



Universidade Estadual de Campinas

Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação

DEPARTAMENTO DE TELEMÁTICA

Modelos Matemáticos para a Previsão de Recombinações Sítio-Específica do DNA

Autora: Andréa Santos Leite da Rocha

Orientador: Prof. Dr. Reginaldo Palazzo Júnior

Banca Examinadora:

| | |
|--|---------------------|
| Prof. Dr. Reginaldo Palazzo Júnior | FEEC/UNICAMP |
| Prof ^a . Dr ^a . Carmen Silvia Bertuzzo | FCM/UNICAMP |
| Prof. Dr. Geraldo Pompeu Junior | UNESP/Guaratinguetá |
| Prof. Dr. Walter da Cunha Borelli | FEEC/UNICAMP |

Tese apresentada na Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação da Universidade Estadual de Campinas, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Elétrica.

Campinas - SP

Abril de 2004

Modelos Matemáticos para a Previsão de Recombinações Sítio-Específica do DNA

Este exemplar corresponde à redação final da dissertação devidamente corrigida e defendida por Andréa Santos Leite da Rocha e aprovada pela banca examinadora.

Campinas, 22 de Abril de 2004.

Prof. Dr. Reginaldo Palazzo Júnior
Orientador

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Reginaldo Palazzo Júnior
Prof^a. Dr^a. Carmen Silvia Bertuzzo
Prof. Dr. Geraldo Pompeu Júnior
Prof. Dr. Walter da Cunha Borelli

Tese apresentada na Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação da Universidade Estadual de Campinas, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Elétrica.

Para o meu filho, Henrique Esteban.

*Roubei tantas horas ao teu convívio
para poder escrever esta dissertação.
Por isso ela te pertence, meu amor.*

Dedico

Ao meu marido, Gerson, que sempre me apoiou nos momentos difíceis, demonstrando sempre muito amor, carinho e compreensão. Meu grande exemplo de força.

Aos meus pais, Antonio e Maria. Em especial à minha mãe, companheira e amiga em todas as horas, sempre forte e perseverante. Minha inspiração e fonte de firmeza em todos os obstáculos da vida. Meu grande exemplo de vida.

À minha irmã, Kátia, meu braço direito e companheira, minha amiga de todas as horas.

À minha grande amiga, Luzinete, que com seu carinho sempre esteve ao meu lado me dando força e me incentivando em vários momentos. Meu grande exemplo de determinação.

Obrigada.

Dedico

Agradecimentos ¹

Ao Prof. Dr. Reginaldo Palazzo Jr., pela sua excelente orientação, disposição e competência durante o desenvolvimento do trabalho. Em especial, à sua paciência e compreensão nos momentos difíceis que passei no decorrer deste trabalho.

Aos professores membros da banca examinadora pela disponibilidade e atenção dispensada ao trabalho, bem como por suas valiosas sugestões.

Ao meu marido Gerson pelo seu constante apoio no decorrer deste trabalho.

À minha amiga, Susana, que com carinho e dedicação cuidou do meu filho nas horas em que estive ausente.

De modo geral, agradeço a todos meus amigos e colegas que, direta ou indiretamente, contribuíram para realização deste trabalho.

¹Este trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq

Resumo

Esta dissertação trata da aplicação de métodos polinomiais e topológicos que além de permitir uma classificação rigorosa das moléculas de DNA que formam Nós e Catenanes indicando a estrutura das moléculas relacionadas, são capazes de distinguir entre um número muito grande de Nós e Catenanes qual deverá surgir como produto da recombinação. A motivação principal para esta pesquisa foi o fato de que através da aplicação desses métodos polinomiais e topológicos foram construídos alguns modelos matemáticos capazes de prever os produtos da recombinação. Neste trabalho, tais modelos são construídos da seguinte maneira: No caso de recombinação que possui sítios com repetições diretas, emprega-se a técnica polinomial baseada nas experiências com a enzima *resolvase Tn3* para determinar os produtos deste tipo de recombinação; No caso de recombinação que possui sítios com repetições inversas, aplica-se a técnica polinomial baseada nas experiências com a enzima *integrase* para determinar os produtos deste tipo de recombinação.

Abstract

This work deals with the application of polynomial and topological methods that in addition to allowing a rigorous classification of DNA molecules forming knots and catenanes, indicate the structure of the related molecules. The power of topological methods lies in the ability to distinguish alternative models by predicting which ones, among an often astronomic number of knots and catenanes, should arise as products of the recombination. The main motivation for this research was the fact that through the application of this polynomial and topological methods some mathematical models are built; these models are capable to predict the products of the recombination. In the case of recombination that has sites with direct repetitions, we use the polynomial method, which is based on laboratory experiments using resolvase Tn3 enzyme to determine the products of this type of recombination. In the case of recombination that has sites with inverted repetitions, we use the polynomial method, which is based on laboratory experiments using integrase enzyme to determine the products of this type of recombination.

Conteúdo

| | |
|---|----------|
| Dedicatória | ii |
| Dedicatória | iii |
| Agradecimentos | iv |
| Resumo | v |
| Abstract | v |
| Lista de Figuras | ix |
| Lista de Tabelas | xii |
| 1 Introdução | 1 |
| 1.1 Histórico | 1 |
| 1.2 Apresentação do Problema | 2 |
| 1.3 Descrição do Trabalho | 3 |
| 2 A Recombinação do DNA e Os Ácidos Nucléicos | 5 |
| 2.1 A Célula | 6 |
| 2.1.1 Como surgiu a célula | 6 |
| 2.1.2 Tipos de células | 7 |
| 2.1.3 Bactérias e Bacteriófagos | 8 |
| 2.2 Nucleotídeos e Ácidos Nucléicos | 8 |
| 2.2.1 A estrutura das moléculas | 9 |
| 2.2.2 A molécula de DNA | 11 |
| 2.3 Como o DNA se Duplica - Duplicação | 14 |
| 2.4 Como o DNA Fabrica o mRNA - Transcrição | 15 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 2.5 | Síntese de Proteínas - Tradução | 17 |
| 2.5.1 | O Código genético | 17 |
| 2.5.2 | Tipos de RNA que participam da tradução | 18 |
| 2.6 | Recombinação do DNA | 19 |
| 2.6.1 | Recombinação homóloga | 19 |
| 2.6.2 | Recombinação sítio-específica - Integração | 20 |
| 2.6.3 | Recombinação transposicional sítio-específica | 21 |
| 2.6.4 | Correlações clínicas | 24 |
| 2.7 | Como Ocorre o Processo de Recombinação | 25 |
| 2.8 | Aproximação Topológica para Enzimologia | 26 |
| 2.9 | Conclusões | 28 |
| 3 | Os Invariantes Polinomiais | 29 |
| 3.1 | O Polinômio de Lickorish-Millet e o Teorema Principal | 30 |
| 3.2 | O Polinômio de Jones e o Quarto Estado | 33 |
| 3.3 | Exemplos Especiais da Aplicação Polinomial | 37 |
| 3.3.1 | As duas cópias do Nó trivial | 37 |
| 3.3.2 | A Catenane R_p sentido direito paralela com interligação única . . . | 38 |
| 3.3.3 | A Catenane L_p sentido esquerdo paralela com interligação única . . | 39 |
| 3.3.4 | O Nó <i>trifólico</i> positivo, T_+ | 40 |
| 3.3.5 | O Nó <i>trifólico</i> negativo, T_- | 41 |
| 3.3.6 | A Catenane RD_p sentido direito paralela com interligação dupla . | 41 |
| 3.3.7 | A Catenane RD_{ap} sentido direito antiparalela com interligação dupla | 42 |
| 3.3.8 | A Catenane LD_p sentido esquerdo paralela com interligação dupla . | 43 |
| 3.3.9 | A Catenane LD_{ap} sentido esquerdo antiparalela com interligação dupla | 44 |
| 3.3.10 | O Nó 4-cruzamentos, F | 44 |
| 3.4 | Aplicações do Polinômio de Jones para o DNA | 45 |
| 3.4.1 | Passagem de Segmento e Troca de Segmento | 45 |
| 3.4.2 | Modelo de recombinação <i>resolvase</i> $Tn3$, <i>in vitro</i> | 46 |
| 3.4.3 | Modelo de recombinação <i>Integrase</i> fago lambda (λ), <i>in vitro</i> | 50 |
| 3.5 | Tabela de Polinômios | 56 |
| 3.6 | Conclusões | 58 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 4 | Método de Aplicação do Polinômio de Jones para Nós Primos e Catenanes Diméricas | 59 |
| 4.1 | Nó Primo 5_1 | 59 |
| 4.2 | Nó Primo 7_7 | 61 |
| 4.3 | Catenane Dimérica 5_1^2 | 65 |
| 4.4 | Catenane Dimérica 7_7^2 | 67 |
| 4.5 | Conclusões | 71 |
| 5 | Aplicação do Polinômio de Jones na Recombinação do Nó Primo 5_1 | 72 |
| 5.1 | Introdução | 72 |
| 5.2 | Recombinação do Nó Primo 5_1 com Sítios Repetidos Diretamente (RD) . . | 73 |
| 5.2.1 | Recombinação gerando um nó (+) em cada rodada da recombinação | 73 |
| 5.2.2 | Recombinação gerando um nó (-) em cada rodada da recombinação | 80 |
| 5.3 | Recombinação do Nó Primo 5_1 com Sítios Repetidos Inversamente (RI) . . | 86 |
| 5.3.1 | Recombinação gerando um nó (+) em cada rodada da recombinação | 86 |
| 5.3.2 | Recombinação gerando um nó (-) em cada rodada da recombinação | 92 |
| 5.4 | Construção de um Modelo Matemático para Recombinações de Nós Primos com Sítios RD da Família Plectonêmica | 99 |
| 5.5 | Conclusões | 100 |
| 6 | Conclusões | 102 |
| 6.1 | Contribuições | 102 |
| 6.2 | Propostas para Trabalhos Futuros | 103 |
| | Referências Bibliográficas | 104 |

Lista de Figuras

| | | |
|------|---|----|
| 2.1 | Célula eucariótica. | 8 |
| 2.2 | Célula procariótica. | 8 |
| 2.3 | Bases Nitrogenadas do DNA. | 9 |
| 2.4 | Nucleotídeos do DNA. | 10 |
| 2.5 | Bases Nitrogenadas do RNA. | 10 |
| 2.6 | Nucleotídeos do RNA. | 11 |
| 2.7 | Formas tautoméricas das bases. | 12 |
| 2.8 | Estrutura tridimensional do DNA. | 13 |
| 2.9 | Fitas complementares de DNA. | 13 |
| 2.10 | Processo da duplicação. | 15 |
| 2.11 | Processo da transcrição. | 16 |
| 2.12 | Processo de condicionamento. | 17 |
| 2.13 | Processo da tradução. | 18 |
| 2.14 | Diagrama de uma recombinação recíproca de DNA λ e DNA de E. coli. As regiões amarelas marcam seqüências idênticas de 15 unidades (chamadas O) do local bacteriano attB e do local attP do fago | 21 |
| 2.15 | Integração e excisão do DNA λ . Int indica integração, e xis indica excisionase. IHF (fator de integração do hospedeiro) é uma proteína do hospedeiro, enquanto int e xis são codificadas por λ | 22 |
| 2.16 | Repetições diretas nas extremidades dos transposons. | 23 |
| 2.17 | Rearranjos genéticos promovidos por transposons. | 23 |
| 2.18 | Repetições Diretas. | 26 |
| 2.19 | Repetições Inversas. | 26 |
| 3.1 | Convenção de Sinais dos nós. | 31 |
| 3.2 | Passagem de Segmento. | 32 |
| 3.3 | Troca de Segmento. | 32 |

| | | |
|------|--|----|
| 3.4 | Comparação dos quatro tipos de nós. As flechas representam os segmentos cruzados de um Nó e ilustram os nós (+), (-), (0) e (∞), respectivamente. | 34 |
| 3.5 | Ilustração de um Conjunto Estado para os quatro tipos de nós. | 34 |
| 3.6 | Formação de um nó (∞) conforme o Subcaso (2.1). | 35 |
| 3.7 | Formação de um nó (∞) conforme o Subcaso (2.2). | 36 |
| 3.8 | Conjunto Estado para as duas cópias do Nó trivial. | 38 |
| 3.9 | Conjunto Estado para Catenane R_p sentido direito paralela com interligação única. | 39 |
| 3.10 | Conjunto Estado para Catenane L_p sentido esquerdo paralela com interligação única. | 40 |
| 3.11 | Conjunto Estado para Catenane RD_p sentido direito paralela com interligação dupla. | 42 |
| 3.12 | Conjunto Estado para Catenane RD_{ap} sentido direito antiparalela com interligação dupla. | 43 |
| 3.13 | (a) Catenane LD_p sentido esquerdo paralela com interligação dupla. | 43 |
| 3.14 | (b) Catenane LD_{ap} sentido esquerdo antiparalela com interligação dupla. | 44 |
| 3.15 | Nó 4-cruzamentos, F. | 45 |
| 3.16 | Produtos da recombinação de um Nó trivial pelo processo <i>resolvase</i> | 48 |
| 3.17 | Recombinação por <i>int</i> entre sítios repetidos inversamente. | 52 |
| 3.18 | Conjunto Estado para a recombinação por <i>int</i> mostrada na Figura 3.17. | 52 |
| 3.19 | Recombinação por <i>int</i> entre sítios repetidos diretamente. | 54 |
| 3.20 | Conjunto Estado para a recombinação por <i>int</i> mostrada na Figura 3.19. | 54 |
| 4.1 | Conjunto Estado do Nó Primo 5_1 | 60 |
| 4.2 | Conjunto Estado do Nó Primo 7_7 | 62 |
| 4.3 | Conjunto Estado do estado K_+ | 63 |
| 4.4 | Conjunto Estado do estado K_0 | 64 |
| 4.5 | Conjunto Estado da Catenane Dimérica 5_1^2 | 66 |
| 4.6 | Conjunto Estado da Catenane Dimérica 7_7^2 | 68 |
| 4.7 | Conjunto Estado do estado K_- | 68 |
| 4.8 | Conjunto Estado do estado K_0 | 69 |
| 5.1 | As quatro primeiras rodadas de recombinação do Nó Primo 5_1 | 74 |
| 5.2 | Conjunto Estado da primeira rodada de recombinação, K_1 | 75 |
| 5.3 | Conjunto Estado da segunda rodada de recombinação, K_2 | 76 |
| 5.4 | Conjunto Estado da terceira rodada de recombinação, K_3 | 77 |

| | | |
|------|---|----|
| 5.5 | Conjunto Estado da quarta rodada de recombinação, K_4 | 78 |
| 5.6 | As quatro primeiras rodadas de recombinação do Nó Primo 5_1 | 80 |
| 5.7 | Conjunto Estado da primeira rodada de recombinação, K_1 | 81 |
| 5.8 | Conjunto Estado da segunda rodada de recombinação, K_2 | 82 |
| 5.9 | Conjunto Estado da terceira rodada de recombinação, K_3 | 83 |
| 5.10 | Conjunto Estado da quarta rodada de recombinação, K_4 | 84 |
| 5.11 | As quatro primeiras rodadas de recombinação com sítios RI do Nó Primo 5_1 | 87 |
| 5.12 | Conjunto Estado da segunda rodada de recombinação, K_2 | 88 |
| 5.13 | Conjunto Estado da terceira rodada de recombinação, K_3 | 89 |
| 5.14 | Conjunto Estado da quarta rodada de recombinação, K_4 | 90 |
| 5.15 | As quatro primeiras rodadas de recombinação com sítios RI do Nó Primo 5_1 | 92 |
| 5.16 | Conjunto Estado da primeira rodada de recombinação, K_1 | 94 |
| 5.17 | Conjunto Estado da segunda rodada de recombinação, K_2 | 95 |
| 5.18 | Conjunto Estado da terceira rodada de recombinação, K_3 | 96 |
| 5.19 | Conjunto Estado da quarta rodada de recombinação, K_4 | 97 |

