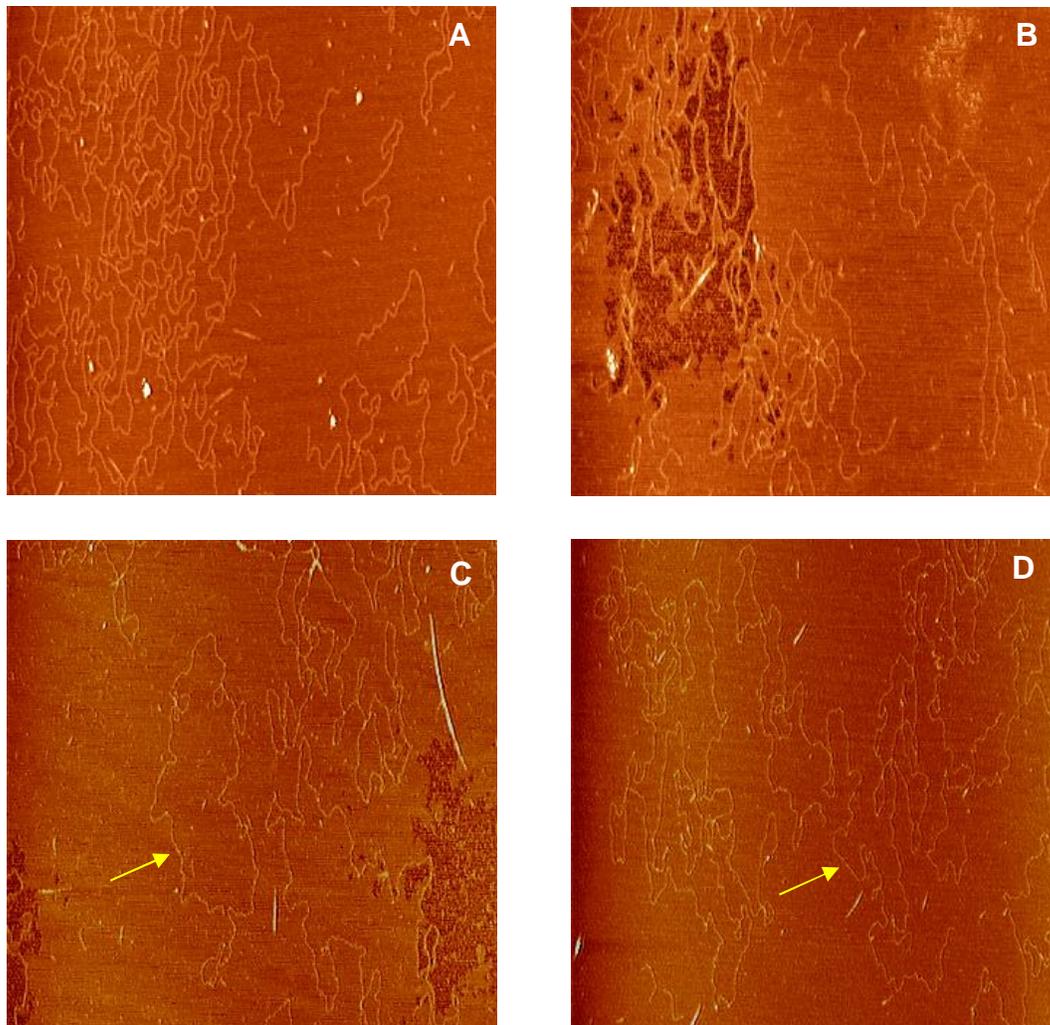


Figura 4.3.1.3. Imágenes topográficas obtenidas por AFM de moléculas de λ ADN depositadas sobre mica. A) y B) Moléculas enredadas de ADN, concentración de ADN de 5 ng/ μ L y 1 ng/ μ L, respectivamente. C) y D) Las cadenas de ADN aisladas se muestran marcadas con flecha amarilla, concentración de ADN de 1 ng/ μ L. Tamaño de la imagen: A) 5.37 μ m x 5.37 μ m, B) 4.72 μ m x 4.72 μ m, C) 5.72 μ m x 5.72 μ m y D) 6.78 μ m x 6.78 μ m.

En la Figura 4.3.1.4 se presenta un corte horizontal de la Figura 4.3.1.3B de uno de los huecos antes mencionados, donde podemos observar con mayor claridad una de las moléculas de ADN que se encuentra embebida y otra molécula de ADN que se encuentra en el hueco. La altura medida para el escalón de sal fue de 1.11 ± 0.05 nm. En la Figura 4.3.1.5 se presenta una ampliación de una de las moléculas de ADN aisladas y su correspondiente imagen en 3D.

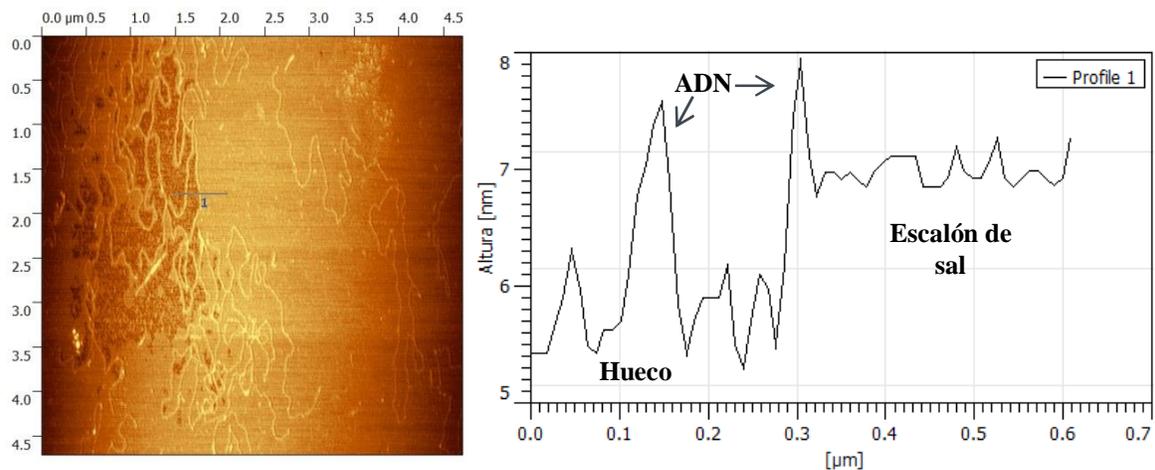


Figura 4.3.1.4. Perfil de alturas sobre una de las regiones (señalada con línea horizontal) del hueco que se presenta en la Figura 4.3.1.3B, abarcando un tramo de una molécula de λ ADN que se encuentra en el hueco y otra molécula de λ ADN que se encuentra en el límite del hueco.

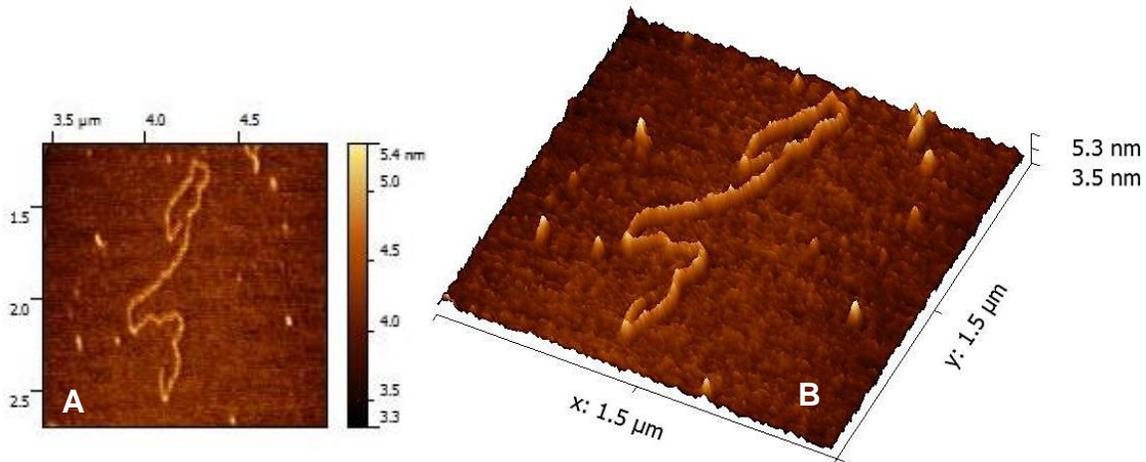


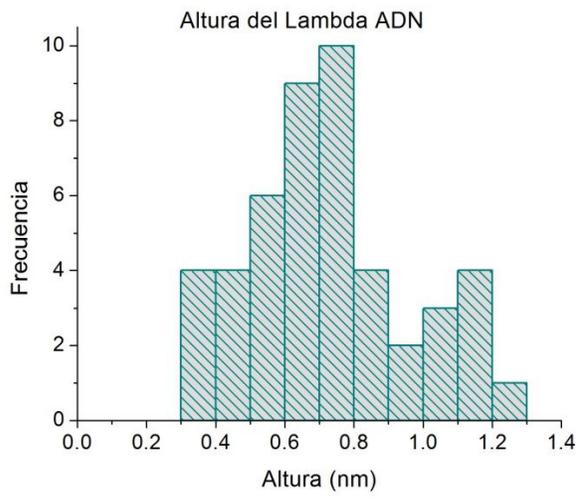
Figura 4.3.1.5. Imágenes de AFM de una molécula de λ ADN depositada sobre mica. A) Imagen topográfica de una molécula aislada de ADN y B) Su correspondiente imagen en 3D.

4.3.2. Mediciones de altura y longitudes de cadena del λ ADN

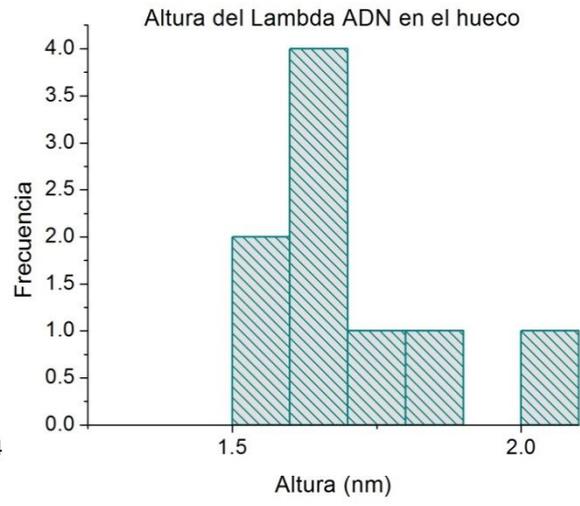
El λ ADN es un ADN lineal bicatenario (de doble cadena) que consta de 48,502 pb y sabemos que la distancia entre pares de bases es de 0.34 nm, por lo tanto la longitud de las cadenas del λ ADN es de aproximadamente 16,490 nm. El valor promedio obtenido al medir la altura y longitud del λ ADN fue de 0.7 ± 0.2 nm y $13,067 \pm 5,833$ nm, respectivamente. El valor promedio obtenido al medir la altura de las moléculas de λ ADN que se encontraron en alguno de los huecos antes mencionados fue de 1.7 ± 0.1 nm.

Como parte del análisis de interacción ADN-proteína que se discutirá en el Capítulo 5, también se realizaron medidas de altura de las partículas residuales encontradas sobre la superficie de la mica, donde el valor promedio fue de 1.3 ± 0.8 nm.

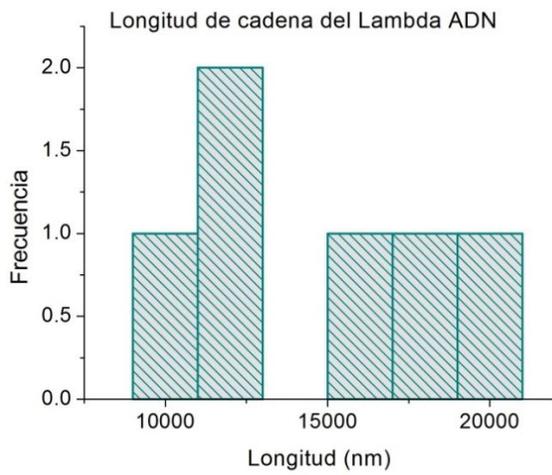
En los histogramas de la Figura 4.3.2.1 se muestra la distribución de las longitudes obtenidas para algunos de los λ ADN utilizando el mismo método de medición que para las longitudes de los plásmidos (utilizando el programa Imagej), la distribución de las alturas obtenidas para las cadenas de λ ADN y para las partículas residuales encontradas sobre la superficie de la mica.