Lista de Tabelas

| | | |
|-----|--|----|
| 3.1 | Polinômios para Catenanes Diméricas Primos | 56 |
| 3.2 | Polinômios para Nós Primos | 57 |

Capítulo 1

Introdução

1.1 Histórico

Toda população natural de anéis de DNA surgem interligados como Catenanes ou Nós. A ambigüidade dessas formas, está exatamente nos diversos processos capazes de gerá-las. A formação de um intermediário catenanisado, causa um problema topológico no término da replicação do DNA. Tanto os Nós quanto as Catenanes são gerados por recombinação e ações topoisomerases. A importância da compreensão da estrutura dessas formas, que estão interligadas, vai além do DNA circular, porque cromossomos lineares podem estar interligados, como o resultado de um subdomínio confinado topologicamente.

A forma espacial completa dos Nós e Catenanes podem agora ser determinadas por microscopia eletrônica de moléculas recobertas com proteínas, e essas informações têm sustentado uma compreensão crítica, do mecanismo dos processos que geram e desvendam essas formas que estão interligadas. O potencial dos métodos topológicos está na habilidade de distinguir, entre um número muito grande de Nós e Catenanes, qual deverá surgir como produto. Por exemplo, um esquema proposto por recombinação integrativa bacteriófago λ encontrado em [8], previu corretamente a estrutura de um produto Nó entre 10^8 possibilidades de formas alternativas.

Diante de tal complexidade, é necessário possuir um esquema de classificação rigoroso, encontrado em [9] e [10], que determina se duas moléculas que aparentam ser diferentes, são realmente distintas topologicamente, isto é, não podem ser transformadas uma na outra sem quebrar os elos de ligação. A manipulação de modelos físicos para o DNA, tais como as fitas de DNA, podem decidir essa não ambigüidade somente nos casos mais simples.

Esta classificação associa Nós e Catenanes com números ou polinômios. Esses são

invariantes, porque eles não podem ser mudados por qualquer deformação de uma pequena estrutura de elos de ligação, e portanto descreve um topoisomero em qualquer que seja sua forma entrelaçada.

Da nova geração de métodos de classificação de Nós e Catenanes utilizando invariantes polinomiais, o primeiro foi proposto por Jones em 1985 [10], e o segundo foi proposto simultaneamente e independentemente por Lickorish & Millett [1], Freyd & Yetter [11], Ocneanu [11] e Hoste [12], com o objetivo de esclarecer e estender os resultados pioneiros de Jones.

No restante do nosso trabalho, utilizamos o polinômio de Jones, pelo fato de oferecer várias vantagens, tais como: O polinômio de Jones pode distinguir imagens refletidas e possui o quarto estado que é importante na descrição da recombinação de enzimas, e ainda utiliza apenas uma variável que proporciona uma grande agilidade e facilidade para a determinação dos polinômios, enquanto que os métodos que surgiram posteriormente utilizam duas variáveis.

1.2 Apresentação do Problema

O empacotamento, as torções, e os confinamentos topológicos, todos juntos causam um entrelaçamento topológico que apresenta problemas para as moléculas de DNA no núcleo celular. Esse entrelaçamento interfere nos processos de replicação, transcrição e recombinação. A solução biológica para esse problema do entrelaçamento, é a existência de enzimas (topoisomerasas e recombinases) que, para mediar esses processos vitais, manipulam o DNA celular de maneiras não triviais e interessantes topologicamente. Para descrever e compreender as ações enzimáticas, usa-se um novo protocolo experimental, a aproximação topológica para enzimologia encontrada em [2], que explora a Teoria dos Nós para desvendar os segredos das ações enzimáticas.

Nesta dissertação trabalharemos com a recombinação do DNA, por ser de extrema importância para a evolução das espécies e está envolvida no reparo do DNA. Três processos bem caracterizados, tais como, a recombinação homóloga, a recombinação sítio-específica e a recombinação transposicional, encaixam-se nessa descrição geral da recombinação genética. Entretanto, apenas os dois últimos tipos de recombinação são considerados em nosso trabalho, por serem processos menos complexos e mais simples de serem reproduzidos em laboratório do que a recombinação homóloga.

Nos processos de recombinação, o DNA sofre ações enzimáticas que promovem mudanças topológicas na fita de DNA, isto é, formam configurações que são denominadas

Nós ou Catenanes.

Em [1], [2] e [3], essas ações enzimáticas foram estudadas e seu mecanismo foi interpretado e modelado matematicamente, possibilitando assim, prever com exatidão os produtos gerados pelas rodadas de recombinação.

O objetivo desta dissertação é propor a construção de um modelo matemático, capaz de prever todos os produtos gerados através de todas as possibilidades de recombinação do Nó Primo 5_1 , podendo estendê-lo para uma família de Nós, apenas baseando-se nas experiências laboratoriais realizadas com as enzimas *resolvase Tn3* e *integrase*. Estes modelos matemáticos, fazem uso do método polinomial, onde cada forma topológica é associada a um único polinômio de Jones. Esse polinômio além de permitir uma classificação rigorosa das moléculas de DNA que formam Nós ou Catenanes, indica a estrutura das moléculas relacionadas.

1.3 Descrição do Trabalho

Esta dissertação está organizada seguinte forma:

Capítulo 2: Fazemos uma breve revisão dos principais conceitos bioquímicos, nos quais se fundamentam o restante do trabalho;

Capítulo 3: Apresentamos um procedimento que utiliza invariantes polinomiais e mostramos, com detalhes, como esses invariantes polinomiais podem ser usados na classificação dos tipos de formas de Nós e Catenanes, associando cada uma dessas formas a um único polinômio de Jones;

Capítulo 4: Mostramos, através de exemplos, como aplicar o método dos invariantes polinomiais para se calcular os polinômios de Jones dos Nós Primos 5_1 e 7_7 , e das Catenanes Diméricas 5_1^2 e 7_7^2 . O entendimento da aplicação desse método é fundamental para a compreensão do Capítulo 5;

Capítulo 5: Propomos a construção de dois modelos matemáticos, capazes de prever todos os possíveis produtos de recombinação do Nó Primo 5_1 gerados por recombinações sítio-específica que possuem sítios com **repetições diretas** e com **repetições inversas**, sem precisar recorrer aos métodos laboratoriais. Generalizamos esses modelos matemáticos para toda família dos plectonêmicos e a família dos Nós Primos, respectiva-

mente;

Capítulo 6: Apresentamos as conclusões e contribuições do trabalho, além de sugerir tópicos para pesquisas futuras.

Capítulo 2

A Recombinação do DNA e Os Ácidos Nucléicos

O objetivo principal deste capítulo é apresentar, de forma sucinta, a revisão de alguns conceitos bioquímicos dos assuntos utilizados no desenvolvimento desta dissertação. Utilizamos nessa exposição o artigo [4] e as literaturas [5], [6] e [7].

Sabemos que algumas características bioquímicas são comuns a todos os organismos, como, por exemplo, o modo pelo qual a informação hereditária é codificada e expressa, e a maneira pela qual as moléculas biológicas são formadas e fragmentadas para produzir energia. A base genética e bioquímica dos organismos atuais sugere que eles descendem de um ancestral comum. Todas as culturas do passado e do presente possuem seus mitos criacionistas que racionalizam o modo pelo qual a vida teria surgido. No entanto, somente na era atual tem sido possível considerar a origem da vida em termos científicos. A Seção 2.1, apresenta uma visão geral de como teria surgido a vida, a evolução celular e os tipos de células existentes, e na Subseção 2.1.3, comentamos rapidamente, sobre bactérias e bacteriófagos, por serem objetos de consideração em nosso trabalho. Na Seção 2.2, mostramos a importância dos nucleotídeos e ácidos nucleicos (DNA e RNA) nas atividades celulares, bem como, na manutenção e na propagação da vida. Os ácidos nucleicos, possuem algumas diferenças em relação às suas estruturas, a Subseção 2.2.1 expõe essas diferenças. O DNA funciona como um banco de informações genéticas, que transfere essas informações, com o objetivo de garantir a integridade da informação genômica. Um tipo de transferência de informação é mostrada na Seção 2.3, que apresenta a simplicidade do esquema básico para a replicação, o qual esconde um conjunto complexo de intrincados processos coordenados, pois uma multiplicidade de enzimas e fatores protéicos participam

desses processos. Outro tipo de transferência de informação, ocorre quando a seqüência do DNA é copiada exatamente no RNA. O processo através do qual são feitas cópias em RNA de seqüências do DNA é chamado transcrição, e está descrito na Seção 2.4. A Seção 2.5, apresenta a biossíntese de proteínas também chamada de tradução, uma vez que envolve a tradução bioquímica da informação, de uma linguagem de quatro letras e estrutura de ácidos nucléicos, em uma linguagem de 20 letras e estrutura de proteínas. Na Seção 2.6, mostramos quais são os tipos de recombinação, como funcionam os seus mecanismos, e algumas correlações clínicas que envolvem recombinações. Nas Seções 2.7 e 2.8, descrevemos respectivamente, como ocorre o processo de recombinação e apresentamos uma abordagem topológica sobre o estudo das ações enzimáticas, ambos em um contexto específico a ser considerado em nossa dissertação. Finalmente, na Seção 2.9 fazemos as conclusões sobre este capítulo.

2.1 A Célula

Nesta seção, mostramos uma das teorias de como teria surgido a vida, através do desenvolvimento das células. Comentamos, ainda nesta seção, sobre os tipos de células, bactérias e bacteriófagos.

2.1.1 Como surgiu a célula

Há mais de três bilhões de anos, sob condições não inteiramente claras e num instante do tempo difícil de compreender, elementos como carbono, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio, enxofre e fósforo formaram compostos químicos simples. Eles combinaram-se, dispersaram-se e recombinaram-se, formando várias moléculas maiores, até surgir uma combinação capaz de se auto-replicar. Essas macromoléculas consistiram de moléculas mais simples, unidas por ligações químicas. Com a contínua evolução e a formação de moléculas ainda mais complexas, o meio aquoso ao redor de muitas dessas moléculas auto-replicativas foi envolto por uma membrana. Esse desenvolvimento proporcionou a essas estruturas primordiais a capacidade de controlar seu próprio meio, até certo grau. Uma forma de vida tinha se desenvolvido e a unidade de espaço tridimensional, a célula, tinha se estabelecido.

Com o passar do tempo, diversas células se desenvolveram e tanto a química como a estrutura destas células tornaram-se mais complexas. Elas conseguiram extrair nutrientes do meio, converter quimicamente estes nutrientes em fonte de energia ou em moléculas

mais complexas, controlar os processos químicos que catalisavam e fazer a replicação celular. Desse modo, a vasta diversidade de vida hoje observada, começou. A **célula** é a unidade básica da vida em todas as formas de organismos vivos, da mais simples bactéria ao mais complexo animal.

2.1.2 Tipos de células

Com base em diferenças microscópicas e bioquímicas, as células são divididas em duas classes: *procariotos*, que incluem bactérias e rickettsias, e *eucariotos*, que incluem células de leveduras, fungos, vegetais e animais.

Um **procarioto** é uma célula, cujo material genético está presente por toda célula. Em um **eucarioto**, o material genético está organizado em um compartimento bem definido, o **núcleo**, e o DNA está organizado transitoriamente em estruturas compactas chamadas **cromossomos**. Outra diferença importante entre procariotos e eucariotos está na maneira que a própria molécula de DNA está organizada. Por exemplo, o DNA dos eucariotos está altamente associado com proteínas específicas para formar nucleoproteínas (que são reorganizadas para formar cromossomos), enquanto que o DNA dos procariotos está livre de tais proteínas estruturais.

A distinção entre procariotos e eucariotos é extremamente importante porque, por razões desconhecidas, existem profundas diferenças bioquímicas entre essas duas células. Por exemplo, a reunião de aminoácidos em proteínas ocorre por um mesmo mecanismo em células humanas e em eucariotos unicelulares, tais como levedo e algas. Em comparação, síntese proteica em bactérias, que são procariotos, diferem em muitas maneiras dos eucariotos.