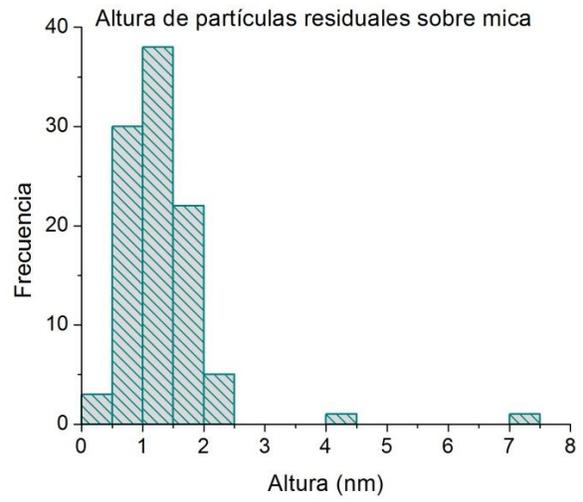
a)



b)



c)



d)

Figura 4.3.2.1. Histograma de los valores obtenidos al medir a) alturas, b) alturas en hueco, c) longitudes de los λ ADN depositados sobre mica y d) partículas residuales encontradas sobre la superficie de la mica.

4.4. Visualización de complejos λ ADN-UDG utilizando la técnica de deposición de *spin-coating*

La obtención de imágenes de AFM para la visualización de la formación de complejos entre la proteína UDG y el λ ADN se realizaron mediante la técnica de deposición de *spin-coating*, utilizando como sustratos AP-mica y mica.

4.4.1. λ ADN y UDG depositados sobre AP-mica y mica

En la Figura 4.4.1.1 se muestran las imágenes obtenidas del λ ADN y UDG depositados sobre AP-mica, donde podemos observar algunas moléculas individuales de ADN, las cuales se encuentran en un estado de superenrollamiento. También podemos ver que sobre algunos tramos extendidos de moléculas del λ ADN y sobre la superficie de la AP-mica se observa la presencia de partículas globulares más brillantes debidos a la proteína UDG.

En la Figura 4.4.1.2 se presentan las imágenes obtenidas para el λ ADN y la proteína UDG depositados sobre mica. Podemos observar que las moléculas del λ ADN no se encuentran totalmente extendidas. Sin embargo, en ciertas regiones se alcanza a visualizar moléculas de proteína localizadas sobre las cadenas de ADN, además de que también se pueden observar moléculas de UDG sobre la superficie de la mica.

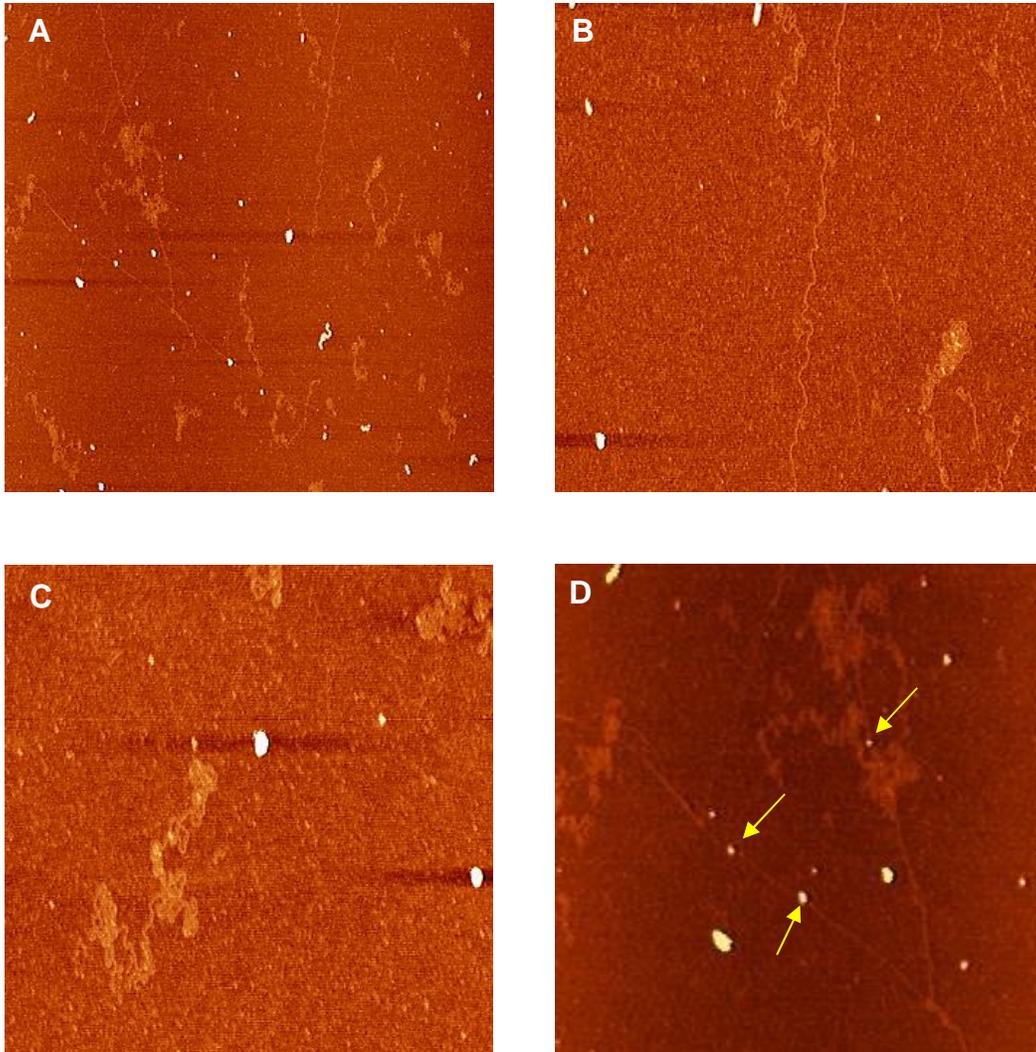


Figura 4.4.1.1. Imágenes topográficas obtenidas por AFM de λ ADN y UDG depositados sobre AP-mica usando la técnica de *spin-coating*. A, B y C) Moléculas enrolladas de ADN, D) Ampliación de la imagen A, algunas de las moléculas de UDG localizadas sobre cadenas extendidas de ADN se encuentran marcadas con flecha amarilla. Tamaño de la imagen: A) 9 μm x 9 μm , B) 3.28 μm x 3.28 μm , C) 2.29 μm x 2.29 μm y D) 4.1 μm x 4.1 μm .

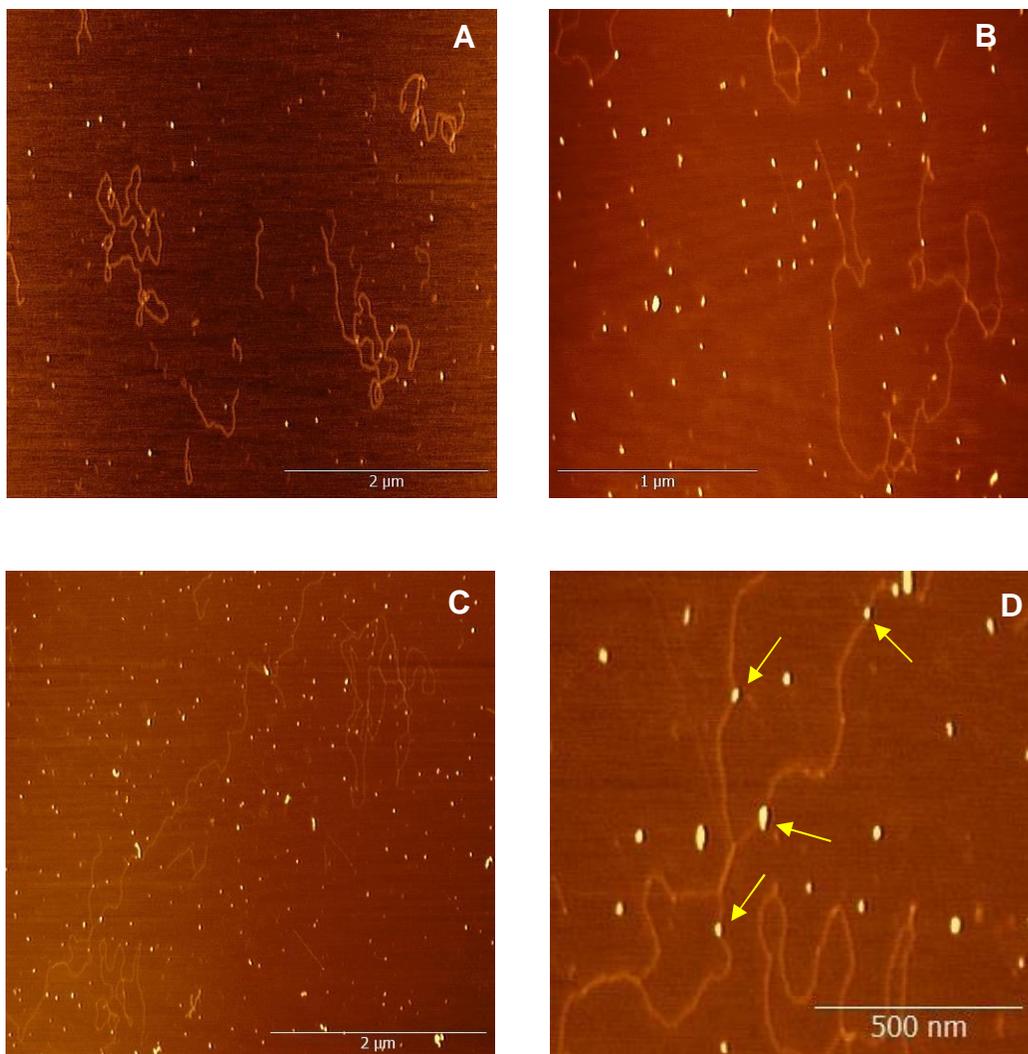


Figura 4.4.1.2. Imágenes topográficas obtenidas por AFM de λ ADN y UDG depositados sobre mica usando la técnica de *spin-coating*. A, B y C) Moléculas aisladas de ADN con algunas moléculas de UDG unidas sobre ellas, D) Ampliación de la imagen C, algunas de las partículas de UDG sobre cadenas de λ ADN se encuentran marcadas con flecha amarilla.

En la Figura 4.4.1.3 se presenta una ampliación de dos moléculas de UDG sobre una de las cadenas del λ ADN y su correspondiente imagen en 3D, además podemos observar que una de las moléculas de UDG está induciendo un doblamiento significativo sobre el sitio de unión a la cadena de ADN, sin embargo este tipo de dobleces no se presentaron de manera frecuente.

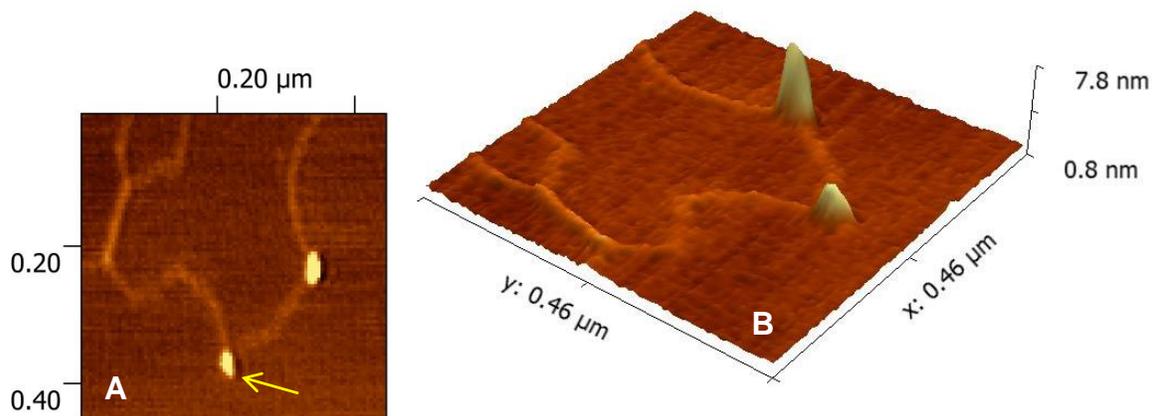


Figura 4.4.1.3. Imágenes de AFM de dos sitios de unión de la proteína UDG sobre la molécula de λ ADN. A) Ampliación de la esquina superior izquierda de la figura 4.4.1.2D, donde se observa una proteína UDG induciendo doblez sobre la cadena de ADN (marcada con flecha amarilla). B) La misma imagen que en A, mostrada en 3D.

Las imágenes obtenidas para el λ ADN y la proteína UDG depositados sobre mica usando formaldehído como *cross-link* se muestran en la Figura 4.4.1.4, donde podemos observar algunos puntos más brillantes sobre las cadenas del λ ADN debidos a la presencia de la proteína UDG.

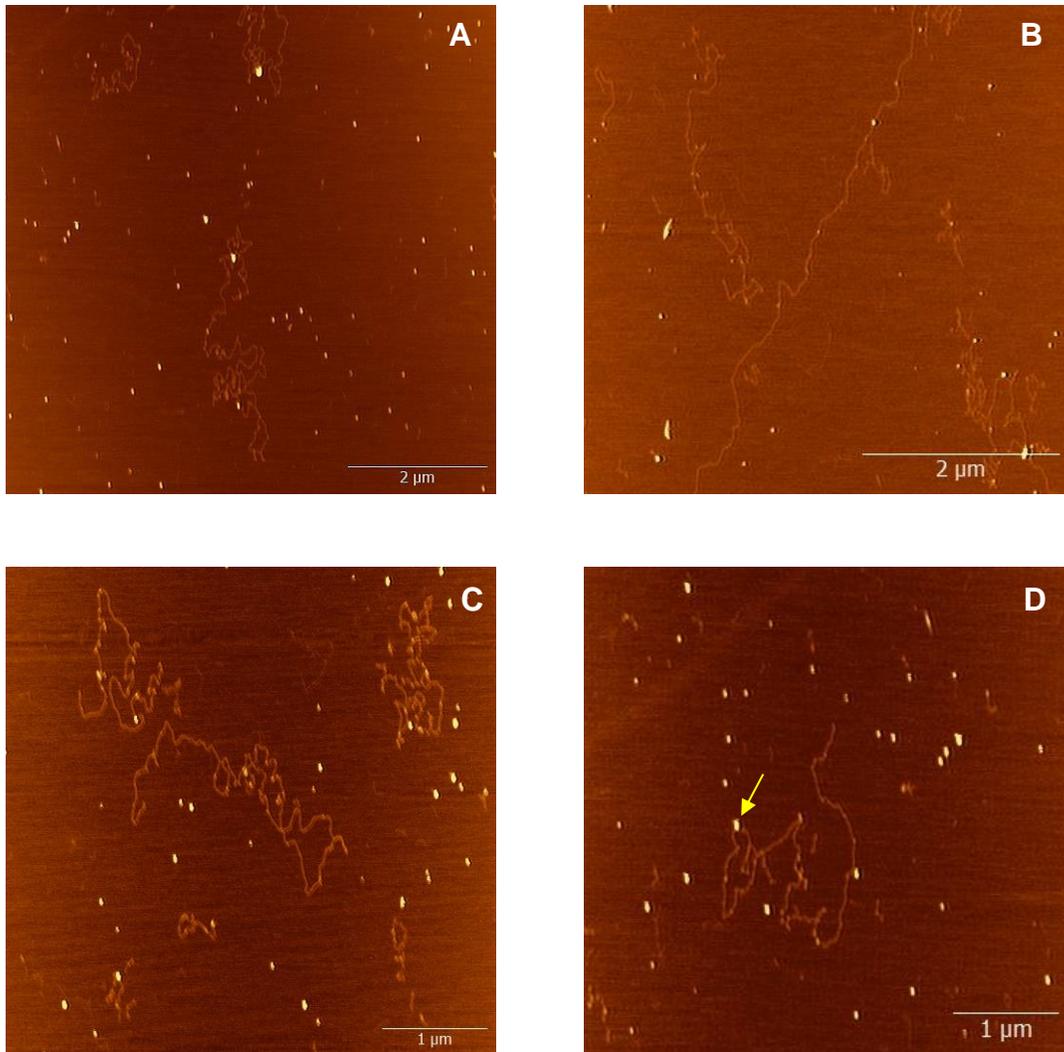


Figura 4.4.1.4. Imágenes obtenidas por AFM de λ ADN y UDG depositados sobre mica con formaldehído usando la técnica de *spin-coating*. A, B, C) Cadenas de ADN decoradas con algunas moléculas de UDG y D) Una de las moléculas de UDG sobre el ADN marcada con flecha amarilla.

4.4.2. Mediciones de las alturas de cadena del λ ADN depositado sobre mica

Los valores promedio obtenidos en la medición de altura de cadena del λ ADN sobre mica y del λ ADN sobre mica con formaldehído fueron 1.1 ± 0.3 nm y 0.99 ± 0.2 nm respectivamente. El valor global para las alturas de cadena del λ ADN fue de 1.1 ± 0.3 nm. En los histogramas de la Figura 4.4.2.1 se muestra la distribución

de alturas obtenidas para las cadenas de λ ADN depositados sobre mica utilizando la técnica de *spin-coating*.

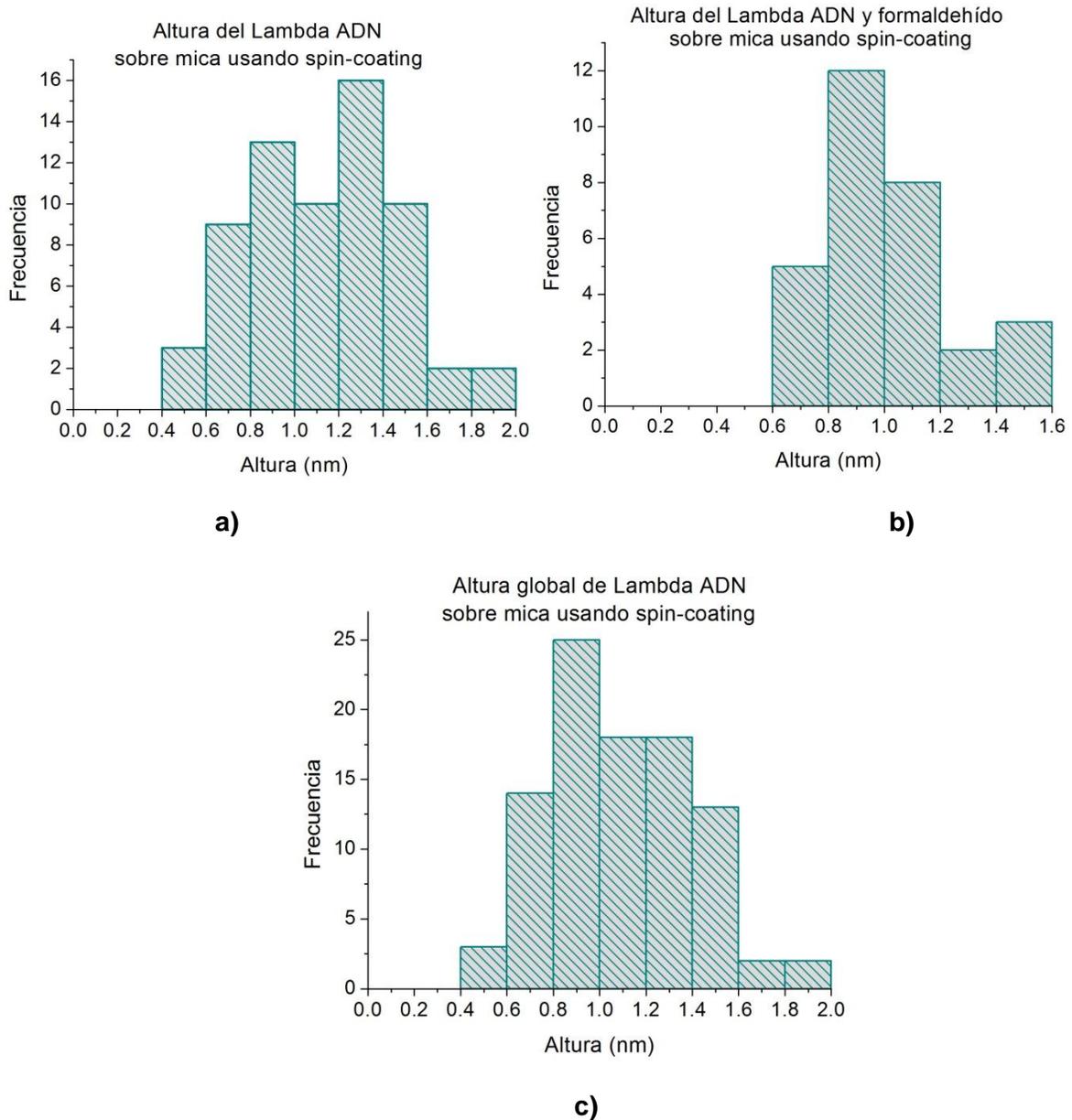


Figura 4.4.2.1. Histograma de los valores obtenidos al medir las alturas de los λ ADN utilizando la técnica de deposición de *spin-coating*. a) Altura del λ ADN sobre mica, b) altura del λ ADN sobre mica usando formaldehído y c) altura global del λ ADN utilizando todos los valores mostrados tanto en el histograma a como en el b.

4.4.3. Mediciones de las alturas de las moléculas de UDG presentes en el sustrato y sobre las cadenas del λ ADN

En cuanto a las mediciones de las moléculas de UDG (fuera y sobre las cadenas de λ ADN), primero vamos a comenzar haciendo el cálculo del tamaño esperado de la proteína haciendo uso de ciertas aproximaciones. Esto nos servirá para establecer un rango de alturas dentro del cual realizaremos conteos de partículas globulares en las imágenes de AFM.

Primero vamos a suponer que las proteínas son partículas esféricas y sabemos que el radio para una proteína típica globular de peso molecular de 100 kDa es de 3 nm [52].

La densidad se define como:

$$\rho = m/V \quad (1)$$

Donde ρ es la densidad, m es la masa y V es el volumen de la partícula. Teniendo en cuenta que el peso molecular para la proteína UDG es de 22,717 Da [53], entonces podemos igualar la densidad de la proteína típica con la densidad de la UDG:

$$\rho_T = \rho_{UDG} \quad (2)$$

Donde ρ_T es la densidad de una proteína típica y ρ_{UDG} es la densidad de la proteína UDG, sustituyendo (1) en (2), tenemos que:

$$m_T/V_T = m_{UDG}/V_{UDG} \quad (3)$$

Considerando proteínas típicas como partículas globulares, vamos a suponer que tienen geometría esférica. Entonces la ecuación (3) queda:

$$\frac{m_T}{\frac{4}{3}\pi R_T^3} = \frac{m_{UDG}}{\frac{4}{3}\pi R_{UDG}^3} \quad (4)$$

En donde R_T es el radio de la proteína típica y R_{UDG} es el radio de la proteína UDG.

Finalmente, de la ecuación (4) despejamos el radio para la UDG:

$$R_{UDG} = \left(\frac{m_{UDG}}{m_T} \right)^{1/3} R_T \quad (5)$$

Ahora, sustituyendo los valores conocidos en la ecuación (5) obtenemos que el valor del radio para la proteína UDG es de aproximadamente: $R_{UDG} = 1.8$ nm, por lo tanto el diámetro aproximado para la proteína es de 3.6 nm.

Para el conteo de alturas de las partículas globulares presentes sobre el sustrato (fuera del ADN) solamente se tomó en cuenta las partículas que midieron más de 1 nm, esto debido a que el valor encontrado en el cálculo para la altura de la proteína UDG fue de 3.6 nm. El valor promedio obtenido en la medición de las alturas de la UDG sobre AP-mica fue de 2.8 ± 1.5 nm, para la UDG sobre mica (con y sin formaldehído) de 3.7 ± 1.8 nm y para la altura global de UDG (sobre AP-mica y mica) de 3.2 ± 1.6 nm.