Alguns organismos, tais como fago e vírus, que são subcelulares em sua organização, mas que dependem das células como um meio ambiente para sua reprodução, não são procariotos e nem eucariotos. O bacteriófago cresce somente em bactéria e portanto, adotam uma estratégia procariótica para reprodução, enquanto que vírus animais e vegetais são obrigados a produzir seus componentes macromoleculares, usando regras eucarióticas.

Muito mais se conhece sobre procariotos que eucariotos, porque os sistemas dos procariotos são mais simples.

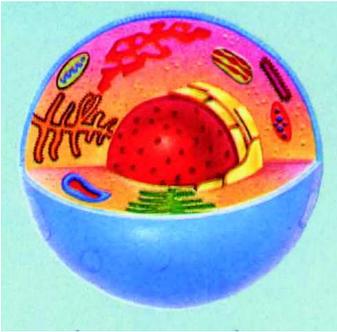


Figura 2.1: Célula eucariótica.



Figura 2.2: Célula procariótica.

2.1.3 Bactérias e Bacteriófagos

Bactérias são organismos unicelulares de vida livre. Elas são procariotas, pois possuem um único cromossomo que não está incluso em um núcleo, e comparadas a eucariotas, elas são simples em sua organização física.

As bactérias possuem muitas características que as tornam adequadas para o estudo dos processos biológicos fundamentais. Por exemplo, elas crescem facilmente e rapidamente e, comparadas a células em organismos multicelulares, elas são relativamente simples em suas necessidades. A bactéria que mais tem servido o campo da biologia molecular é a *Escherichia coli* (usualmente citada como *E. coli*).

Bactérias estão sujeitas a ataques de organismos menores chamados bacteriófagos ou simplesmente fagos. Os fagos são partículas menores, que fazem parte de uma classe geral de partículas chamadas vírus, e eles só são capazes de se reproduzir dentro de uma bactéria. Fago tem sido uma escolha para muitos tipos de experiências, porque sua estrutura e seu ciclo de vida são muito mais simples quando comparados aos das bactérias.

2.2 Nucleotídeos e Ácidos Nucléicos

Se os principais componentes moleculares das células vivas fossem classificados de acordo com suas propriedades físicas e químicas, nenhum deles seria mais versátil que os nucleotídeos, isto é, unidades ligadas entre si que compõem os ácidos nucleicos.

Comparados a outras classes de moléculas - proteínas, carboidratos e lipídeos - os ácidos nucleicos são notáveis pelo seu envolvimento em reações fundamentais para a manutenção e para a propagação da vida. Especificamente, os nucleotídeos participam na transferência de energia, e suas formas poliméricas, os ácidos nucleicos (DNA e RNA),

são os participantes básicos no armazenamento e na codificação da informação genética.

Os nucleotídeos e os ácidos nucleicos também desempenham funções estruturais e catalíticas nas células. Nenhuma outra classe de moléculas participa de funções tão diversas ou de tantas funções essenciais a vida.

Os evolucionistas postulam que o surgimento dos nucleotídeos permitiu a evolução de organismos capazes de incorporar e armazenar energia do ambiente e, principalmente, capazes de produzir cópias de si mesmo. Apesar de os detalhes químicos e biológicos a respeito de formas primordiais de vida serem objeto de especulação, não há controvérsias a respeito do fato de que a vida, como a conhecemos, está intimamente relacionada à química dos nucleotídeos e dos ácidos nucleicos.

2.2.1 A estrutura das moléculas

Tanto o DNA como o RNA são polímeros, isto é, moléculas formadas por várias unidades menores ligadas entre si de modo organizado. Os polímeros podem ser lineares ou ramificados e podem conter um ou mais tipos de unidades estruturais (monômeros).

Existem quatro diferentes tipos de nucleotídeos no DNA, que estão ilustrados na Figura 2.4. Cada nucleotídeo é sempre composto por três partes: um grupo fosfato, uma pentose - a desoxirribose - e uma base nitrogenada. Há quatro tipos de bases no DNA: duas delas maiores, **adenina e guanina**, são chamadas **purinas** e são constituídas por um anel duplo de carbono e nitrogênio. As outras duas menores, **citossina e timina**, são compostas por um anel simples e são chamadas de **pirimidinas**.

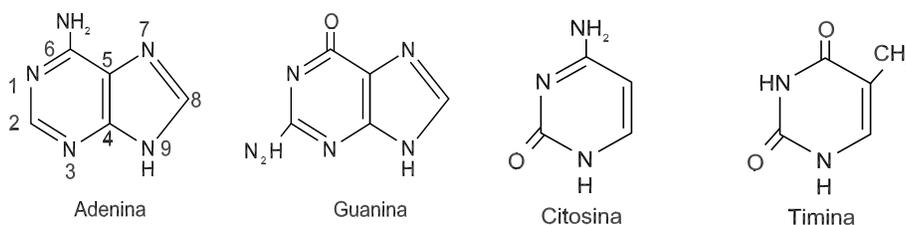


Figura 2.3: Bases Nitrogenadas do DNA.

Embora pareça não haver regras na composição dos nucleotídeos de moléculas de RNA típicas, o DNA possui um número de resíduos de adenina igual ao de timina ($A=T$) e um número de resíduos de guanina igual aos de citossina ($G \equiv C$). Essas relações, conhecidas como **regra de Chargaff**, foram descobertas no final dos anos 40 por Erwin Chargaff,

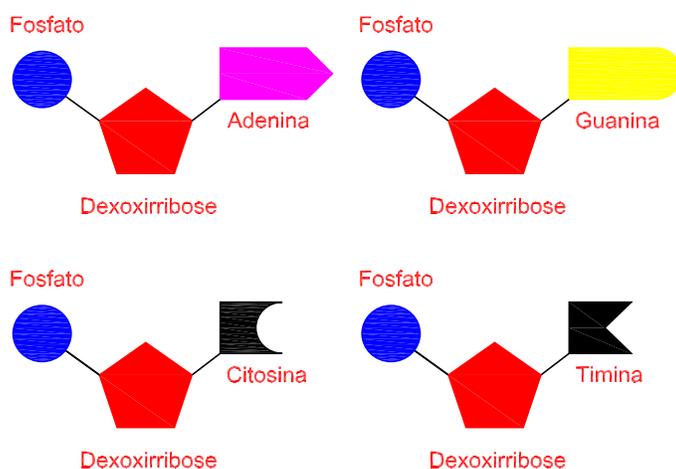


Figura 2.4: Nucleotídeos do DNA.

que desenvolveu o primeiro método quantitativo confiável para a análise da composição do DNA.

O RNA é também uma longa fita de nucleotídeos ligados entre si. Contrariamente ao DNA, a molécula de RNA é sempre constituída por uma **fita única**.

Os nucleotídeos do RNA apresentam algumas diferenças com relação aos do DNA. A pentose no RNA é sempre a ribose (no DNA é a desoxirribose). Nos nucleotídeos de RNA pode estar presente uma das seguintes quatro bases: adenina, guanina, citosina e uracila. As três primeiras também aparecem no DNA. A uracila é exclusiva do RNA, da mesma forma que a timina caracteriza o DNA.

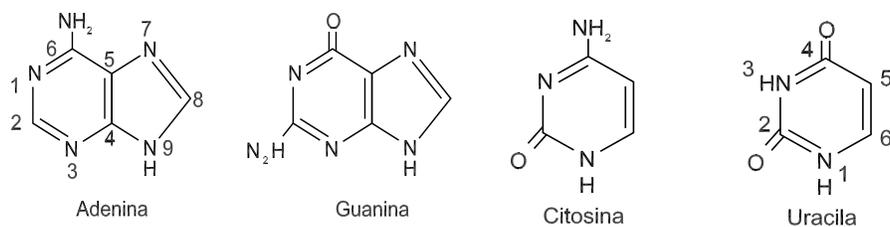


Figura 2.5: Bases Nitrogenadas do RNA.

As moléculas de RNA são classificadas de acordo com os papéis que desempenham nos processos de transferência de informação. Em procaríotos, a transcrição e a tradução ocorrem muito próximas uma da outra. Na verdade, os ribossomos podem começar a

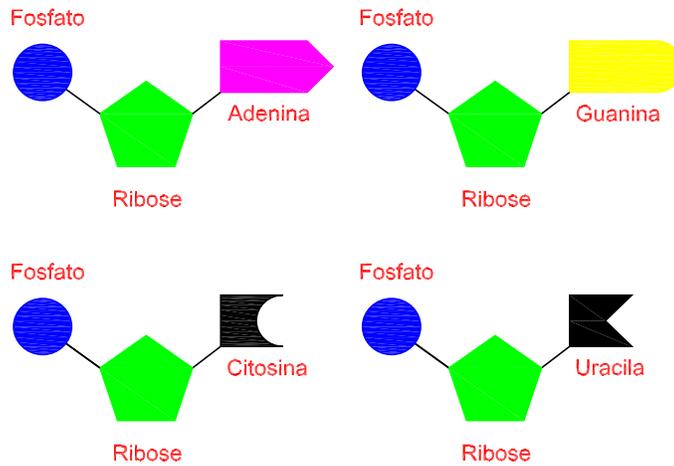


Figura 2.6: Nucleotídeos do RNA.

traduzir o RNA mensageiro, RNA que leva ao citoplasma a “mensagem genética”, enquanto ainda está sendo sintetizado. Em eucariotos, esses processos são especialmente separados: a transcrição ocorre no núcleo e a tradução, no citoplasma da célula.

2.2.2 A molécula de DNA

O DNA é um ácido desoxirribonucléico, isto é, um polímero de desoxinucleotídeos cuja seqüência de base codifica a informação genética em todas as células vivas.

Os aspectos estruturais específicos do DNA variam, dependendo da origem e da função de cada molécula de DNA. As moléculas de DNA diferem em tamanho, conformação e topologia. Apesar de algumas formas de DNA celulares existirem como estruturas de fita única, a estrutura de DNA mais difundida é a dupla hélice (ou duplex).

A determinação da estrutura do DNA por James Watson e Francis Crick em 1953 é, em geral, aceita como o marco do surgimento da biologia molecular moderna. A **estrutura do DNA de Watson-Crick** não apenas forneceu um modelo da molécula fundamental da vida, como também sugeriu o mecanismo molecular da hereditariedade. Os achados de Watson e Crick, listados como uma das principais descobertas intelectuais da ciência, foram baseados, em parte, em duas evidências além da regra de Chargaff: as formas tautoméricas corretas das bases e as indicações de que o DNA seria uma molécula helicoidal.

As bases púricas e pirimídicas dos ácidos nucleicos podem assumir diferentes formas tautoméricas (**tautômeros** são isômeros de conversão fácil, diferindo entre si apenas nas

posições do hidrogênio, Figura 2.7.).

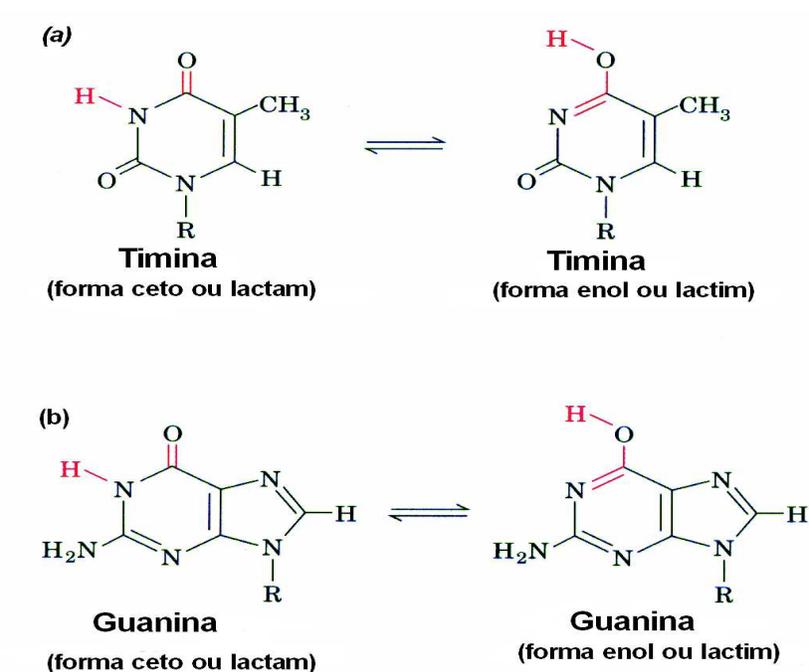


Figura 2.7: Formas tautoméricas das bases.

As informações estruturais limitadas, juntamente com a regra de Chargaff, forneceram alguma idéia da estrutura do DNA. O modelo de Watson e Crick foi elucidado principalmente pela imaginação deles e por estudos de construção de modelos. Uma vez publicado, o modelo de Watson e Crick foi rapidamente aceito devido à sua simplicidade, associada à sua óbvia relevância biológica. Investigações posteriores confirmaram a precisão geral do modelo, apesar dos detalhes terem sido modificados.

O modelo de Watson e Crick possui as seguintes características principais:

1. Duas cadeias polinucleotídicas circundam um eixo comum formando a **dupla hélice** (Figura 2.8).
2. As duas fitas de DNA são **antiparalelas** (possuem direções opostas), mas cada uma forma uma hélice para o lado direito.
3. As bases ocupam o centro da hélice, e as cadeias de açúcar-fosfato estão dispostas na periferia, minimizando a repulsão entre os grupos fosfato carregados. A superfície da dupla hélice forma dois sulcos de largura desigual: a **cavidade maior** e a **cavidade menor**.

4. Cada base está ligada a uma base da fita oposta por meio de pontes de hidrogênio, formando um **par de base** planar. A estrutura de Watson e Crick pode acomodar apenas dois tipos de pares de base. Cada resíduo de adenina deve formar o par com um resíduo de timina e vice-versa, e cada resíduo de guanina deve formar par com um resíduo de citosina e vice-versa (Figura 2.9). Essas interações por pontes de hidrogênio, um fenômeno denominado como **pareamento das bases complementares**, resulta na associação específica das duas cadeias da fita dupla.