En los histogramas de la Figura 4.4.3.1 se presenta la distribución de los valores obtenidos al medir las alturas de las partículas globulares.

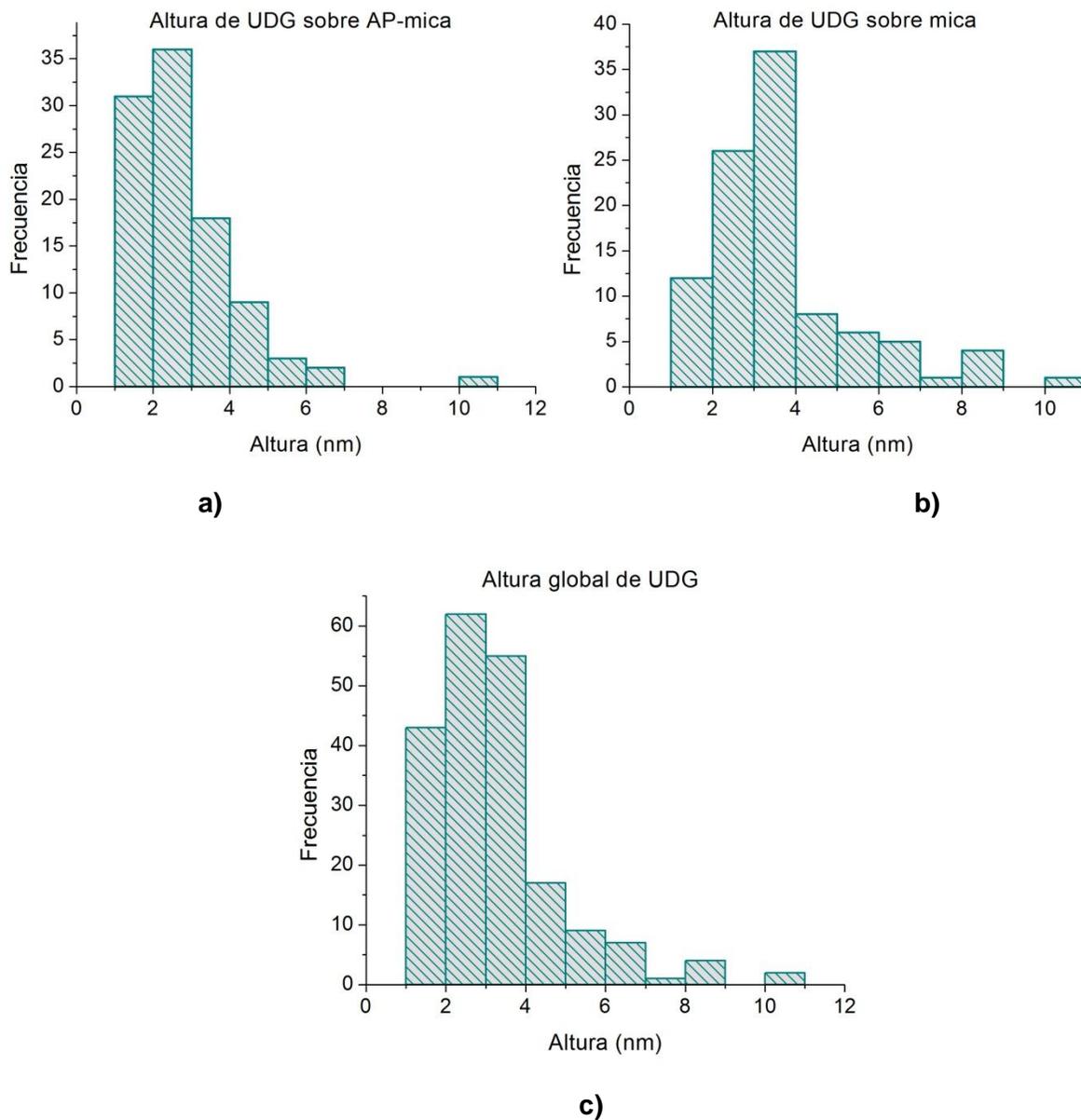


Figura 4.4.3.1. Histogramas de los valores obtenidos para las alturas de las partículas globulares (proteína UDG) sobre el sustrato. a) Sobre AP-mica, b) Sobre mica y c) altura global utilizando todos los valores mostrados tanto en el histograma a como en el b.

Los valores promedio obtenidos al medir las alturas de la UDG sobre las cadenas del λ ADN depositado sobre mica fue de 3.5 ± 1.2 nm y depositado sobre mica usando formaldehído de 3.8 ± 2.1 nm. El valor promedio de las alturas globales (tanto para las muestras de λ ADN-UDG sobre mica como para las muestras de λ ADN-UDG sobre mica usando formaldehído) fue de 3.6 ± 1.7 nm. En los

histogramas de la Figura 4.4.3.2, se presenta la distribución de los valores obtenidos al medir las alturas de las partículas globulares que se encontraron sobre las cadenas del λ ADN.

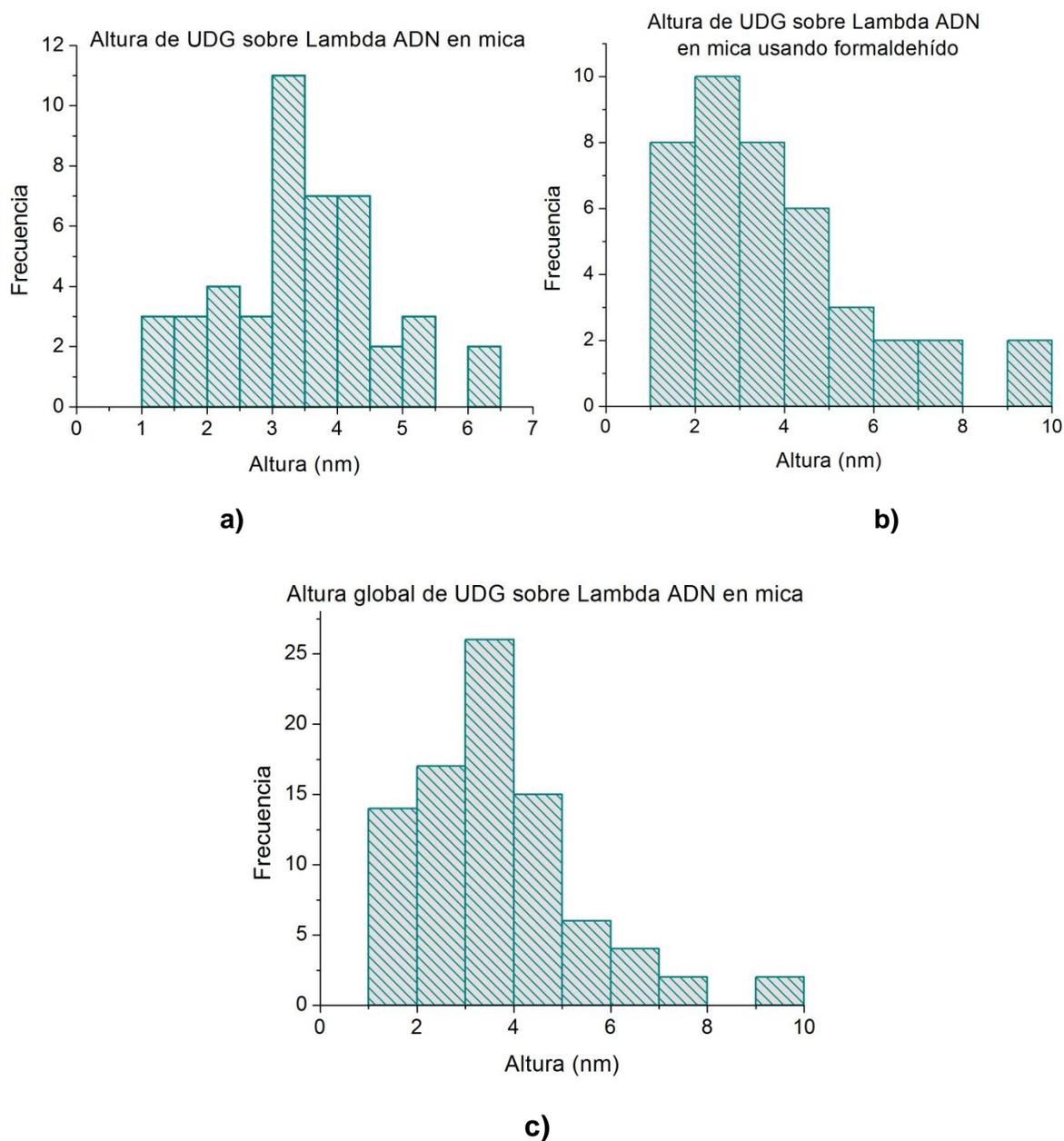


Figura 4.4.3.2. Histogramas de los valores obtenidos para las alturas de las partículas globulares (proteína UDG) encontradas sobre las cadenas del λ ADN. a) Depositado sobre mica, b) depositado sobre mica usando formaldehído y c) altura global utilizando todos los valores mostrados tanto en el histograma a como en el b.

4.4.4. Probabilidad de unión de moléculas de UDG sobre las cadenas del λ ADN

En las imágenes obtenidas por AFM de complejos λ ADN-UDG no es posible estar completamente seguros de que los complejos observados se deban a interacciones específicas o a una simple coincidencia espacial de moléculas de ADN y de proteína UDG. Para distinguir entre estas posibilidades, se realizó el cálculo de la probabilidad de que ocurran eventos al azar (unión aleatoria entre λ ADN-UDG). La probabilidad de que ocurran eventos de unión λ ADN-UDG al azar sobre la mica (P_A) es:

$$P_A = \frac{A_{ADN}}{A_O} \quad , \quad (6)$$

donde A_{ADN} es el área total de las cadenas del λ ADN y A_O es el área total de observación.

Ahora vamos a determinar la fracción de moléculas de UDG que se encontraron unidas al ADN en nuestros experimentos. En esta fracción, la cual vamos a llamar probabilidad experimental (P_E), ya están contados tanto los eventos al azar como también los eventos de unión específica entre ADN y proteína. Se tiene que:

$$P_E = \frac{N}{N+M} \quad (7)$$

Donde N es el número total de moléculas de UDG que se encontraron localizadas sobre las cadenas del λ ADN y M es el número total de moléculas de UDG que se encontraron localizadas sin contacto con el λ ADN (es decir, sobre el sustrato).

En la Tabla 4.4.4.1 se muestran los valores obtenidos para el área total del λ ADN (A_{ADN}), área total de observación (A_O), número total de UDG sobre el λ ADN (N), número total de UDG fuera del λ ADN (M), probabilidad de eventos al azar (P_A) y probabilidad experimental (P_E) en las imágenes del λ ADN-UDG en mica depositado por *spin-coating* y en las imágenes del λ ADN-UDG en mica con formaldehído depositado por *spin-coating*.

| λ ADN-UDG | En mica | En mica con formaldehído |
|-------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| A_{ADN} | $1.142 \times 10^7 \text{ nm}^2$ | $4.093 \times 10^6 \text{ nm}^2$ |
| A_o | $3.28 \times 10^8 \text{ nm}^2$ | $3.43 \times 10^8 \text{ nm}^2$ |
| N | 50 moléculas | 58 moléculas |
| M | 792 moléculas | 379 moléculas |
| P_A | 3.5 % | 1.2 % |
| P_E | 6 % | 13.3 % |

Tabla 4.4.4.1. Valores obtenidos para área total del λ ADN, área total de observación, número total de UDG sobre el λ ADN, número total de UDG fuera del λ ADN, probabilidad de eventos al azar y probabilidad experimental.

CAPÍTULO 5

DISCUSIÓN

Este Capítulo está enfocado en la discusión de 3 aspectos fundamentales en el desarrollo de la tesis: los métodos de preparación de muestras y elección del sustrato, los experimentos realizados con moléculas de ADN lineal y circular, y los experimentos realizados de interacción λ ADN-UDG. Los resultados obtenidos al analizar nuestras imágenes de AFM se comparan con resultados que ya han sido reportados anteriormente.

5.1. Elección del sustrato para la deposición de esferas de PS y ADN

La elección del sustrato depende de las características del material que se desee depositar sobre él. Primero que nada, sabemos que las esferas de PS presentan carga negativa y que el ADN también presenta carga negativa debido a su esqueleto de azúcar-fosfato [2]. Como ya ha sido mencionado, el sustrato base elegido fue la mica, ya que presenta regiones microscópicas que son atómicamente planas y al momento de clivar la mica se deja expuesta una superficie totalmente limpia además de que es de fácil preparación. Sin embargo, la mica también presenta carga negativa. Por lo tanto, fue necesario elegir el método adecuado para unir tanto esferas de PS como el ADN, ambos de carga negativa, sobre el sustrato (mica) que también presenta carga negativa.

Básicamente, se utilizaron dos tipos de sustratos en la preparación de muestras: AP-mica (mica modificada con APTES) y mica (sin modificar). La AP-mica, contiene grupos positivos expuestos debidos a la molécula de APTES (ver Figura

5.1.1) a los cuales se pueden unir tanto las esferas de PS como también las moléculas de ADN.

En el caso del uso de mica (utilizada para unir moléculas de ADN) solamente se tenía que elegir un buffer de deposición adecuado que funcionara como un puente de unión entre el esqueleto del ADN y la mica. Para esto se utilizaron buffers de deposición con contraiones que actuaran sobre el esqueleto de azúcar-fosfato del ADN y así poder fijar las moléculas a la mica [54]. Un ejemplo de este mecanismo es mediante el uso de cationes divalentes como se muestra en la Figura 5.1.2.

El buffer estándar elegido en las preparaciones de muestras sobre mica utilizando el sistema de deposición por *spin-coating*, fue el buffer de deposición que contiene cationes divalentes (50 mM de HEPES pH 7.5, 10 mM de $MgCl_2$). Esto debido a que el uso de cationes divalentes en solución puede fijar de manera moderada las cadenas de ADN sobre la mica, haciendo que las moléculas de ADN no se desprendan tan fácilmente de la mica como podría ocurrir con el uso de cationes monovalentes (baja fuerza iónica), o lo contrario, fijando de manera excesiva las cadenas de ADN creando así una posible distorsión de las moléculas, como podría ocurrir con el uso de cationes trivalentes o incluso de mayor fuerza iónica.

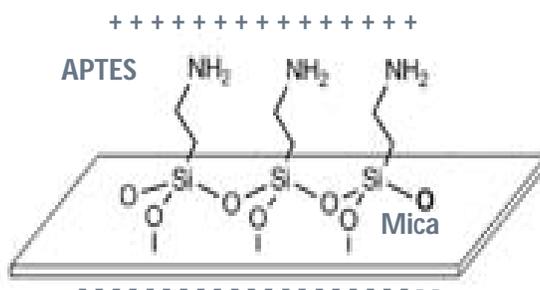


Figura 5.1.1. Grupos positivos expuestos de la molécula APTES sobre mica (AP-mica).
Figura modificada de la referencia [55].

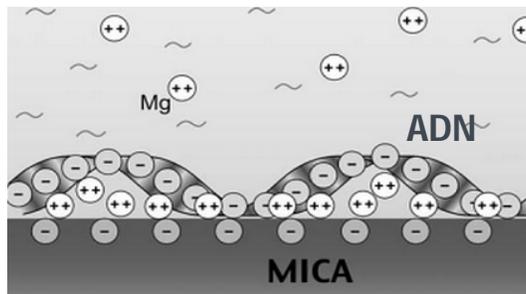


Figura 5.1.2. Inmovilización de moléculas de ADN sobre mica mediante el uso de cationes divalentes (Mg^{2+}). Figura modificada de la referencia [56].

Como se pudo observar en las imágenes de AFM presentadas en el Capítulo 4, la AP-mica resultó ser un buen sustrato para inmovilizar las esferas de PS, aunque no resultó fácil obtener las imágenes respectivas de AFM. Las muestras de esferas sobre AP-mica presentaron una distribución no homogénea (regiones con monocapas, multicapas, huecos sin esferas, etc.), en la que se podían encontrar regiones con multicapas de esferas, haciendo que la superficie de la muestra tuviera mucha rugosidad. Por lo tanto, esto para el AFM se traduce en una variación muy grande de alturas y valles en ciertas regiones, los cuales sobrepasan los límites para el escáner estándar utilizado. Sin embargo, se lograron obtener buenas imágenes de algunas de las regiones en donde se presentaron monocapas de esferas.

En las imágenes de AFM presentadas de los experimentos realizados con el plásmido pCA1, el λ ADN y complejos λ ADN-UDG, la AP-mica no resultó ser un sustrato viable para la obtención de moléculas de ADN extendidas. Al parecer las moléculas de APTES provocan un efecto de condensación sobre el esqueleto de azúcar fosfato del ADN haciendo que se compacte, lo cual es consistente con estudios previos en los que se reportan estructuras condensadas de ADN en forma de toroides debido al uso de esta molécula [57].

Por lo tanto, la modificación de mica con APTES no resultó ser un sustrato adecuado para nuestro objetivo de depositar ADN en una conformación extendida sobre mica.

A diferencia de la AP-mica, la mica sin modificar resultó ser un buen sustrato para la visualización de moléculas relajadas de ADN así como también para la visualización de la unión λ ADN-UDG por medio de AFM. Sin embargo, una limitante del procedimiento de preparación de muestras por el método de deposición convencional, es que las muestras siempre fueron inhomogéneas, es decir, sobre el sustrato se presentaban regiones con diferentes superestructuras de ADN. Una dificultad de esta limitante es que la búsqueda de regiones en donde se encontrara el ADN en conformación extendida resultó impráctico, ya que para encontrar una molécula de interés era necesario adquirir imágenes por AFM durante varias horas o inclusive días. Esta fue la principal motivación para buscar un método de deposición alternativo. El método de *spin-coating*, que se describe más adelante, resultó ser adecuado.

5.2. Obtención de superestructuras de ADN sobre mica

Una de las principales características que buscamos obtener para nuestras muestras, fue que fueran totalmente homogéneas y así pudieran ser analizadas de manera eficiente por medio de AFM. Como pudimos observar en las imágenes de AFM obtenidas para el λ ADN, dependiendo del protocolo de deposición utilizado en la preparación de muestras, se obtuvieron diversas superestructuras en forma de redes de ADN sobre mica. La formación de este tipo de superestructuras de ADN no es buena para poder identificar las interacciones entre ADN y proteína. Sin embargo, el estudio de la formación de superestructuras es de gran interés en campos fuera de la física, en particular en la fisicoquímica de polielectrolitos.

Es bien sabido que el ADN posee la habilidad de autoensamble y de reconocimiento molecular [58]. En nuestros experimentos algunas de las imágenes de AFM obtenidas para el λ ADN muestran cadenas de ADN autoensambladas de distinta manera en diferentes regiones en la misma muestra, formando una variedad de estructuras tipo red hasta la obtención de cadenas bien definidas de ADN. Una característica del método de deposición convencional es

que se obtenía la formación de diferentes tipos de redes para distintas muestras de λ ADN preparadas con el mismo protocolo.

Una posible explicación para la formación de estas superestructuras se deba a que las cadenas del λ ADN son demasiado largas (aprox. 16 μm , lo cual frecuentemente sobrepasa el límite de escaneo del AFM) permitiendo así que se enreden y se vayan agrupando entre ellas hasta llegar a una configuración estable, a la alta densidad de ADN utilizada en solución, pero sobre todo, a que con el método de deposición convencional no se pueden obtener muestras totalmente homogéneas.

Otro posible factor en la formación de estos patrones de redes en nuestras muestras es algún tipo de apantallamiento de cargas debido a las interacciones con la mica, o quizás las redes de ADN ya vienen formadas desde la solución con los iones divalentes y simplemente caen sobre la mica dejando el patrón de red. Lo que sí se sabe es que tanto el sustrato, la densidad de ADN y los iones en solución son parámetros importantes en la formación de redes de ADN [59, 60].

En nuestros experimentos observamos la formación de diferentes tipos de estructuras o redes de ADN en diferentes zonas de un mismo sustrato (utilizando una única preparación de muestras). Este resultado no ha sido reportado con anterioridad, posiblemente debido a que en algunos de estos experimentos las condiciones de humedad o temperatura durante la preparación de la muestra fueron precisamente controladas, o bien debido a que tal vez estas superestructuras sí estuvieron presentes en esos experimentos pero no fueron reportadas debido a que no era el interés principal.

5.3. Obtención de muestras homogéneas mediante el método de deposición de *spin-coating*

Como ya se ha mencionado, el método de deposición elegido es de suma importancia para la obtención de muestras totalmente homogéneas. El uso de la técnica de deposición por *spin-coating* fue el que resolvió el problema de inhomogeneidades en nuestras muestras, logrando así la obtención de sustratos

completamente homogéneos, es decir la obtención de moléculas de ADN extendidas y aisladas en toda la superficie. Esto hizo eficaz la observación de moléculas de λ ADN individuales y de los complejos λ ADN-UDG por medio de AFM. Aunque el método de *spin-coating* es utilizado comúnmente para la obtención de películas delgadas, también es un método que ya ha sido implementado para la obtención de moléculas extendidas de ADN [18].

5.4. Medición de alturas del plásmido pCA1 y del λ ADN, menores al valor esperado

Como sabemos, la molécula del ADN presenta un diámetro de 2 nm en su conformación B en la estructura cristalográfica [5]. En las imágenes obtenidas tanto para el plásmido pCA1 como para las cadenas de λ ADN depositadas por el método convencional en mica, se observó que la mayoría del ADN presentaba una disminución considerable en los valores obtenidos al hacer las mediciones de altura de cadenas respecto al valor esperado de 2 nm (ver Figura 5.4.1). Esta observación es consistente con estudios previos de AFM realizados anteriormente, se ha encontrado que al momento de hacer las mediciones en alturas de cadena del ADN, siempre se presentan valores menores al valor esperado de 2 nm [18, 19, 61, 62]. Las reducciones en alturas observadas en AFM se deben a que el ADN se encuentra embebido en una capa que posiblemente se deba a residuos de sales provenientes de los buffers de deposición. Generalmente esta capa no es uniforme a lo largo de la superficie del sustrato y deja expuestas zonas que no están recubiertas.

En los trabajos realizados por Moreno-Herrero et al., se reportan reducciones en la medición de alturas de cadena de ADN depositado sobre mica en aire, donde se obtienen alturas promedio de 0.7 ± 0.2 nm en moléculas de ADN embebidas en residuos del buffer utilizado y para moléculas de ADN no embebidas alturas promedio de 1.5 ± 0.2 nm [62]. En nuestro caso, la altura obtenida para el plásmido pCA1 fue de 0.5 ± 0.2 nm y para el λ ADN de 0.7 ± 0.2 nm, en ambos casos las moléculas de ADN se encontraban en regiones en presencia de la capa.

Como se muestra en la Figura 4.3.1.3.B del Capítulo 4 se encontraron moléculas de λ ADN que no estaban embebidas, para las cuales se determinó una altura de 1.7 ± 0.1 nm. Este valor se acerca al valor esperado de 2 nm, por lo que existen otros mecanismos que contribuyen a la disminución de alturas obtenidas por AFM. En las imágenes obtenidas para los complejos λ ADN-UDG depositados sobre mica usando el método de deposición de *spin-coating*, se pudo observar que se presentó un incremento en las mediciones en alturas de cadena respecto al método convencional. En general, el promedio global obtenido para las alturas de cadena del λ ADN depositado por *spin-coating* fue de 1.1 ± 0.3 nm, el cual se acerca un poco más al valor esperado de 2 nm. Sin embargo, el valor obtenido sigue siendo menor al valor esperado. De igual manera que para el método de deposición convencional, podemos sugerir que las moléculas de ADN se encuentran embebidas todavía en residuos provenientes de los buffers. Entonces, el uso de la técnica de deposición por *spin-coating* permite que obtengamos películas muchísimo más delgadas y una completa distribución sobre el sustrato de cualquier tipo de residuo proveniente de los buffers, dejando así embebidas las moléculas de ADN en menor grado respecto al método convencional.

Las alturas observadas nunca fueron iguales al valor esperado de 2 nm, lo cual es consistente con estudios previos como ya ha sido mencionado. Otros factores importantes que deben ser tomados en cuenta en la obtención de reducción de alturas, son la deformación inducida sobre el ADN debido a la deshidratación de la molécula, las fuerzas de interacción con la punta de AFM, así como también la compresión de las moléculas de ADN debido a las interacciones electrostáticas residuales con la mica [62].