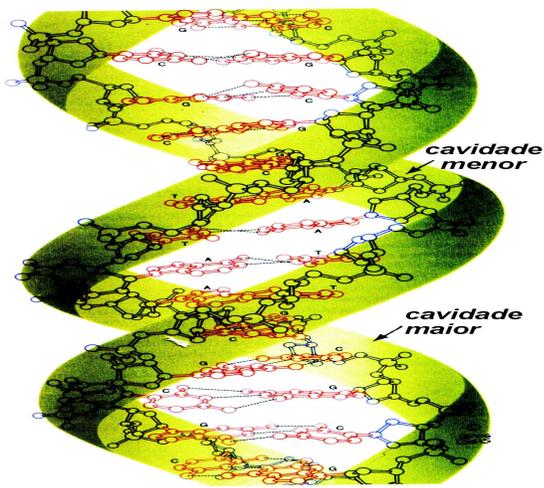


Figura 2.8: Estrutura tridimensional do DNA.

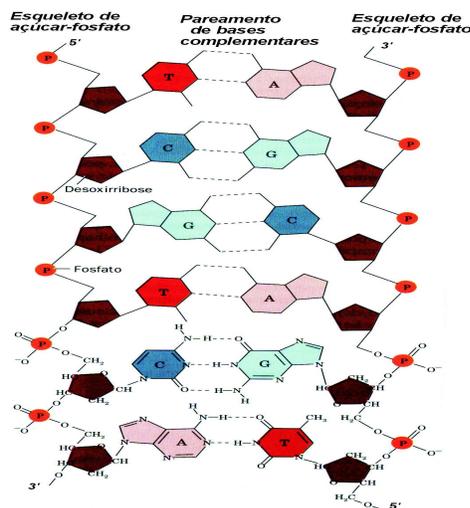


Figura 2.9: Fitas complementares de DNA.

A estrutura de Watson e Crick poderá acomodar qualquer seqüência de bases em uma fita polinucleotídica se a fita oposta possuir a seqüência de bases complementares a ela. Isso explica a regra de Chargaff. Mais importante ainda, sugere que cada fita de DNA pode atuar como um **molde** para a síntese de sua fita complementar e, conseqüentemente, a informação hereditária está codificada na seqüência de bases em qualquer fita.

A maioria das moléculas de DNA é extremamente grande, de acordo com sua função de conter toda a informação genética da célula. Com raras exceções, os organismos mais complexos contêm mais DNA. O **genoma** de um organismo, que é seu conteúdo específico de DNA, pode estar distribuído em diversos **cromossomos** (do grego, *chromos*, cor + *soma*, corpo), cada um contendo uma molécula de DNA separada.

Devido o seu comprimento muito longo, as moléculas de DNA são descritas em termos do número de pares de bases (**pb**) por milhares de pares de bases (**quilobases em pares** ou **kb**). Apesar de cada molécula de DNA ser longa e relativamente firme, ela não é completamente rígida. A dupla hélice de DNA forma espirais e voltas quando compactada dentro da célula. Além disso, dependendo da seqüência de nucleotídeos, o DNA pode adotar conformações helicoidais levemente distintas. Por fim, na presença de outros componentes celulares, o DNA pode dobrar-se ou suas duas fitas podem ser parcialmente desenroladas.

A dupla hélice existe em várias geometrias designadas como DNA A, DNA B, DNA C e DNA Z. A formação dessas diferentes conformações depende da composição em bases do DNA e das condições físicas. O modelo descrito por Watson e Crick possui a conformação do DNA B.

O DNA circular de dupla fita, ou dupla hélice, tem uma topologia interessante, que será objeto de consideração em nosso trabalho. Então, quando mencionarmos DNA no decorrer dos próximos capítulos, deve-se entender como sendo o DNA circular dupla hélice (ou duplex).

2.3 Como o DNA se Duplica - Duplicação

Para o DNA duplicar-se (ou replicar), há necessidade de uma enzima especial, a DNA polimerase. Estando presente essa enzima, ocorrem as seguintes etapas:

1. As pontes de hidrogênio que ligam as bases nitrogenadas rompem-se e as duas fitas se afastam;
2. Nucleotídeos de DNA livres, que já existem na célula, encaixam-se nas duas fitas

que se afastaram. O encaixe só ocorre se as bases forem complementares (adenina com timina, citosina com guanina);

3. Quando as duas fitas originais tiverem sido completadas por nucleotídeos novos, teremos duas moléculas de DNA idênticas entre si.

Em cada molécula, existe um filamento antigo, que pertencia à molécula-mãe, e um novo, que se formou sobre o antigo. Cada filamento antigo atuou como molde, já que sua seqüência de bases funcionou como “guia” para a produção da fita nova. Chamamos também o processo de duplicação semi-conservativa, já que cada molécula-filha conserva metade da molécula-mãe.

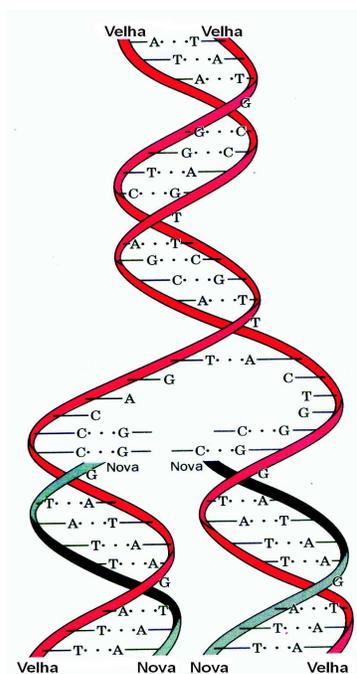


Figura 2.10: Processo da duplicação.

2.4 Como o DNA Fabrica o mRNA - Transcrição

As moléculas de DNA controlam todas as atividades químicas do metabolismo celular. Isso ocorre, na realidade, através do controle que o DNA exerce sobre a fabricação das enzimas, que são proteínas indispensáveis à ocorrência de reações químicas na célula. Cada enzima catalisa um certo tipo de reação, isso significa que existem milhares de enzimas diferentes em cada célula.

De que jeito o DNA controla a produção de enzimas? O DNA produz moléculas de mRNA, que migram para o citoplasma e controlam a construção das proteínas, aminoácido por aminoácido, garantindo a produção daquela proteína especial no momento correto. A seqüência de DNA é que condiciona a seqüência da molécula de RNA. Uma diferença importante em relação à duplicação é que apenas **uma fita** de DNA funciona como molde. O RNA produzido será, portanto, uma fita simples e não dupla. Esse processo segue os seguintes passos:

1. É necessária a presença de uma enzima: a RNA polimerase;
2. As pontes de hidrogênio se desfazem, as duas fitas de DNA se afastam;
3. Nucleotídeos livres de RNA encaixam-se apenas numa das fitas, chamada **fita ativa**;
4. A molécula de RNA (fita única) destaca-se de seu molde de DNA e migra para o citoplasma;
5. As duas fitas de DNA tornam a parear, reconstituindo a molécula original.

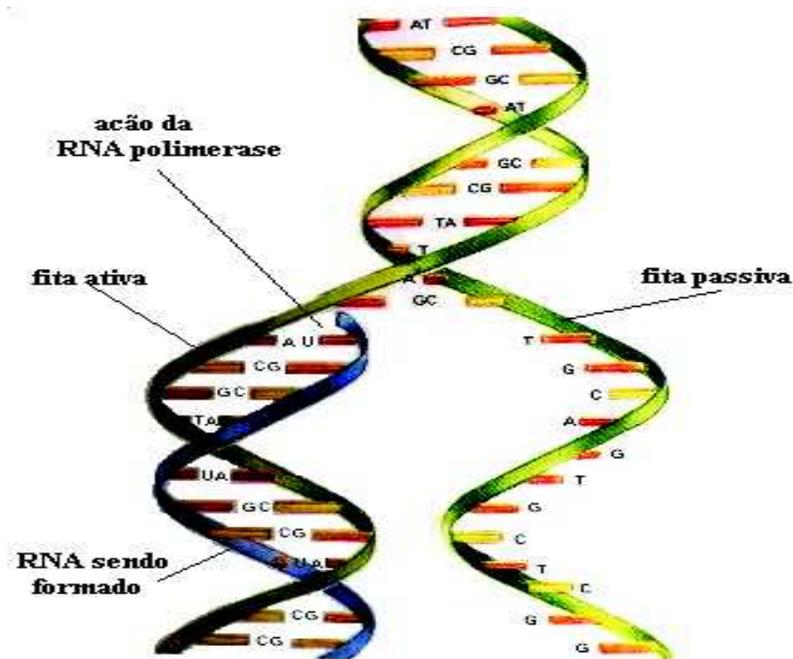


Figura 2.11: Processo da transcrição.

2.5 Síntese de Proteínas - Tradução

2.5.1 O Código genético

O DNA presente no núcleo controla toda a síntese de proteínas da célula. Esse controle é efetuado por meio de moléculas de RNA que o DNA fabrica e que passam para o citoplasma.

Tanto o DNA quanto o RNA, enquanto proteínas, são moléculas grandes constituídas por várias pequenas unidades. Nos três casos (duplicação, transcrição e tradução), a seqüência dessas unidades tem importância fundamental. Há uma relação entre elas: a seqüência de bases do DNA condiciona a seqüência do RNA, e a seqüência do RNA condiciona a seqüência de aminoácidos da proteína. Esse procedimento é ilustrado pela Figura 2.12.

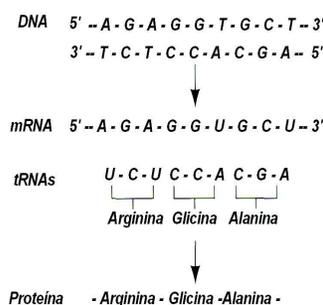


Figura 2.12: Processo de condicionamento.

A correspondência entre o DNA e o RNA ocorre base por base: quando há adenina no DNA, entra uracila no RNA; timina no DNA corresponde à adenina no RNA, e assim por diante.

Na correspondência entre RNA e proteína, cada três bases do RNA codificam um aminoácido específico da proteína. A seqüência GAG no RNA condiciona a colocação do ácido glutâmico. A correspondência entre trinças de bases do DNA, trinças de bases do RNA e aminoácidos chamamos **código genético**. Cada trinca de bases no DNA ou no RNA é denominada **códon**, de fato essas trinças representam “palavras” do código genético, cada “palavra” corresponde a um “objeto”, que seria o aminoácido. Existem 64 possíveis trinças, ou códons, que correspondem a apenas 20 aminoácidos. Assim, é fácil entender que mais de um códon pode corresponder ao mesmo aminoácido.

2.5.2 Tipos de RNA que participam da tradução

1. **RNA_m (RNA mensageiro)**: Trata-se do RNA que leva ao citoplasma a “mensagem genética” do DNA, orientando a síntese de proteínas, já que a seqüência de seus códons determina a seqüência dos aminoácidos. Para produzir proteínas, o RNA_m se associa aos ribossomos existentes no citoplasma;
2. **RNA_t (RNA transportador ou de transferência)**: É uma molécula relativamente pequena, de aproximadamente 80 nucleotídeos. Apesar de ser também constituída por uma fita única, às vezes se apresenta torcida sobre si mesma. Existem vários tipos de RNA_t, que variam seguindo a seqüência das três bases. Os RNA_t's capturam aminoácidos que se encontram dissolvidos no citoplasma, carregando-os para os ribossomos. Cada transportador é específico em relação ao aminoácido que transporta. Essa especificidade é condicionada pela seqüência de três bases chamadas anticódons; assim, o RNA_t com o anticódon CAA transporta valina;
3. **RNA_r (RNA ribossômico)**: Trata-se do RNA de fita mais comprida (o RNA_t é o menor deles e o RNA_m geralmente é intermediário entre os outros dois). O papel do RNA_r é estrutural: serve como matéria-prima para a construção dos ribossomos. Eles são indispensáveis para a tradução: sem ribossomos, aparentemente, nunca ocorre síntese de proteínas.

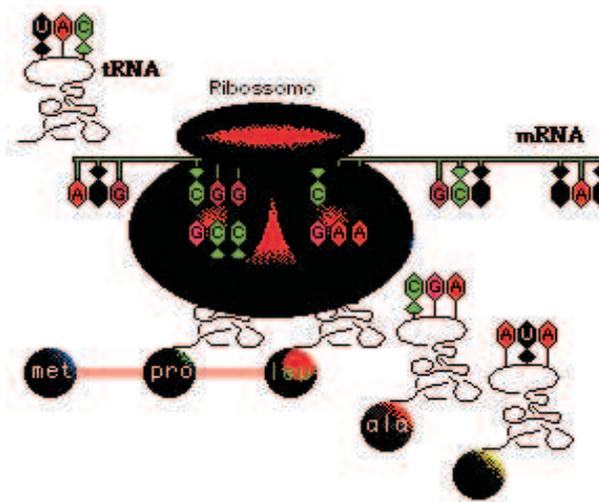


Figura 2.13: Processo da tradução.

2.6 Recombinação do DNA

A recombinação do DNA refere-se a vários processos distintos, durante os quais o material genético é rearranjado, através da quebra da junção de porções da mesma molécula de DNA ou de porções de moléculas diferentes de DNA.

A recombinação também ocorre entre DNAs de diferentes organismos, gerando um novo DNA *composto*. Tanto DNAs procarióticos como eucarióticos sofrem recombinação. Três processos bem caracterizados, tais como, a **recombinação homóloga**, a **recombinação sítio-específica** e a **recombinação transposicional**, encaixam-se nessa descrição geral da recombinação genética. Entretanto, apenas os dois últimos tipos de recombinação são considerados em nosso trabalho, por serem processos menos complexos e mais simples de serem reproduzidos em laboratório do que a recombinação homóloga.

A recombinação cria novas combinações de genes no cromossomo, o que aumenta a chance de sobrevivência de uma população. Esse aumento na diversidade genética não oferece vantagens para indivíduos de uma população. Em vez disso, a sobrevivência individual depende, parcialmente, da operação do reparo do DNA. Contudo, certos tipos de reparo do DNA dependem da recombinação do DNA e, portanto, é possível que a recombinação tenha evoluído como um mecanismo de reparo.

A recombinação mais comum é a do tipo homóloga. Recombinação sítio-específica e transposição são eventos relativamente raros, mas importantes, porque podem controlar a função replicativa em alguns vírus e certos aspectos do desenvolvimento. Recombinação homóloga gera novas combinações de genes, que podem levar à diversidade genética. Mutação e recombinação são as principais abordagens através das quais a célula cria a variação necessária para que ocorra evolução. Além disso, eventos de recombinação estão envolvidos no reparo do DNA. Nos casos em que a lesão no DNA ocorre em sítios complementares, o reparo pode ocorrer apenas através de recombinação.

2.6.1 Recombinação homóloga

A recombinação homóloga produz uma troca entre um par de moléculas distintas de DNA, geralmente duas cópias ligeiramente diferentes do mesmo cromossomo, ou dois segmentos de DNA gerados a partir da mesma molécula de DNA. O requisito principal para que esse processo ocorra é que os DNAs que estão recombinando sejam homólogos. Isso significa que os dois DNAs têm seqüências de bases muito semelhantes numa região extensa, que pode conter milhares de bases.

A recombinação homóloga é bastante complexa e envolve um mecanismo com múltiplas

etapas, catalisado por um grande número de proteínas diferentes.

2.6.2 Recombinação sítio-específica - Integração

Esse tipo de recombinação só requer a presença de seqüências homólogas curtas no DNA. Entretanto, recombinações sítio-específicas só ocorrem em seqüências específicas de DNA, presentes em ambas as moléculas de DNA participantes.

O processo une moléculas de DNAs em locais específicos e é catalisado por enzimas conhecidas como **recombinases**, que reconhecem seqüências específicas curtas (20-200 pares de bases) em ambos os sítios de recombinação. Quando a recombinase liga-se a ambos os sítios de recombinação na molécula de DNA, pode produzir uma inserção de DNA. Um exemplo bem estudado de recombinação sítio-específica é a do fago (λ) de *E. coli*.

Os vírus que nem sempre matam seus hospedeiros são chamados de *temperados* ou *moderados*, dos quais o fago lambda (λ) de *E. coli* é o mais bem entendido. O cromossomo circular (λ) fica integrado a um sítio específico do cromossomo de *E. coli*, assim chamado sítio attB. A integração requer o alinhamento do fago (λ), numa orientação específica, com o cromossomo de *E. coli*. O alinhamento é feito por uma recombinase específica, conhecida como **integrase (Int)**, e com a participação de uma proteína conhecida como **fator de integração do hospedeiro** (IHF, *integration host factor*), codificado pela bactéria. A seqüência básica de attB é simbolizada por B-O-B' (B de bactéria). O local específico de ligação no DNA do fago (λ), chamado sítio attP, está situado próximo aos genes *int* (para “integrar”) e *xis* (para “excisar”). A seqüência de bases attP está simbolizada por P-O-P' (sendo P para fago - em inglês, phage). A letra O (mostrada em amarelo na Figura 2.15) indica as seqüências idênticas nos segmentos que se recombina no fago e na bactéria. A integrase reconhece a seqüência P-O-P' no DNA do fago e a seqüência B-O-B' no DNA de *E. coli*. A enzima corta pontas rombudas com sete nucleotídeos em ambos os filamentos das seqüências O. O IHF serve para dobrar a seqüência P-O-P'. Após todas as quatro cadeias serem cortadas, P junta-se a B' e B junta-se a P' para formar um círculo de DNA dos dois. Este esquema (Figuras 2.14 e 2.15) foi originalmente proposto por Allan Campbell com base em evidências genéticas.

O DNA λ agora é parte da molécula de DNA de *E. coli*. Esta forma de λ é chamada **profago**, e a *E. coli* contendo o profago é chamada de **bactéria lisogênica**.

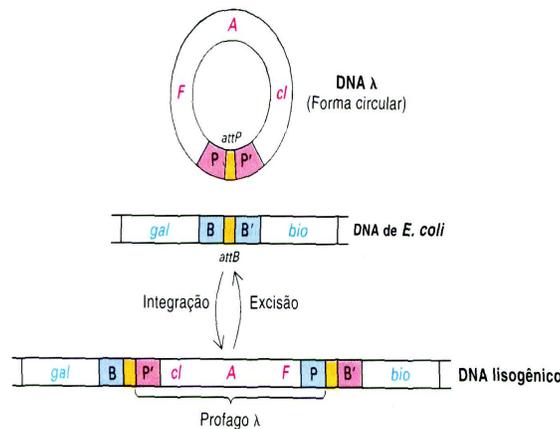


Figura 2.14: Diagrama de uma recombinação recíproca de DNA λ e DNA de *E. coli*. As regiões amarelas marcam seqüências idênticas de 15 unidades (chamadas O) do local bacteriano attB e do local attP do fago .

2.6.3 Recombinação transposicional sítio-específica

A recombinação transposicional sítio-específica, conhecida como transposição, é uma forma de recombinação catalisada por recombinases chamadas **transposases**. Esse tipo de recombinação é melhor entendido em bactérias, mas o DNA de todas as células, incluindo eucariotos como *Drosophila*, milho e levedura, contém segmentos que podem se mover, geralmente com freqüências muito baixas, da ordem de 10^{-5} ou 10^{-7} por geração celular, de um sítio *doador* para um sítio *alvo*, num cromossomo. Esses segmentos são conhecidos como **elementos transponíveis (transposons)**.

A transposição difere da recombinação sítio-específica porque não requer uma seqüência específica de DNA no cromossomo *alvo*. Tanto as transposases como as recombinases reconhecem e agem sobre seqüências específicas do DNA. A recombinação de ambos os tipos é responsável pela inserção de vírus, plasmídeos e elementos transponíveis (transposons) no DNA cromossômico. **Transposons** são elementos de DNA que podem se movimentar de uma localização para outra no genoma, tanto em bactérias como em eucariotos e plasmídeos são pequenas moléculas de DNA circulares, com replicação autônoma em uma célula bacteriana ou de levedura.

Três classes de elementos transponíveis, I, II e III, são conhecidas. Os transposons classe I são chamados seqüências de inserção (**IS**) e consistem de um gene que codifica transposase juntamente, é claro, com as repetições que normalmente flanqueiam o ele-

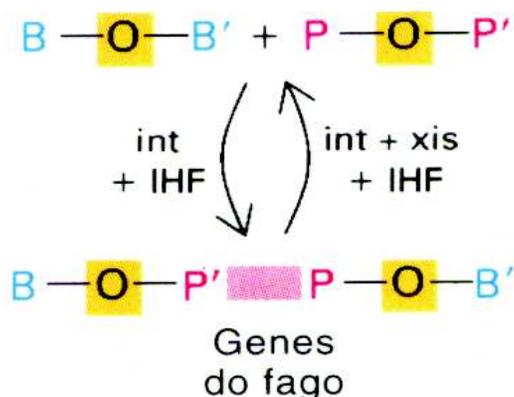


Figura 2.15: Integração e excisão do DNA λ . Int indica integração, e xis indica excisionase. IHF (fator de integração do hospedeiro) é uma proteína do hospedeiro, enquanto int e xis são codificadas por λ .

mento transponível. Elementos IS variam em tamanho, entre 800 e 1300 pb (pares de base).

Quando os transposons da classe I também contém um gene adicional, como um gene que confere resistência a antibiótico à bactéria, são chamados **transposons compostos (Tn)**. Os transposons da classe II diferem dos da classe I porque, além disso, codificam o gene de uma segunda enzima, **resolvase**. Tipicamente, transposons compostos e transposons da classe II têm milhares de pares de bases de comprimento. Finalmente, um pequeno grupo de bacteriófagos, que inserem seu cromossomo no cromossomo do hospedeiro, são classificados como elementos transponíveis classe III.

A transposição começa pela introdução, catalisada por uma transposase, de um corte desencontrado na seqüência alvo de DNA. Cortes também são feitos em ambos os lados do transposon, de modo que possa ser levado para o sítio alvo. O reposicionamento deixa uma quebra nas duas fitas, no ponto de onde o transposon foi removido. No sítio alvo, o transposon é introduzido no corte desencontrado, como ilustra a Figura 2.16. Especificamente, 3-12 pares de base do sítio alvo são duplicados pela DNA polimerase I, formando uma repetição curta adicional em cada extremidade do transposon inserido, e o transposon “modificado” é ligado, então, no sítio alvo. Nas transposições das classes II e III, além da duplicação das repetições curtas, o próprio transposon é replicado e uma cópia dele permanece no sítio doador, enquanto a outra cópia é transferida para o sítio alvo. Esse tipo de transposição, chamada **transposição replicativa**, requer a enzima

resolvase e, portanto, não ocorre na transposição da classe I.

A transposição replicativa pode remodelar a estrutura de um cromossomo, mais do que simplesmente mudando um elemento transponível de um lugar para outro. Como esse tipo de transposição coloca duas seqüências homólogas no mesmo cromossomo, recombinação homóloga entre essas duas seqüências pode produzir uma deleção ou uma inserção, dependendo de essas seqüências estarem orientadas na mesma direção ou em direções opostas, como ilustra a Figura 2.17.

Finalmente, a transposição pode inativar um gene por mutação, se um transposon for inserido numa seqüência codificadora e a interromper. Alternativamente, a inserção por transposição de um promotor ou de um ativador de transcrição próximo a um gene pode ativar o gene.

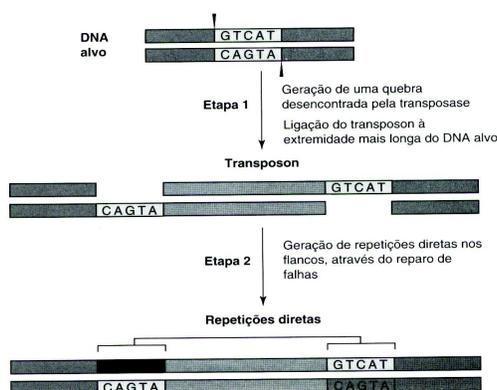


Figura 2.16: Repetições diretas nas extremidades dos transposons.

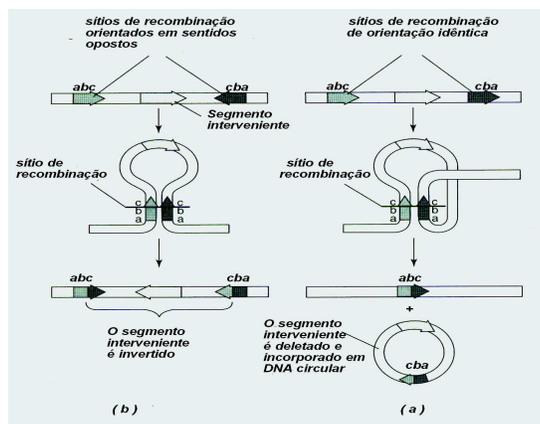


Figura 2.17: Rearranjos genéticos promovidos por transposons.

2.6.4 Correlações clínicas

Nesta subseção, mostramos algumas correlações clínicas que envolvem a recombinação do DNA, que podem ser encontradas na literatura [6]. Com isso, fica evidente a importância e a necessidade de compreender como funciona o mecanismo de recombinação.

- **Transposons e o Desenvolvimento de Resistência a Antibiótico**

Genes que conferem a bactérias resistência a antibióticos usados comumente, como penicilina e tetracilina, estão geralmente presentes em plasmídeos. As seqüências de DNA desses plasmídeos não têm nenhuma homologia com as seqüências do DNA cromossômico do hospedeiro. No entanto, como resultado de transposição, os genes de resistência a antibióticos podem ser transferidos ao cromossomo da bactéria hospedeira. A existência de genes que podem se movimentar de um cromossomo para outro é de grande importância no entendimento de fatores que produzem modificações na organização dos genomas. Do ponto de vista clínico, esses genes “transponíveis” são de importância crítica para o entendimento de como populações de bactérias resistentes a antibióticos surgem com o uso de antibióticos no tratamento de infecções bacterianas no homem e em animais.

- **Os Genes de Imunoglobulinas são Organizados por Recombinação**

Imunoglobulinas (anticorpos) são moléculas que reconhecem e ligam-se especificamente a qualquer substância que o anticorpo identificar como estranha ao corpo humano. Dada a imensa variedade de agentes infecciosos, incluindo milhões de microrganismos presentes no ambiente, o genoma humano, que é equipado com um conjunto limitado de, provavelmente, não mais de 100.000 genes, não tem capacidade para produzir diretamente um número equivalente de anticorpos diferentes, necessários para reconhecer especificamente todos os agentes infecciosos. Essa limitação, inerente ao potencial de codificação genética do genoma humano, é, contudo, contornada pela recombinação, que permite a produção, a partir de uma quantidade limitada de DNA que codifica genes, de um número ilimitado de anticorpos diferentes.

- **Amplificação do DNA e Desenvolvimento de Resistência a Drogas**

Uma limitação importante na eficácia de drogas quimiotóxicas no tratamento do câncer é o desenvolvimento de resistência à droga. Assim, células cancerosas tornam-se resistentes aos medicamentos. Resistência a drogas em células em cultura resulta de amplificação específica de um segmento grande de DNA, que incorpora um gene específico, mas o mecanismo exato pelo qual essa amplificação ocorre não está claro. É provável que a amplificação resulte de recombinação entre seqüências homólogas, orientadas de modo idêntico, que flanqueiam o DNA amplificado. De fato, algumas células resistentes contém os tipos de DNA amplificado. A amplificação gênica é gradualmente revertida na ausência das drogas, primeiro com o desaparecimento das cópias extracromossômicas. Genes amplificados nos cromossomos, entretanto, persistem por várias gerações, após a remoção da droga. Logo, a amplificação gênica e a resistência que a acompanha estende-se a áreas distantes da clínica médica como, por exemplo, com o desenvolvimento de insetos resistentes a pesticidas.