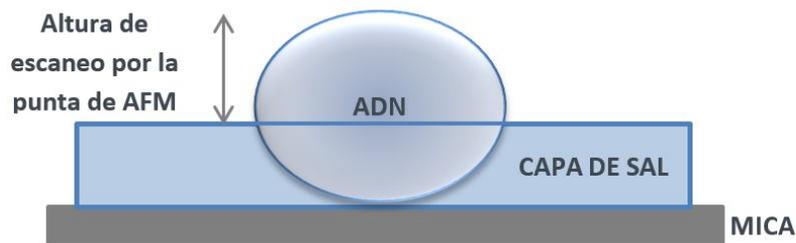


Figura 5.4.1. Modelo de reducción aparente de altura de una molécula de ADN embebida en residuos provenientes del buffer de deposición.

5.5. Medidas de alturas en partículas de UDG presentes sobre el sustrato y sobre las cadenas del λ ADN mediante la técnica de deposición por *spin-coating*

En las imágenes obtenidas por AFM de los experimentos realizados con la proteína UDG, se midieron las alturas de las partículas globulares encontradas sobre el sustrato así como de aquellas que se encontraban sobre las cadenas del λ ADN. Como pudimos ver en el Capítulo 4, solamente se contabilizaron las partículas que midieron más de 1 nm, debido al valor calculado para la UDG que es de 3.6 nm de diámetro. El promedio de los valores encontrados para las partículas globulares sobre el sustrato (mica con y sin formaldehído) fue de 3.7 ± 1.8 nm, lo cual coincide con el valor calculado de altura para la UDG. Un parámetro que nos ayudó a distinguir entre partículas de UDG y partículas residuales (o basura) fueron los valores encontrados para las partículas residuales sobre la mica en los experimentos con ADN sin proteína, donde el valor promedio fue de 1.3 ± 0.8 nm, lo cual se encuentra alejado del valor calculado para el diámetro de la UDG. Es decir, en nuestros experimentos podemos distinguir partículas de UDG de partículas residuales (basura).

En la medición de la altura global de partículas de UDG presentes sobre las cadenas de λ ADN (con y sin formaldehído) se obtuvo un promedio de 3.6 ± 1.7 nm. Teniendo en cuenta el valor calculado del diámetro para la UDG de 3.6 nm y el valor de altura esperado para el ADN de 2 nm, se esperaba obtener un valor

ideal para la altura de partículas de UDG sobre el λ ADN de 5.6 nm. De acuerdo a los valores experimentales, se esperaba obtener un valor para la altura de partículas de UDG sobre el λ ADN de aprox. 4.8 nm, el cual se aproxima al valor promedio obtenido de 3.6 ± 1.7 nm teniendo en cuenta el error. Sin embargo, el valor obtenido sigue siendo menor al valor esperado experimental, esto debido a que tenemos que tomar en cuenta posibles diversos factores (ver Figura 5.5.1) como son:

1. La presencia de una capa residual cubriendo la superficie de la mica, lo cual deja embebidas tanto a las moléculas de UDG como a las moléculas de ADN. De esta manera, no se obtiene la misma distribución de alturas para ambas moléculas por separado.
2. La presencia de algunas moléculas de UDG sobre la mica en forma de monómeros o agrupadas formando oligómeros.
3. Las moléculas de UDG no se encuentran unidas en el punto máximo de altura de la cadena de ADN.

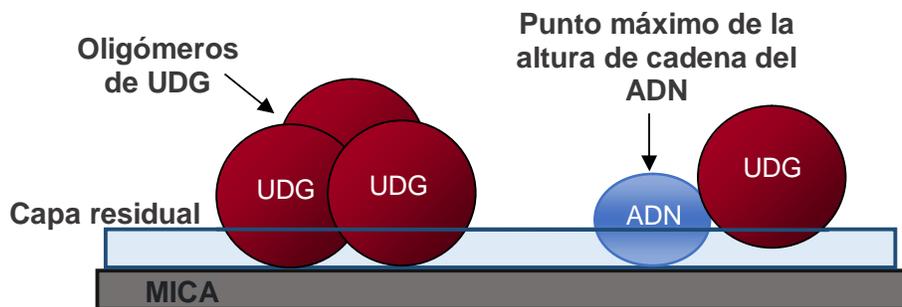


Figura 5.5.1. Factores que afectan la obtención de altura esperada para moléculas de UDG y complejos λ ADN-UDG.

5.6. Probabilidad de unión de la proteína UDG sobre cadenas del λ ADN

Como se pudo observar en las imágenes obtenidas por AFM de los experimentos realizados con el λ ADN y la proteína UDG en presencia y ausencia de formaldehído, se observa que la mayoría de las partículas globulares de UDG se encuentran sobre el sustrato y pocas de ellas sobre sitios a lo largo de las

cadenas del λ ADN. Por lo tanto, es necesario saber si las uniones λ ADN-UDG fueron específicas o si se debió a una simple coincidencia espacial de moléculas de λ ADN y de proteína UDG. Esto lo podemos determinar si comparamos los valores obtenidos para la probabilidad de eventos aleatorios y para la probabilidad experimental que fueron calculados en la sección 4.4.4 del Capítulo 4.

En los experimentos realizados con el λ ADN-UDG en mica (sin formaldehído) se obtuvieron valores para la probabilidad de eventos de unión al azar $P_A = 3.5 \%$ y para la probabilidad experimental $P_E = 6 \%$. En este experimento $P_E > P_A$, lo cual indica que, si suponemos que P_E incluye eventos específicos + eventos al azar y que P_A solo incluye eventos al azar, resulta en aproximadamente un 2.5 % de probabilidad de que la unión λ ADN-UDG haya sido debida a eventos específicos comparado con aproximadamente un 3.5 % de probabilidad de que se deba a eventos aleatorios. Esto significa que estadísticamente no podemos distinguir si la mayor parte de los eventos de unión λ ADN-UDG fueron debidos a interacciones inespecíficas o interacciones al azar. Esta fue una de las razones principales por la que el experimento de unión λ ADN-UDG se realizó en presencia de formaldehído, para capturar de manera covalente los complejos λ ADN-UDG.

En los experimentos realizados con el λ ADN-UDG en mica con formaldehído, los valores obtenidos fueron $P_A = 1.2 \%$ y $P_E = 13.3 \%$. En este caso, al igual que en el experimento anterior $P_E > P_A$ pero aquí la diferencia entre los valores para P_A y P_E es mucho mayor, dando así aproximadamente un 12 % de probabilidad de que los eventos de unión entre λ ADN-UDG hayan sido de manera específica.

Como podemos ver hay una mayor probabilidad de que los eventos de unión λ ADN-UDG se hayan llevado a cabo de manera específica para el caso en el que se utiliza formaldehído. Sin embargo, aun utilizando formaldehído encontramos que una gran cantidad de UDGs no unidas al ADN.

Una manera de poder entender porque la mayoría de las proteínas no se encontraron unidas a cadenas de ADN es comparando el tiempo típico que le llevaría a una proteína llegar a una cadena de ADN y permanecer en ella, respecto al tiempo necesario para que se efectúe la reacción de *cross-link* inducida por el formaldehído.

Para obtener el tiempo típico que le llevaría a una proteína llegar a una cadena de ADN vamos a calcular primero el número de moléculas de λ ADN y el de moléculas de UDG por unidad de volumen en nuestros experimentos. Para realizar este cálculo necesitamos las concentraciones finales de λ ADN ($[C_{ADN}] = 0.44 \text{ ng}/\mu\text{L}$) y de UDG ($[C_{UDG}] = 6.5 \times 10^{-3} \text{ ng}/\mu\text{L}$) que se depositaron sobre mica al momento de preparar las muestras y también necesitamos el valor del peso molecular para el λ ADN ($32 \times 10^6 \text{ Da}$) y para la UDG ($22,717 \text{ Da}$).

Teniendo en cuenta que $1 \text{ Da} = 1.6 \times 10^{-27} \text{ kg}$, entonces el número de moléculas de λ ADN por unidad de volumen es:

$$\frac{[C_{ADN}]}{\text{peso molecular ADN}} = 8.6 \times 10^{12} \text{ moléculas de ADN / L} \quad (8)$$

Y para el número de moléculas de UDG por unidad de volumen tenemos lo siguiente:

$$\frac{[C_{UDG}]}{\text{peso molecular UDG}} = 1.8 \times 10^{14} \text{ moléculas de UDG / L} \quad (9)$$

Ahora vamos a calcular la distancia típica que habría entre moléculas de λ ADN y la que habría entre moléculas de UDG con la siguiente ecuación:

$$\text{Volumen del espacio entre moléculas} = \frac{\text{Volumen total}}{\text{No. de moléculas}} \quad (10)$$

Entonces sustituyendo los valores calculados en (8) y (9) en la ecuación (10), tenemos que para el ADN:

$$\frac{4}{3} \pi d_{ADN}^3 = \frac{0.001 \text{ m}^3}{8.57 \times 10^{12} \text{ moléculas de ADN}} \quad (11)$$

y para la UDG tenemos que:

$$\frac{4}{3} \pi d_{UDG}^3 = \frac{0.001 \text{ m}^3}{1.8 \times 10^{14} \text{ moléculas de UDG}}, \quad (12)$$

donde d_{ADN} es la distancia típica entre moléculas de ADN y d_{UDG} la distancia típica entre moléculas de UDG. Despejando d_{ADN} y d_{UDG} de la ecuación (11) y (12) tenemos que $d_{ADN} \sim 3 \mu\text{m}$ y $d_{UDG} \sim 2 \mu\text{m}$.

A continuación, vamos a suponer que las moléculas de λ ADN están fijas (no se difunden debido a que tienen un peso molecular mucho mayor que la UDG) y que sólo las moléculas de UDG son las que se mueven por difusión. El coeficiente de difusión para la proteína UDG es:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_{UDG}} \quad (13)$$

Donde $k_B T$ es la energía térmica a 25°C (4×10^{-21} J), η es la viscosidad del fluido (para el agua es de 0.001 Kg/m·s) y R_{UDG} es el radio de la proteína UDG (1.8 nm). Sustituyendo estos valores se encuentra que $D = 1.17 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$.

El tiempo típico (t) que le toma a una partícula recorrer una distancia d en 3D por difusión se encuentra por medio de la siguiente relación:

$$\langle d^2 \rangle = 6Dt \quad (14)$$

donde en nuestro caso d es la distancia típica entre moléculas de λ ADN y UDG, D es el coeficiente de difusión para la UDG y t el tiempo característico que le lleva a una molécula de UDG llegar a un λ ADN por difusión. Puesto que el valor calculado para las distancias típicas entre moléculas de λ ADN y entre moléculas de UDG es similar, vamos a estimar una distancia típica entre moléculas de λ ADN y moléculas de UDG de 2 μm . Entonces introduciendo los valores conocidos en la ecuación (14) y despejando el tiempo nos queda que $t \approx 6 \text{ ms}$.

Por otra parte, se sabe que una vez que la proteína UDG llega a una cadena de ADN, permanece un cierto tiempo unida (tiempo de residencia) antes de desprenderse. El tiempo de residencia (T_R) de la proteína UDG por moléculas de

ADN reportado es de 5 ms [34], el cual es similar al tiempo típico calculado de 6 ms para que una molécula de UDG llegue a un λ ADN.

El tiempo total de incubación en los experimentos realizados con el λ ADN-UDG en mica es de aprox. 16 min y para λ ADN-UDG en mica con formaldehído de aprox. 27 min. Comparando estos valores con el tiempo típico que le llevaría a una molécula de UDG llegar a un λ ADN ($t = 6$ ms), habría del orden de miles de eventos de una UDG chocando con moléculas de ADN. Teniendo en cuenta este resultado, tendríamos que las moléculas de UDG estarían colisionando constantemente con moléculas de λ ADN (del orden de miles de veces durante todo el tiempo de incubación), donde a una sola molécula de UDG le llevaría un tiempo de 6 ms para chocar con un ADN y una vez que ya hace contacto, la proteína permanecería en la cadena de ADN un tiempo $T_R = 5$ ms (tiempo de residencia) antes de despegarse de nuevo. Por lo tanto, en nuestros experimentos se esperaría observar cadenas de λ ADN completamente decoradas por la proteína UDG. Sin embargo, como se pudo observar en las imágenes presentadas de AFM, esto no es lo que ocurre.