2.7 Como Ocorre o Processo de Recombinação

A recombinação sítio-específica é uma maneira natural de alterar o código genético de um organismo, seja pelo movimento de um bloco de DNA para outra posição na mesma molécula (**movimento executado pela transposase**), ou pela integração de um bloco de DNA estrangeiro em um genoma hospedeiro (**movimento executado pela integrase**).

Um sítio de recombinação para uma enzima de recombinação sítio-específica, **recombinase**, é um pequeno pedaço de DNA duplex, cujo código é reconhecido pela enzima e um par de sítios, na mesma ou em diferentes moléculas, é justaposto na presença desta. A justaposição dos pares de sítios é o resultado da manipulação enzimática do DNA ou do movimento aleatório térmico, ou ainda de ambos.

Os sítios justapostos são atados pela enzima. Esse estágio da reação é chamado **sinapse**, e o complexo formado pelo substrato junto com a enzima atada é chamado de **complexo sináptico**. Em um único evento de recombinação, a enzima executa uma quebra “fio-duplo” em cada sítio, recombina os finais formando um cruzamento, e então libera a molécula (ou moléculas) resultante. A molécula de DNA não atada pela enzima recombinase antes da recombinação é chamada de **substrato** e depois da recombinação de **produto**.

O processo de recombinação sítio-específica, envolve algumas mudanças topológicas

interessantes no substrato. Para capturar algumas dessas mudanças, criam-se moléculas de substrato de DNA duplex com ambos os sítios na mesma molécula. A seqüência linear dos pares de base induz uma orientação local em cada sítio, e a orientação local de cada sítio induz uma orientação global no círculo. Se essas orientações induzidas pelos dois sítios *concordam*, essa configuração é chamada **repetições diretas**, e se *discordam* é chamada **repetições invertidas**.

As repetições diretas ou inversas alteram o produto de um mesmo substrato. Para uma melhor compreensão, observe as Figuras 2.18 e 2.19. Por exemplo:

1. Se o substrato é um único círculo com repetições diretas, o produto da recombinação é um par de círculos, e pode formar um Catenane de DNA (ou Link);
2. Se o substrato é um par de círculos com um sítio cada, o produto da recombinação é um único círculo, e pode formar um Nó de DNA;
3. Se o substrato é um único círculo com repetições invertidas, o produto da recombinação é um único círculo e pode formar um Nó de DNA.

Nesse momento, deve-se entender Nó como uma única malha fechada no fio de DNA, e Catenane como sendo a composição de um certo número de tais malhas.

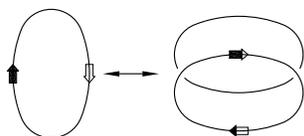


Figura 2.18: Repetições Diretas.

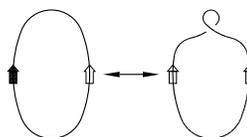


Figura 2.19: Repetições Inversas.

2.8 Aproximação Topológica para Enzimologia

As moléculas de DNA são finas e longas, e o empacotamento do DNA na célula é muito complexo. Por exemplo, se compararmos o núcleo celular a uma bola de basquete e o DNA a uma fina linha de pescar, teremos aproximadamente 200 Km dessa linha dentro da bola de basquete. O empacotamento, as torções e os confinamentos topológicos, todos juntos, apresentam problemas para as moléculas de DNA no núcleo celular. Esse entrelaçamento interfere nos processos vitais de replicação, transcrição e recombinação.

A solução biológica para esse problema do entrelaçamento, é a existência de enzimas conhecidas como **topoisomerases**, que para mediar esses processos vitais, manipulam o DNA celular de maneiras topologicamente interessantes e não triviais. As topoisomerases agem catalisando, em conjunto, a quebra e a religação das fitas de DNA, que produzem um DNA que é *mais* ou *menos* super-helicoidal do que o original.

Topoisomerases podem ser classificadas como **TOPO I**, que quebram apenas uma fita, e **TOPO II**, que quebram as duas fitas simultaneamente. Enzimas que promovem a recombinação, **as recombinases**, quebram as duas fitas de DNA recombinando-as formando um cruzamento. Para descrevermos e compreendermos o mecanismo das recombinases, necessitamos recorrer a Teoria dos Nós (Capítulo 3).

Um desenvolvimento interessante para a topologia tem sido um novo protocolo experimental, a abordagem topológica para a enzimologia encontrada em [2], que utiliza a Teoria dos Nós para desvendar os segredos das ações enzimáticas. Pode-se deduzir fatos sobre o mecanismo enzimático, detectando uma assinatura topológica da enzima, a mudança que a enzima causa no estado topológico da molécula na qual ela está agindo.

Em muitos casos, o substrato natural para a ação enzimática é um DNA linear, o problema é que não se detecta as mudanças topológicas realizadas pela enzima em um DNA linear. O truque então é, pegar uma enzima particular para agir em uma molécula de DNA circular, para observar quais são as mudanças causadas pela enzima no DNA, esse procedimento é realizado em laboratório, *in vitro*.

Experimentos laboratoriais, que utilizam técnicas como *Gel Agarose* e *Cobertura Rec A*, facilitam a visualização das mudanças geométricas (supertorcimento) e topológicas (tipos de Nós e Catenanes) no substrato. Essas supertorções são variáveis de controle experimental e ajudam nas análises dos produtos da reação. Apresentamos o procedimento desses experimentos laboratoriais que podem ser encontrados em [3]:

1º) Retira-se da célula, uma molécula de DNA circular supertorcido que passa para o estado relaxado, estado com um menor número de cruzamentos, sob a ação de enzimas topoisomerases (TOPO I ou TOPO II) que mudam sua forma topológica, chama-se essa molécula de substrato. A quantidade de supertorções das moléculas é uma variável de controle;

2º) Através da clonagem faz-se várias cópias do substrato, com as quais as recombinases reagem. Quando uma enzima age em um substrato, algumas mudanças enzimáticas podem ser capturadas na forma de Nós e Links de DNA;

3º) Os Nós ou Links possuem carga negativa, devido ao substrato ser naturalmente car-

regado negativamente, e são colocados na *Agarose Gel* onde uma corrente elétrica é passada, fazendo com que eles se movam para os eletrodos positivos. A velocidade depende da forma, número de cruzamentos ou ligações, e da carga dos Nós ou Links. Quando a corrente é passada através do gel por um certo período, a posição dos Nós ou Links pode ser revelada manchando o gel com uma tinta fluorescente e colocando-o sob uma fonte de radiação ultravioleta, os Nós ou Links aparecem como bandas vermelhas fluorescentes em um fundo preto. O processo da *Agarose Gel*, fraciona a família produto de acordo com os tipos de Nós ou Links;

4º) Usando uma nova técnica biológica, *Cobertura Rec A*, a família produto é retirada do gel e recoberta por uma proteína chamada *Rec A*, que enrijece e engrossa o DNA aumentando o seu diâmetro de 20 para 100 Ângstrons, reduzindo o número de cruzamentos irrelevantes e facilitando a determinação dos cruzamentos nas configurações dos produtos de DNA através do microscópio eletrônico.

Essa nova precisão na determinação de produtos reação, abre a porta para análises matemáticas detalhadas, a construção de modelos topológicos para a ação enzimática.

2.9 Conclusões

Neste capítulo, procuramos apresentar, de maneira sucinta, os principais conceitos biológicos a serem utilizados ao longo deste trabalho.

Iniciamos com a teoria do surgimento da vida, explicando o que é uma célula, como ela surgiu, e de que forma a vida se estabeleceu na Terra.

Descrevemos a importância dos nucleotídeos e ácidos nucleicos, mostrando como eles realizam suas funções nas células.

Apresentamos os três tipos de recombinação do DNA, embora nos próximos capítulos, trataremos apenas das recombinações sítio-específica e transposicional, e apresentamos algumas correlações clínicas que envolvem recombinações, nos mostrando a importância de um estudo mais profundo nessa área e a complexidade deste assunto.

Por fim, como ocorre o processo de recombinação e a aproximação topológica para enzimologia usados nos próximos capítulos.

Capítulo 3

Os Invariantes Polinomiais

Neste capítulo, descrevemos sobre os invariantes polinomiais utilizando o artigo [1].

Em toda população natural de anéis de DNA alguns estão, até certo ponto, interligados em formas de Catenanes e Nós. A importância de compreender a estrutura dessas formas, vai além do DNA circular, porque cromossomos lineares *in vivo* podem estar interligados.

A forma espacial completa de Nós e Catenanes, pode ser determinada pela microscopia eletrônica de moléculas de DNA, que são recobertas com proteínas específicas para facilitar a sua visualização através do microscópio. Essa informação tem ajudado na compreensão do mecanismo dos processos que analisam e desvendam as estruturas de Nós e Catenanes.

O potencial dos métodos topológicos, está na habilidade para distingüir um número muito grande de Nós e Catenanes que surgem como produtos nos modelos alternativos de previsão. Por exemplo, um modelo proposto pela recombinação sítio-específica *integrase* fago lambda (λ) encontrado em [8], conseguiu prever corretamente entre 10^8 possibilidades de formas alternativas, a estrutura de um Nó produto.

Os invariantes polinomiais, foram inicialmente demonstrados pelo polinômio clássico de Alexander em 1928 [13], e sua elaboração subsequente foi dada por Conway em 1969 [14]. O polinômio de Alexander, entretanto, não pode distingüir imagens refletidas, e as enzimas geralmente possuem produtos que são *quiral*, isto é, produtos que possuem formas diferentes topologicamente de suas imagens refletidas.

Da nova geração de métodos de classificação de Nós e Catenanes utilizando invariantes polinomiais, o primeiro foi proposto por Jones em 1985 [10], e o segundo foi proposto simultaneamente e independentemente por Lickorish & Millett [1], Freyd & Yetter [11], Ocneanu [11], e Hoste [12], com o objetivo de esclarecer e estender os resultados pioneiros de Jones. Esses polinômios, solucionaram o problema das imagens refletidas, pois conseguem distingüi-las.

Os polinômios para uma molécula de DNA substrato, e os seus produtos obtidos pelos processos de recombinação ou da passagem de um fio do DNA sobre o outro, que é realizada pela ação de topoisomerasas, são relacionados por um teorema. Esse teorema, encontrado em [15], permite aplicações naturais do método polinomial para esses processos.

Neste capítulo, utilizamos as aplicações polinomiais de Lickorish & Millett e de Jones, que classificam os estados topológicos de Nós e Catenanes. Essas aplicações polinomiais, associam cada uma dessas formas a um único polinômio, que além de fornecer uma determinação rigorosa das moléculas de DNA que formam Nós e Catenanes, indica a estrutura das moléculas relacionadas (Seções 3.1 e 3.2).

Para facilitar a compreensão do método de aplicação polinomial, descrito na Seção 3.3, usamos alguns exemplos especiais, encontrados em [1], de Nós e Catenanes que aparecem com maior frequência em nosso trabalho. Na Seção 3.4, mostramos como a estrutura do DNA pode ser mudada através de duas operações básicas: Passagem de Segmento e Troca de Segmento, e as experiências laboratoriais realizadas utilizando recombinação sítio-específica. Em seguida, na Seção 3.5, apresentamos uma tabela que contém as projeções planares e os polinômios de Nós e Catenanes já conhecidos. Através dessa tabela, fazemos associações das projeções planares que obtemos com as projeções planares que já possuem polinômios conhecidos. Finalmente, na Seção 3.6 apresentamos as conclusões desse capítulo.

3.1 O Polinômio de Lickorish-Millet e o Teorema Principal

Nesta seção descrevemos, de forma sucinta, algumas definições que são importantes para a compreensão do restante do presente trabalho, e o principal teorema sobre invariantes polinomiais, que estão associados a Nós e Catenanes, de acordo com o trabalho de Lickorish & Millett (1987), encontrados em [1] e [15]. Esse trabalho tem mostrado que, todos os Nós ou Catenanes que possuem uma orientação, podem ser associados a um único polinômio com duas variáveis, l e m , com coeficientes inteiros.

Definição 3.1. *Um Nó é definido como uma curva fechada no espaço tridimensional. Portanto, um círculo é um Nó. Para evitar confusão, chamaremos o círculo de **Nó trivial**, e a composição de dois ou mais Nós de **Catenane** ou **Link**.*

Definição 3.2. Um Nó é definido como **Nó Primo** quando o número de cruzamentos é irreduzível.

Definição 3.3. Uma Catenane é definida como **Catenane Dimérica** quando possui dois anéis componentes.

Definição 3.4. Uma **curva orientada** é a escolha de uma direção específica a ser percorrida e mantida por todo o fio do DNA.

Definição 3.5. O cruzamento de dois segmentos da curva orientada em uma projeção planar é definido como **nó**, e este cruzamento pode ocorrer somente de duas maneiras. A Figura 3.1, ilustra a convenção dos nós resultantes desses cruzamentos.

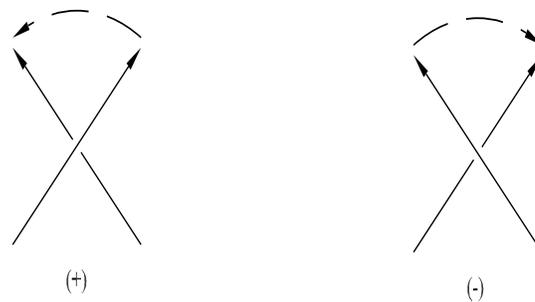


Figura 3.1: Convenção de Sinais dos nós.