Para explicar lo que posiblemente esté ocurriendo en nuestros experimentos, vamos a analizar los dos casos, sin formaldehído y con formaldehído:

1. Experimentos realizados sin el uso de formaldehído.

A diferencia del caso en el que se utilizó formaldehído, aquí todo el tiempo la proteína UDG estaría en constante unión y desunión de las cadenas del λ ADN (ver Figura 5.5.2). En este caso, existe la posibilidad de que ocurran del orden de miles de choques por la proteína UDG con el ADN, pero tan pronto como la proteína llegue a una cadena de ADN, permanecería ahí un tiempo $T_R = 5$ ms y luego se desprendería. De esta manera podríamos esperar que en nuestras imágenes de AFM hubiéramos capturado un instante dado en el que la mayoría de las proteínas se encontraran unidas a cadenas de ADN. Sin embargo, el paso crítico en esta preparación ocurre al utilizar el método de *spin-coating* donde la concentración efectiva de UDG disminuye debido a la fuerza centrífuga que se está ejerciendo sobre la solución a depositar, haciendo que la disponibilidad de

que una proteína interaccione con un ADN disminuya de manera considerable, dando lugar a que en nuestras imágenes solo observemos unas cuantas moléculas de UDG unidas a cadenas de λ ADN.

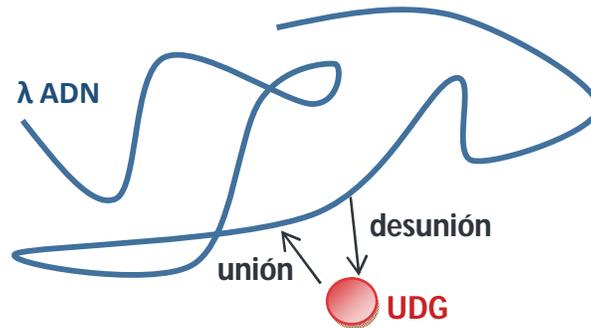


Figura 5.6.2. Modelo de una molécula de UDG en constante unión y desunión de la cadena de λ ADN. Una vez que una UDG se encuentra con una cadena de λ ADN, se une a ella, permanece sobre la cadena deslizándose un tiempo T_R , y después se desprende.

2. Experimentos realizados utilizando formaldehído.

Se sabe que el formaldehído actúa como un *cross-link* entre ADN y proteína uniéndolos de manera covalente, generando entrecruzamientos que abarcan aproximadamente 2 \AA [63], por lo tanto se obtienen uniones covalentes entre la proteína UDG y el λ ADN. Como ya vimos, la proteína UDG tendría una posibilidad del orden de miles de intentos de interactuar con un ADN. Una vez que se lleve a cabo esta interacción, la proteína UDG permanece unida al λ ADN sin que se desprenda debido a la unión covalente que se genera con el uso del formaldehído (ver Figura 5.6.1). De esta manera, esperaríamos que el λ ADN estuviera completamente decorado por proteína. Sin embargo, en las imágenes obtenidas por AFM se pudo observar que sólo unas cuantas moléculas de UDG se encuentran unidas a cadenas de λ ADN. Podemos explicar esta observación tomando en cuenta lo siguiente. Experimentos recientes han mostrado que el tiempo mínimo para que se complete el *cross-link* entre una proteína y ADN por medio de formaldehído es de $t_{\text{cross-link}} = 5 \text{ s}$ [64]. Dado que el tiempo de residencia ($T_R = 5 \text{ ms}$) es mucho menor que el tiempo para que se complete la reacción de *cross-link* (de 5 s), la reacción es poco efectiva y de esta manera solamente se

completa el enlace para unas pocas moléculas de UDG. Aun así, el uso de formaldehído ayuda a retener la formación de complejos λ ADN-UDG.

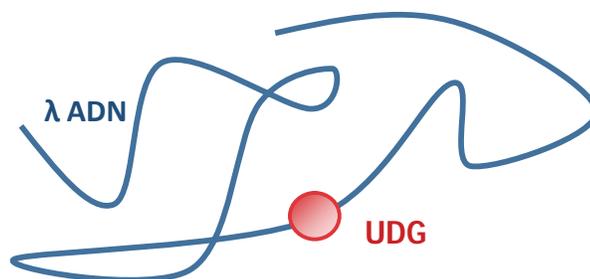


Figura 5.5.2. Modelo ideal de una molécula de UDG unida de manera covalente a la cadena de λ ADN. Una vez que una UDG se encuentra con una cadena de λ ADN, se va a unir a ella y va a permanecer en el sitio de unión sin desprenderse. Sin embargo, como se explica en el texto la unión no es efectiva debido al tiempo mínimo de residencia.

5.7. Dobleces inducidos por moléculas de UDG sobre sitios de unión en las cadenas del λ ADN

Uno de los modelos propuestos de interacción entre ADN-proteína del cual se habló en el Capítulo 1, es aquel en el que la proteína va doblando sitios a lo largo de las cadenas de ADN hasta encontrar el sitio específico para comenzar a realizar su función. En diferentes trabajos realizados por AFM, se ha reportado la evidencia de este tipo de doblamientos causados por la unión de ciertas proteínas sobre cadenas de ADN [25, 65].

En nuestros experimentos pudimos observar algunos de estos eventos, en los que la proteína UDG induce dobleces sobre sitios en las cadenas del λ ADN. Sin embargo este tipo de eventos no fueron encontrados de manera frecuente. De 108 moléculas de UDG contabilizadas sobre cadenas del λ ADN en nuestras imágenes de AFM, solo 6 moléculas de UDG presentaron doblez significativo sobre el sitio de unión con las cadenas del λ ADN, lo que corresponde a aproximadamente un 5.5 % del total. Este hecho nos hace pensar que posiblemente el modelo de reconocimiento por deformación del ADN solo sea válido para un cierto tipo de

interacciones ADN-proteína, pero no para la interacción λ ADN-UDG realizado en este trabajo de tesis.

En experimentos realizados por John van Noort et al, se obtuvo que la proteína fotoliasa (proteína reparadora de daños en cadenas de ADN causados por radiación) solamente inducía dobleces significativos en sitios específicos en cadenas de ADN previamente dañadas [65]. Este resultado difiere de lo reportado por Chen et al., donde se menciona que la interacción de la proteína hOGG1 (proteína reparadora de daños en ADN, presente en células de seres humanos) induce dobleces sobre sitios en las cadenas de ADN con o sin daños inducidos [25].

Un hecho importante por recordar es que en nuestros experimentos, las cadenas de λ ADN no tienen ningún tipo de daño inducido, pudiendo ser la razón de que no se presentara este fenómeno de doblamiento de manera frecuente.

CAPÍTULO 6

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Como conclusión general de este trabajo de tesis, se desarrolló un protocolo óptimo de preparación para muestras de ADN y también para complejos de ADN-proteína. Se demostró que estos protocolos son prácticos y reproducibles. Con esto se cumplió el objetivo principal de esta tesis.

A partir de las observaciones realizadas en nuestros experimentos, podemos mencionar las siguientes conclusiones:

1. La AP-mica no es un sustrato favorable para la obtención de moléculas de ADN extendidas y aisladas. Como pudimos observar en los Capítulos 4 y 5, el APTES tiende a condensar las cadenas de ADN tanto para el plásmido como para el λ ADN.
2. La mica sin modificar es un buen sustrato para la deposición de ADN. En este caso, un requisito es que los buffers de deposición deben contener concentraciones del orden de 1-10 mM de cationes monovalentes o divalentes para poder fijar las moléculas de ADN sobre la mica y ser analizadas por AFM.
3. Utilizando método de deposición convencional, se observó la formación de superestructuras de ADN sobre mica. Estas superestructuras son de interés en el campo de la fisicoquímica de polielectrolitos. Sin embargo, en esta tesis no profundizamos en este tema.
4. La técnica de *spin-coating* resultó efectiva para obtener sustratos completamente homogéneos, lo cual permitió análisis reproducibles por medio de AFM. Como pudimos observar en las imágenes presentadas de

AFM en el Capítulo 4, se obtuvieron mejores resultados de deposición de cadenas de λ ADN aisladas usando mica como sustrato y utilizando la técnica de deposición de *spin-coating*, lo cual fue ideal para la observación directa de la interacción entre la proteína UDG y λ ADN.

5. Se logró la observación de complejos λ ADN-UDG por medio de AFM sin el uso de formaldehído. Sin embargo, se encontró una cantidad pequeña de complejos. No es estadísticamente posible distinguir entre eventos de unión al azar y eventos de unión específicos.
6. El uso de formaldehído como *cross-link* incrementó la estabilidad de unión entre λ ADN-UDG. Sin embargo, debido al corto tiempo de residencia reportado para la UDG comparado con el tiempo necesario para que se complete el *cross-link*, observamos una cantidad pequeña de complejos. A pesar de ello, en este caso si es estadísticamente posible distinguir entre eventos de unión al azar y eventos de unión específicos.
7. Nuestros experimentos sugieren que el proceso de reconocimiento entre λ ADN-UDG no ocurre mediante el doblamiento de sitios a lo largo de las cadenas del ADN. Posiblemente, este proceso de reconocimiento no se cumple para cualquier familia de proteínas reparadoras. O bien, la proteína UDG solamente es capaz de doblar el ADN en sitios dañados.

PERSPECTIVAS

Aunque en la literatura se han reportado una variedad de estudios sobre la formación de complejos ADN-proteína, el mecanismo de unión y reconocimiento no ha sido establecido ya que posiblemente no es único.

En este sentido, el trabajo de esta tesis proporciona elementos adicionales para ser considerados en el estudio de las interacciones ADN-proteína in vitro por medio de AFM. En particular, para poder entender mejor cómo es que se lleva a cabo el proceso de interacción en los complejos λ ADN-UDG, se proponen experimentos adicionales que por cuestiones de tiempo no se pudieron realizar.

Algunos de estos posibles experimentos a realizar son:

- Modificar moléculas de λ ADN introduciendo daños en sitios específicos a lo largo de las cadenas y analizar cómo se lleva a cabo la interacción con la proteína UDG.
- Realizar experimentos con incubaciones de λ ADN-UDG y formaldehído a diferentes tiempos (utilizando cadenas de λ ADN con y sin daños introducidos), y verificar si el número de complejos λ ADN-UDG se incrementa.
- Respecto a la formación de superestructuras de ADN, realizar experimentos sistemáticos cambiando condiciones de deposición para comprender el mecanismo de su formación.

REFERENCIAS

- [1] Alberto Juan Solari, *Genética humana: fundamentos y aplicaciones en medicina*, Editorial Médica Panamericana, 3ª ed. 2007 pag.85.
- [2] Mary K. Campbell y Shawn O. Farrell, *Bioquímica*, Thomson International, 4a ed., 2004, pag.236.
- [3] Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter, *Molecular Biology of The Cell*, Fifth Edition, Garland Science, 2008, pag. 198 y 299.
- [4] Geoffrey M. Cooper, Robert E. Hausman, *La Célula*, 5a Edición, Sinauer Associates Incorporated, 2009, pag.94, 95, 196, 197, 253.
- [5] David W. Ussery, *DNA Structure: A-, B- and Z-DNA Helix Families*, *ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES*, Macmillan Publishers Ltd, Nature Publishing Group, 2002.
- [6] Lodish, Berk, Matsudaira, Kaiser, Krieger, Scott, Zipursky, Darnell, *Molecular Cell Biology*, Fifth Edition, 2004, pag.105.
- [7] Sabine Müller, *Nucleic Acids from A to Z*, WILEY-VCH, 2008, pag.84.
- [8] Zhi Xie, Shaohui Hu, Jiang Qian, Seth Blackshaw, Heng Zhu, Systematic characterization of protein-DNA interactions, *Cell. Mol. Life Sci.*, 68:1657–1668, 2011.
- [9] Blouin S, Craggs TD, Lafontaine DA, Penedo JC, Functional studies of DNA-protein interactions using FRET techniques, *Methods Mol Biol.*, 543:475-502, 2009.
- [10] Marc Vidal, Rainer K. Brachmann, Ali Fattaey, Ed Harlow y Jef D. Boeke, Reverse two-hybrid and one-hybrid systems to detect dissociation of protein-protein and DNA-protein interactions, *Genetics*, Vol. 93, pp. 10315-10320, 1996.
- [11] Ruth S. Spolar and M. Thomas Record Jr., Coupling of Local Folding to Site-Specific Binding of Proteins to DNA, *SCIENCE*, VOL. 263, 1994.