O teorema principal sobre invariantes polinomiais, envolve a associação de polinômios a Nós ou Catenanes, e se divide em duas partes:

1ª Parte) Associado a cada forma orientada, existe um *único* polinômio, tal que, se duas formas orientadas possuem polinômios que são diferentes, então, elas são topologicamente distintas;

2ª Parte) Existe um algoritmo para computar os polinômios, que depende de duas regras simples, Passagem de Segmento e Troca de Segmento, e que qualquer maneira de aplicação dessas regras para formas topologicamente equivalentes resulta no mesmo polinômio.

O algoritmo computacional descoberto por Alexander em 1928 [13], emprega o método da mudança de uma projeção planar de um Nó ou Catenane, em um outro Nó ou Catenane que possui um polinômio já conhecido. Isso é realizado pela Passagem de Segmento ou pela Troca de Segmento.

Definição 3.6. *Passagem de Segmento* é a inversão das posições de dois segmentos que se cruzam, isto é, o segmento que está por baixo fica por cima ou vice-versa. Um exemplo dessa inversão, está ilustrado na Figura 3.2.

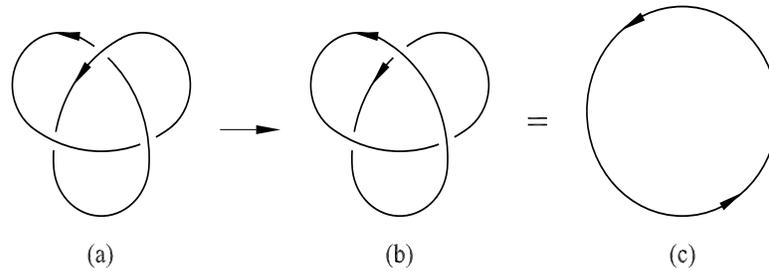


Figura 3.2: Passagem de Segmento.

Definição 3.7. *Troca de Segmento* é a conversão de um nó (+) ou um nó (-) em um nó (0), ou vice-versa. O nó (0) é um caso onde os segmentos não se cruzam, ou seja, o nó (0) é a deleção de um nó. A Figura 3.3, ilustra a geração de um nó (0).

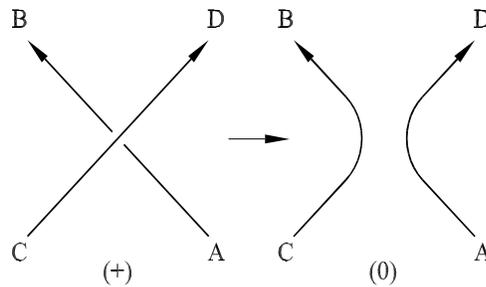


Figura 3.3: Troca de Segmento.

A Troca de Segmento altera a forma de Nós e Catenanes da seguinte forma:

- A mudança de um nó (+) ou um nó (-) de um Nó, para um nó (0) resulta em uma Catenane;
- A recíproca também é verdadeira, a mudança de um nó (0), formado por dois anéis de uma Catenane, em um nó (+) ou um nó (-) resulta em Nó;

- A mudança de um nó (0) de um Nó, para um nó (+) ou um nó (-) resulta uma Catenane.

Definição 3.8. Denote por K_+ , K_- e K_0 as projeções planares dos Nós ou Catenanes, exceto na vizinhança de um nó (+), (-) ou (0), respectivamente. A essa coleção chamamos **Conjunto Estado**.

Definição 3.9. Se $PK_+(l,m)$, $PK_-(l,m)$ e $PK_0(l,m)$ são os polinômios, com duas variáveis l e m , associados com os estados K_+ , K_- e K_0 , respectivamente, então:

$$lPK_+(l,m) + l^{-1}PK_-(l,m) + mPK_0(l,m) = 0. \quad (3.1)$$

Definição 3.10. O polinômio associado ao Nó trivial é igual a 1, portanto $VU(l, m)=1$.

3.2 O Polinômio de Jones e o Quarto Estado

Nesta seção, mostramos que o polinômio de Jones, $VK(t)$, além de ser usado para classificar Nós e Catenanes, apresenta as duas propriedades do teorema principal sobre invariantes polinomiais, descritas na Seção 3.1. Portanto, se duas formas possuem polinômios $VK(t)$ diferentes, então, elas são topologicamente distintas.

O polinômio $VK(t)$ possui propriedades similares ao do polinômio de Lickorish & Millett, podendo assim, ser obtido através de $PK(l,m)$, fazendo as seguintes substituições: $l = it^{-1}$ e $m = -i(t^{1/2} - t^{-1/2})$, onde $i = \sqrt{-1}$. Portanto, fazendo essas substituições para l e m na equação (3.1) da Seção 3.1, obtemos:

$$t^{-1}VK_+(t) - tVK_-(t) - (t^{1/2} - t^{-1/2})VK_0(t) = 0. \quad (3.2)$$

Definição 3.11. O Polinômio de Jones para o Nó trivial também é igual a 1, portanto $VU(t)=1$.

O quarto estado (K_∞), assim como o estado K_0 , é a deleção de um nó particular, e é importante na descrição da recombinação de enzimas. Dois casos separados do estado K_∞ precisam ser distingüidos:

Caso 1) Quando o estado K_∞ é gerado de um Nó, com um nó (+) em K_+ , o nó (∞) é convencionalmente definido como ilustra a Figura 3.4. A parte superior do segmento do nó (∞) é orientada da direita para a esquerda, enquanto que a parte inferior do segmento é orientada da esquerda para direita.



Figura 3.4: Comparação dos quatro tipos de nós. As flechas representam os segmentos cruzados de um Nó e ilustram os nós (+), (-), (0) e (∞), respectivamente.

Exemplo 3.1. O Conjunto Estado da Figura 3.5, é um exemplo do Caso 1. Observe que, o estado K_+ é o Nó trifólico (+), os estados K_- e K_∞ são Nós triviais, e o estado K_0 é a Catenane com interligação única. Se o estado K_+ é um Nó, e o estado K_0 é uma Catenane, então o número de ligação, $Lk(K_0)$, é igual a soma algébrica dos nós que interligam os anéis da Catenane. Podemos relacionar, $Lk(K_0)$ e os polinômios $VK_+(t)$, $VK_-(t)$ e $VK_\infty(t)$, através da seguinte equação:

$$VK_+(t) - tVK_-(t) - (1 - t)t^{3Lk(K_0)}VK_\infty(t) = 0. \quad (3.3)$$



Figura 3.5: Ilustração de um Conjunto Estado para os quatro tipos de nós.

Portanto, se $Lk(K_0)$ e os polinômios dos estados K_+ e K_- são conhecidos, então, podemos calcular o polinômio de $VK_\infty(t)$. A recíproca também é verdadeira, se o estado K_∞ e $Lk(K_0)$ são conhecidos, então, conhecendo o polinômio do estado K_+ obtemos o polinômio do estado K_- e vice-versa.

Caso 2) Quando o estado K_∞ é gerado de uma Catenane Dimérica, com um nó (+) em K_+ , o nó (∞) é definido de acordo com os Subcasos (2.1) e (2.2), dependendo do lado da troca.

- **Subcaso (2.1)** Se o lado da troca é formado por um cruzamento de um dos anéis com ele mesmo, o nó (∞) é definido como no Caso 1.

Exemplo 3.2. O Conjunto Estado da Figura 3.6, é um exemplo do Subcaso (2.1). Observe que, os dois anéis que compõe a Catenane podem ser definidos como: anel do lado direito ou anel do lado esquerdo, dependendo em qual lado do nó (0) eles estão. Se definimos $Lk(K_0)$, nesse caso, para ser o número de ligações do anel do lado direito com os outros dois anéis componentes, então o polinômio para o estado K_∞ satisfaz uma equação similar a equação (3.3):

$$VK_+(t) - tVK_-(t) - (1 - t)t^{3Lk(K_0)}VK_\infty(t) = 0. \quad (3.4)$$

Observe na Figura 3.6, que o estado K_+ é a Catenane com interligação única e o estado K_- é, topologicamente o mesmo que o estado K_+ . O estado K_0 é a Catenane com interligação única mais um Nó trivial, e o estado K_∞ é o mesmo que os estados K_+ e K_- . O anel componente do lado direito do estado K_0 é um Nó trivial que não se interliga com os outros dois anéis componentes, sendo assim, $Lk(K_0) = 0$. Então, fazendo essas substituições na equação (3.4), obtemos:

$$VK_+(t) - tVK_+(t) - (1 - t)VK_+(t) = 0,$$

pois os termos do lado esquerdo cancelam.

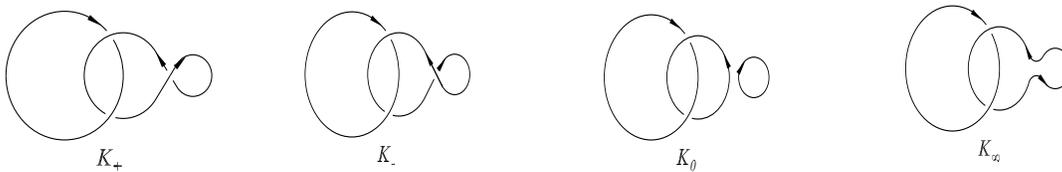


Figura 3.6: Formação de um nó (∞) conforme o Subcaso (2.1).

- **Subcaso (2.2)** Se o lado da troca é formado por um cruzamento entre os dois anéis da Catenane, o nó (∞) é definido como ilustra a Figura 3.7. O nó (∞) é agora definido com ambos segmentos orientados na mesma direção, da esquerda para direita, e não antiparalelos como nos outros casos. Nesse Subcaso, o polinômio do estado K_∞ pode ser calculado dependendo somente dos polinômios dos estados K_+ e K_- . Se $Lk(K_+)$ é igual ao número de ligações do estado K_+ , então:

$$VK_+(t) - tVK_-(t) - (1 - t)t^{3[Lk(K_+)-1/2]}VK_\infty(t) = 0. \quad (3.5)$$



Figura 3.7: Formação de um nó (∞) conforme o Subcaso (2.2).

Essa fórmula, mostra que o estado K_∞ é determinado somente pelos estados K_+ e K_- . Alguns exemplos do Subcaso (2.2), são apresentados na Seção 3.3.

Definição 3.12. Um Nó é **quiral**, se ele for diferente topologicamente da sua imagem refletida.

Definição 3.13. Um Nó é **aquiral** quando for possível ser deformado topologicamente em sua imagem refletida.

Definição 3.14. Se um Nó ou Catenane é topologicamente igual a sua imagem refletida, chamamos esse Nó ou Catenane de **anquiral** e o seu polinômio é simétrico em t e t^{-1} . Como exemplo, podemos citar o Nó que possui quatro nós anquiral cujo polinômio de Jones é $VK(t) = t^{-2} - t^{-1} + 1 - t + t^2$.

3.3 Exemplos Especiais da Aplicação Polinomial

Nesta seção, mostramos como encontrar os polinômios de alguns Nós e Catenanes que são conhecidos, através da aplicação das definições e do principal teorema sobre invariantes polinomiais da seção anterior. Ilustramos, como esses polinômios podem ser facilmente calculados e quais são os invariantes associados.

As Catenanes mais comuns de serem encontradas são interligadas, e conhecidas tecnicamente como membros da família toro, elas podem ser descritas analogamente para as classes de DNA dupla hélice, porque os dois anéis estão entrelaçados em uma forma helicoidal.

A hélice pode ter sentido direito ou sentido esquerdo, e a orientação dos dois anéis pode ser paralela ou antiparalela. As quatro classes resultantes desse tipo de Catenane são: Catenane sentido direito paralela, Catenane sentido esquerdo paralela, Catenane sentido direito antiparalela e Catenane sentido esquerdo antiparalela. Exemplos das formas que possuem sentido esquerdo estão ilustradas nas Figuras 3.13 e 3.14. Para o caso especial das Catenanes com interligação única, a primeira e a quarta classe são equivalentes, assim como, a segunda e a terceira. Elas foram definidas como o estado K_+ na Figura 3.9 e o estado K_- na Figura 3.10, respectivamente, de acordo com o sinal dos nós.

Os exemplos da Subseção 3.3.2 até a Subseção 3.3.10, surgem dessas classes de Catenanes e mostram como a *quiralidade* (forma topológica diferente da sua imagem refletida), e a orientação afetam os polinômios.

3.3.1 As duas cópias do Nó trivial

Para calcular o polinômio do Nó trivial, usamos o conjunto estado mostrado na Figura 3.8. Os estados K_+ , K_- e K_∞ são Nós triviais. Portanto, estabelecemos as duas cópias do Nó trivial para ser o estado K_0 . Pelas Definições 3.10 e 3.11, temos que os polinômios dos estados K_+ , K_- e K_∞ são iguais a 1, então, usando a equação (3.1) podemos calcular o polinômio para o estado K_0 :

$$\begin{aligned} l(1) + l^{-1}(1) + mPK_0(l, m) &= 0, \\ PK_0(l, m) &= -m^{-1}(l^{-1} + l). \end{aligned}$$

E com a equação (3.2) calculamos o polinômio de Jones:

$$t^{-1}(1) - t(1) + (t^{1/2} - t^{-1/2})VK_0(t) = 0$$

$$VK_0(t) = -(t^{1/2} + t^{-1/2}).$$

Se estabelecermos $\mu = -(t^{1/2} + t^{-1/2})$, verificamos que, para c cópias do Nó trivial temos μ^{c-1} . Uma vantagem importante dos invariantes polinomiais, é que eles podem ser calculados facilmente para Catenanes contendo mais que dois anéis, já que tais formas complexas são encontradas na natureza.

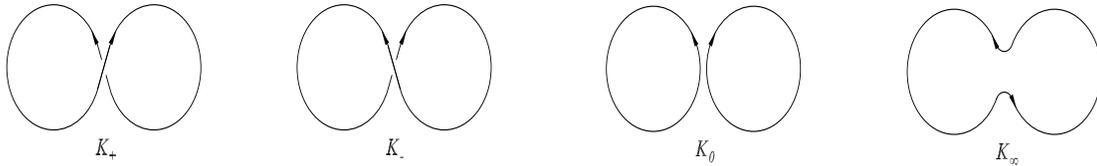


Figura 3.8: Conjunto Estado para as duas cópias do Nó trivial.