- [12] Junji Iwahara & G. Marius Clore, Detecting transient intermediates in macromolecular binding by paramagnetic NMR, NATURE LETTERS, Vol 440, 2006.
- [13] Jared B. Parker, Mario A. Bianchet, Daniel J. Krosky, Joshua I. Friedman, L. Mario Amzel & James T. Stivers, Enzymatic capture of an extrahelical thymine in the search for uracil in DNA, NATURE ARTICLES, Vol 449, 2007.
- [14] Gina M. Perez-Howard, P. Anthony Weil, and Joseph M. Beechem, Yeast TATA Binding Protein Interaction with DNA: Fluorescence Determination of Oligomeric State, Equilibrium Binding, On-Rate, and Dissociation Kinetics, Biochemistry, 34(25): 8005–8017, 1995.
- [15] Binnig G, Quate CF y Gerber C, Atomic Force Microscope, Physical Review Letters, Vol. 56, No.9, 930-933, 1986.
- [16] Zhiguo Liu, Zhuang Li, Hualan Zhou, Gang Wei, Yonghai Song and Li Wang, Imaging DNA Molecules on Mica Surface by Atomic Force Microscopy in Air and in Liquid, MICROSCOPY RESEARCH AND TECHNIQUE, 66:179–185, 2005.
- [17] M. J. Allen, E. M. Bradbury y R. Balhorn, AFM analysis of DNA–protamine complexes bound to mica, Nucleic Acids Research, Vol. 25, 11 2221–2226, 1997.
- [18] Jing Yong Ye, Kazuo Umemura, Mitsuru Ishikawa y Reiko Kuroda, Atomic Force Microscopy of DNA Molecules Stretched by Spin-Coating Technique, Analytical Biochemistry 281, 21-25, 2000.
- [19] J. Vesenska, T. Marsh, E. Henderson y C. Vellandi, THE DIAMETER OF DUPLEX AND QUADRUPLEX DNA MEASURED BY SCANNING PROBE MICROSCOPY, Scanning Microscopy Vol. 12, No. 2, 1998.
- [20] Darren M. Gowers y Stephen E. Halford, Protein motion from non-specific to specific DNA by three-dimensional routes aided by supercoiling, EMBO J., 22(6): 1410–1418, 2003.
- [21] Schonhott JD, Stivers JT, Timing facilitated site transfer of an enzyme on DNA, Nat Chem Biol 8: 205-210, 2012.
- [22] Peter H. von Hippel, and Otto G. Berg, Facilitated Target Location in Biological Systems, THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Vol.264, No.2, 675-678, 1989.

- [23] Akinori Sarai y Hidetoshi Kono, PROTEIN-DNA RECOGNITION PATTERNS AND PREDICTIONS, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 34:379–98, 2005.
- [24] Remo Rohs, Xiangshu Jin, Sean M. West, Rohit Joshi, Barry Honig, and Richard S. Mann, Origins of Specificity in Protein-DNA Recognition, *Annual Review of Biochemistry*, 79: 233-269, 2010.
- [25] Liwei Chen, Karl A. Haushalter, Charles M. Lieber and Gregory L. Verdine, Direct visualization of a DNA Glycosylase Searching for Damage, *Chemistry & Biology*, Vol.9, 345-350, 2002.
- [26] Nussbaum, McInnes, Willard, *Genética en Medicina*, Thompson & Thompson, 5ª edición, pag.39.
- [27] Corey R. Woods, *Frontiers in DNA Research*, Nova Science Publishers, 2006, pag.84.
- [28] Gerard J. Tortora, Berdell R. Funke, Christine L. Case, *Introducción a la microbiología*, Editorial Médica Panamericana, 9ª edición, 2007, pag.391.
- [29] Concepción J. Puerta B, Claudia P. Ureña P., *Prácticas de Biología Molecular*, Editorial Pontificia Universidad Javeriana, Colección Biblioteca del Profesional, 2005, pag. 31.
- [30] Hernández Candia, C. N., Tafoya Martínez, S. & Gutiérrez-Medina, B. A minimal optical trapping and imaging microscopy system, *PLoS ONE* 8, e57383, 2013.
- [31] Jared B. Parker, Mario A. Bianchet, Daniel J. Krosky, Joshua I. Friedman, L. Mario Amzel y James T. Stivers, Enzymatic capture of an extrahelical thymine in the search for uracil in DNA, *Nature*, Vol 449|27, 2007.
- [32] Sudip S. Parikh, Clifford D. Mol, Geir Slupphaug, Sangeeta Bharati, Hans E. Krokan and John A. Tainer, Base excision repair initiation revealed by crystal structures and binding kinetics of human uracil-DNA glycosylase with DNA, *The EMBO Journal* Vol.17 No.17 pp.5214–5226,1998.
- [33] Stuart R. W. Bellamy y Geoffrey S. Baldwin, A kinetic analysis of substrate recognition by uracil-DNA glycosylase from herpes simplex virus type 1, *Nucleic Acids Research*, Vol.29,No.18,3857-3863, 2001.

- [34] Rishi H. Porecha and James T. Stivers, Uracil DNA glycosylase uses DNA hopping and short-range sliding to trap extrahelical uracils, PNAS, vol. 105, no. 31, 10791–10796, 2008.
- [35] <http://es-mx.invitrogen.com>
- [36] <http://worldwide.promega.com/country.aspx?returnUrl=/resources/protocols/technical-manuals/0/pureyield-plasmid-maxiprep-system-protocol/>
- [37] DAVID B. HALL, PATRICK UNDERHILL y JOHN M. TORKELESON, Spin Coating of Thin and Ultrathin Polymer Films, POLYMER ENGINEERING AND SCIENCE, 1998, Vol. 38, No. 12, 1998.
- [38] Marta Rosel Pérez Morales, PELÍCULAS ORGÁNICAS DELGADAS PREPARADAS MEDIANTE DIVERSOS MÉTODOS, PROPIEDADES ÓPTICAS, MORFOLÓGICAS Y ELÉCTRICAS, Tesis Doctoral, Departamento de Química Física y Termodinámica Aplicada, Universidad de Córdoba, 2005.
- [39] Cheryl R. Blanchard, Atomic Force Microscopy, The Chemical Educator, Springer-Verlag, Vol.1, No.5, 1996.
- [40] Gerd Binnig and Heinrich Rohrer, Scanning Tunneling Microscopy-from birth to adolescence, Reviews of Modern Physics, Vol.59, No.3, Part 1, 1987.
- [41] Franz J. Giessibl, Advances in atomic force microscopy, Reviews of Modern Physics, 2002.
- [42] Nancy Anabel Gerling Cervantes, Formación de estructuras Autoensambladas de RNA en presencia de sales mono y multivalentes, Tesis de Licenciatura, U.A.S.L.P., 2009.
- [43] Los sistemas terrestres y sus implicaciones medioambientales, Ministerio de Educación y Ciencia, 2004, pag. 61.
- [44] <http://www.schaefer-tec.com/en/germany/products/scanning-probe-microscopy/mikromasch.html>
- [45] A Practical Guide to SPM Scanning Probe Microscopy, Veeco, http://www.veeco.com/pdfs/library/spm_guide_0829_05_166.pdf
- [46] http://ocw.uc3m.es/ciencia-e-oin/microscopia-de-fuerza-atmica/otros-recursos-1/Apuntes_STM_y_AFM_00.pdf

- [47] Kailash C. Khulbe, C. Y. Feng, Takeshi Matsuura, Synthetic Polymeric Membranes: Characterization by Atomic Force Microscopy, Springer Laboratory, 2008, pag. 22 y 23.
- [48] http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB8686147.htm
- [49] Laurel Ng, Alan J. Grodzinsky, Parth Patwari, John Sandy, Anna Plaas y Christine Ortiz, Individual cartilage aggrecan macromolecules and their constituent glycosaminoglycans visualized via atomic force microscopy, Journal of Structural Biology, 242–257, 2003.
- [50] Xue-Ming Xu y Atsushi Ikai, Recovery and amplification of plasmid DNA with atomic force microscopy and the polymerase chain reaction, Elsevier Science B.V., 1-7, 1998.
- [51] Zhiguo Liu, Zhuang Li, Hualan Zhou, Gang Wei, Yonghai Song y Li Wang, Imaging DNA Molecules on Mica Surface by Atomic Force Microscopy in Air and in Liquid, MICROSCOPY RESEARCH AND TECHNIQUE, 66:179–185, 2005.
- [52] Jonathon Howard, Mechanics of motor proteins and the cytoskeleton, Sinauer Associates, 2001 pag.14.
- [53] Hoja de datos BioLabs, Afu Uracil-DNA glycosylase (UDG), M0279S.
- [54] David Pastré, Olivier Piétrement, Stéphane Fusil, Fabrice Landousy, Josette Jeusset, Marie-Odile David, Loïc Hamon, Eric Le Cam y Alain Zozime, Adsorption of DNA to Mica Mediated by Divalent Counterions: A Theoretical and Experimental Study, Biophysical Journal, 2003, 2507–2518, 2003.
- [55] Yongjuan Mi, Zhaofeng Wang, Xiaohong Liu, Shengrong Yang, Honggang Wang, Junfei Ou, Zhangpeng Li and Jinqing Wang, A simple and feasible *in-situ* reduction route for preparation of graphene lubricant films applied to a variety of substrates, J. Mater. Chem., 22, 8036-8042, 2012.
- [56] Bhanu P. Jena, J. K. Heinrich Hörber, John Wiley & Sons, Force Microscopy: Applications in Biology and Medicine, 2006, pag. 224.
- [57] Ye Fang and Jan H. Hoh, Surface-directed DNA condensation in the absence of soluble multivalent cations, Nucleic Acids Research, Vol. 26, No. 2, 588-593, 1998.

- [58] Reda Hassanien, Said A Farha Al-Said, Lidija Siller, Ross Little, Nicholas G Wright, Andrew Houlton and Benjamin R Horrocks, Smooth and conductive DNA-templated Cu₂O nanowires: growth morphology, spectroscopic and electrical characterization, IOP PUBLISHING, Nanotechnology, 2012.
- [59] Young-Sang Jo, Younghun Lee, Yonghan Roh, Roles of buffer solution and substrate surface on the characteristic of DNA network formed on SiO₂, Materials Science and Engineering, 2003.
- [60] ZHANWEN XIAO, MINGXIANG XU, TAIZO OHGI, KEISUKE SAGISAKA, DAISUKE FUJITA, Controlled assembly of DNA nanostructures on silanized silicon and mica surfaces for future molecular devices, Superlattices and Microstructures, Vol. 32, No. 4–6, 2002.
- [61] Thomas Thundat, David P. Allison and Robert J. Warmack, Stretched DNA structures observed with atomic force microscopy, Nucleic Acids Research, Vol. 22, 4224-4228, No. 20, 1994.
- [62] F. Moreno-Herrero, J. Colchero, A.M. Baró, DNA height in scanning force microscopy, Elsevier Science B.V., Ultramicroscopy, 167–174, 2003.
- [63] Ping-Yao Zeng, Christopher R. Vakoc, Zhu-Chu Chen², Gerd A. Blobel y Shelley L. Berger, In vivo dual cross-linking for identification of indirect DNA-associated proteins by chromatin immunoprecipitation, BioTechniques 41:694-698, 2006.
- [64] Lars Schmiedeberg, Pete Skene, Aimée Deaton, Adrian Bird, A Temporal Threshold for Formaldehyde Crosslinking and Fixation, PLoS ONE 4(2): e4636, 2009.
- [65] DNA bending by photolyase in specific and non-specific complexes studied by atomic force microscopy, John van Noort, Francesco Orsini, Andre Eker, Claire Wyman, Bart de Grooth y Jan Greve, Nucleic Acids Research, Vol. 27, No. 19, 3875–3880, 1999.