3.3.2 A Catenane R_p sentido direito paralela com interligação única

Para calcular o polinômio da Catenane R_p , usamos o Conjunto Estado ilustrado na Figura 3.9. Observe que o estado K_- consiste das duas cópias do Nó trivial, portanto seu polinômio é μ . O estado K_0 é o Nó trivial, cujo polinômio é igual a 1, por definição. Portanto, aplicando as equações (3.1) e (3.2), e fazendo as devidas substituições, obtemos o polinômio da Catenane R_p :

- Polinômio de L&M:

$$PR_p(l, m) = PK_+(l, m) = -l^{-1}(l^{-1}\mu + m)$$

$$= (l^{-3} + l^{-1})m^{-1} - l^{-1}m,$$

- Polinômio de Jones:

$$\begin{aligned} VR_p(t) &= VK_+(t) = t[t\mu + (t^{1/2} - t^{-1/2})] \\ &= -t^{5/2} - t^{1/2}. \end{aligned}$$

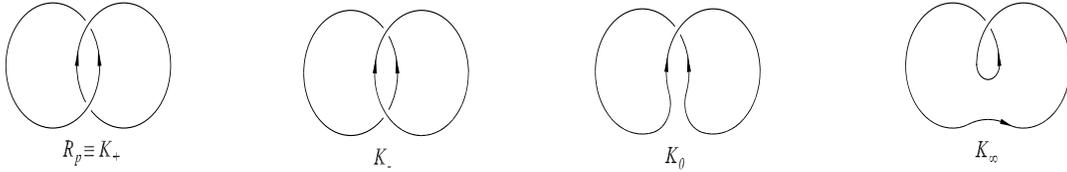


Figura 3.9: Conjunto Estado para Catenane R_p sentido direito paralela com interligação única.

3.3.3 A Catenane L_p sentido esquerdo paralela com interligação única

A Figura 3.10, ilustra o Conjunto Estado que utilizamos para calcular o polinômio da Catenane L_p . Associamos o estado K_- à Catenane L_p . O estado K_+ consiste das duas cópias do Nó trivial, e os estados K_0 e K_∞ são exatamente o Nó trivial. Então, substituindo os polinômios correspondentes aos estados K_+ , K_0 e K_∞ nas equações (3.1) e (3.2), obtemos os polinômios da Catenane L_p :

- Polinômio de L&M:

$$\begin{aligned} PL_p &= PK_-(l, m) = -l(l\mu + m) \\ &= (l + l^3)m^{-1} - lm, \end{aligned}$$

- Polinômio de Jones:

$$\begin{aligned} VL_p(t) &= VK_-(t) = t^{-1}[t^{-1\mu} - (t^{1/2} - t^{-1/2})] \\ &= -t^{-5/2} - t^{-1/2}. \end{aligned}$$

Observe que, no polinômio de duas variáveis, todas as potências da variável l para Catenanes sentido esquerdo são positivas, enquanto que todas as potências da variável l para Catenanes sentido direito são negativas.

No polinômio de uma variável, a Catenane sentido esquerdo possui somente potências negativas na variável t , enquanto que a Catenane sentido direito possui somente potências positivas. Isso nos leva ao seguinte corolário do teorema principal sobre invariantes polinomiais.

Corolário 3.1.: *Se \tilde{K} representa a imagem refletida de K , então os polinômios de \tilde{K} e K são relacionados pelas equações: $P\tilde{K}(l, m) = PK(l^{-1}, m)$ e $V\tilde{K}(t) = VK(t^{-1})$.*

Por exemplo, $L_p = \tilde{R}_p$ então, pelo Corolário 3.1 temos: $PL_p(l, m) = PR_p(l^{-1}, m)$, e $VL_p(t) = VR_p(t^{-1})$. Portanto, concluímos que para um Nó ou Catenane ser topologicamente equivalente à sua imagem refletida, ele tem que ser *anfiquiral*, Definição 3.14, Seção 3.2.

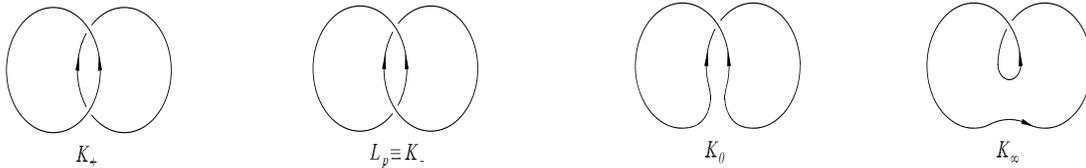


Figura 3.10: Conjunto Estado para Catenane L_p sentido esquerdo paralela com interligação única.

3.3.4 O Nó *trifólico* positivo, T_+

Para calcular o polinômio do Nó trifólico T_+ , usamos o Conjunto Estado como mostrado na Figura 3.5. Os estados K_- e K_∞ são Nós triviais e o estado K_0 é a Catenane R_p . Usando as equações (3.1) e (3.2) e os resultados obtidos através da Catenane R_p , obtemos os polinômios de T_+ :

- Polinômio de L&M:

$$\begin{aligned} PT_+(l, m) &= -l^{-2} - l^{-1}(ml^{-3}m^{-1} + ml^{-1}m^{-1} - ml^{-1}m) \\ &= -l^{-4} - 2l^{-2} + l^{-2}m^2, \end{aligned}$$

- Polinômio de Jones:

$$\begin{aligned} VT_+(t) &= t^2 + t(t^{1/2} - t^{-1/2})(-t^{5/2} - t^{1/2}) \\ &= -t^4 + t^3 + t. \end{aligned}$$

3.3.5 O Nó *trifólico* negativo, T_-

Calculamos o polinômio do Nó trifólico T_- através do Nó trifólico T_+ , pois T_- é a imagem refletida de T_+ . Então, pelo Corolário 3.1, substituímos l por l^{-1} e t por t^{-1} , para obtermos os polinômios correspondentes à imagem refletida de T_+ , isto é, os polinômios do Nó trifólico T_- :

- Polinômio de L&M:

$$PT_-(l, m) = -l^4 - 2l^2 + l^2m^2,$$

- Polinômio de Jones:

$$VT_-(t) = -t^{-4} + t^{-3} + t^{-1}.$$

Note que os polinômios de T_+ e T_- são distintos, portanto T_+ e T_- não são equivalentes. Com isso, concluímos que o trifólico não é *anfiquiral*.

3.3.6 A Catenane RD_p sentido direito paralela com interligação dupla

Para calcular o polinômio da Catenane RD_p , usamos o Conjunto Estado como ilustra a Figura 3.11. Observamos que o estado K_- é a Catenane R_p e que o estado K_0 é o Nó trifólico T_+ . Portanto, os polinômios da Catenane RD_p são:

- Polinômio de L&M:

$$\begin{aligned} PRD_p(l, m) &= PK_+(l, m) = (-l^{-5} - l^{-3})m^{-1} \\ &\quad + (l^{-5} + 3l^{-3})m - l^{-3}m^3, \end{aligned}$$

- Polinômio de Jones:

$$VRD_p(t) = VK_+(t) = -t^{11/2} + t^{9/2} - t^{7/2} - t^{3/2}.$$

Note que, todas as potências de l são negativas e as potências de t são positivas.

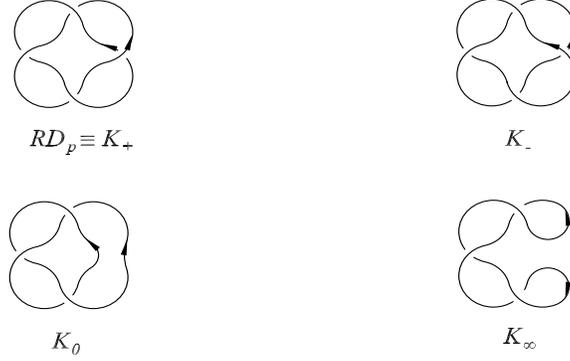


Figura 3.11: Conjunto Estado para Catenane RD_p sentido direito paralela com interligação dupla.

3.3.7 A Catenane RD_{ap} sentido direito antiparalela com interligação dupla

Calculamos o polinômio da Catenane RD_{ap} usando o Conjunto Estado como ilustra a Figura 3.12. Os estados K_+ , K_0 e K_∞ são a Catenane L_p , o Nó trivial e o Nó trifólico T_+ , respectivamente. Então, fazendo as devidas substituições nas equações (3.1) e (3.2), obtemos os polinômios correspondentes à Catenane RD_{ap} :

- Polinômio de L&M:

$$PRD_{ap}(l, m) = PK_-(l, m) = (-l^3 - l^5 m^{-1} + (-l + l^3)m,$$

- Polinômio de Jones:

$$VRD_{ap} = VK_-(t) = -t^{-9/2} - t^{-5/2} + t^{-3/2} - t^{-1/2}.$$

Note que, as potências de l são todas positivas e as potências de t são todas negativas, embora a Catenane tenha sentido direito. Isso resulta da propriedade de antiparalelismo da Catenane. Essa situação é análoga ao sinal do número de ligação, Lk , entre anéis catenalisados, onde a mudança do sentido ou da orientação muda o sinal das potências, enquanto a mudança de ambos o mantém.

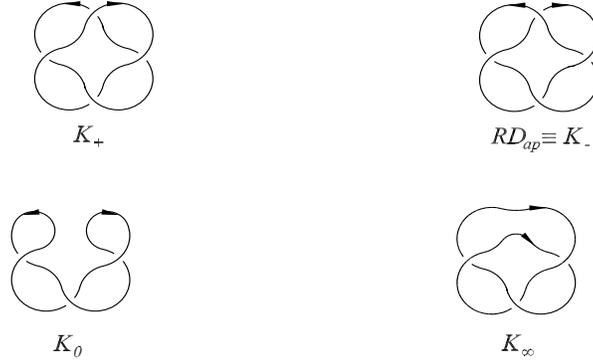


Figura 3.12: Conjunto Estado para Catenane RD_{ap} sentido direito antiparalela com interligação dupla.

3.3.8 A Catenane LD_p sentido esquerdo paralela com interligação dupla

O polinômio da Catenane LD_p , ilustrado na Figura 3.13, pode ser obtido através do polinômio da Catenane RD_p , usando o fato que a Catenane LD_p é a imagem refletida da Catenane RD_p . Portanto, do Corolário 3.1, temos que $VRD_p(t) = VLD_p(t^{-1})$. Então os polinômios da Catenane LD_p são:

- Polinômio de L&M:

$$PLD_p(l, m) = (-l^5 - l^3)m^{-1} + (l^5 + 3l^3)m - l^3m^3,$$

- Polinômio de Jones:

$$VLD_p(t) = -t^{-11/2} + t^{-9/2} - t^{-7/2} - t^{-3/2}.$$

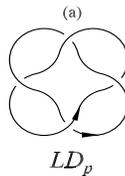


Figura 3.13: (a) Catenane LD_p sentido esquerdo paralela com interligação dupla.

3.3.9 A Catenane LD_{ap} sentido esquerdo antiparalela com interligação dupla

O polinômio da Catenane LD_{ap} , ilustrado na Figura 3.14, pode ser obtido através do polinômio da Catenane RD_{ap} , pois LD_{ap} é a imagem refletida de RD_{ap} . Portanto, os polinômios da Catenane LD_{ap} são:

- Polinômio de L&M:

$$PLD_{ap}(l, m) = (-l^{-3} - l^{-5})m^{-1} + (-l^{-1+l^{-3}})m,$$

- Polinômio de Jones:

$$VLD_{ap} = -t^{9/2} - t^{5/2} + t^{3/2} - t^{1/2}.$$

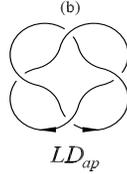


Figura 3.14: (b) Catenane LD_{ap} sentido esquerdo antiparalela com interligação dupla.

3.3.10 O Nó 4-cruzamentos, F

Para calcular o polinômio do Nó 4-cruzamentos, usamos o Conjunto Estado como ilustra a Figura 3.15. Observe que o estado K_- é o Nó trivial e o estado K_0 é a Catenane L_p . Portanto, fazendo as devidas substituições nas equações (3.1) e (3.2), obtemos os polinômios do Nó F:

- Polinômio de L&M:

$$PF(l, m) = PK_+(l, m) = -l^{-2} - l - l^2 + m,$$

- Polinômio de Jones:

$$VF(t) = VK_+(t) = t^{-2} - t^{-1} + 1 - t + t^2.$$

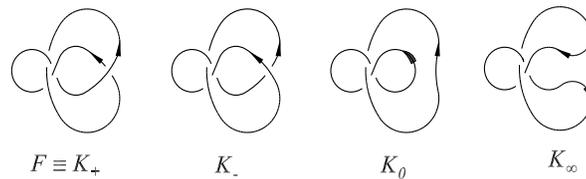


Figura 3.15: Nó 4-cruzamentos, F .

Observe que o Nó 4-cruzamentos é *anfiquiral*.

3.4 Aplicações do Polinômio de Jones para o DNA

Nesta seção, mostramos como o método polinomial fornece uma maneira rigorosa e lógica para a classificação de Nós e Catenanes, que é essencial para a descrição ordenada dessas formas e análises de seu papel celular. Por exemplo, vários processos celulares produzem Nós ou Catenanes de DNA que pertencem a família toro. Através dos polinômios, podemos provar que para essa família existe quatro, e somente quatro, formas espaciais para Catenanes contendo quatro ou mais nós, mas somente dois isômeros (mesma estrutura) de Nós e Catenanes com interligação única. Essas distinções são importantes, porque diferentes processos celulares geram tipos diferentes de Nós e Catenanes da forma toro.

3.4.1 Passagem de Segmento e Troca de Segmento

Nesta subseção, mostramos como a estrutura do DNA pode ser mudada através de duas operações básicas: Passagem de Segmento e Troca de Segmento, Definições 3.6 e 3.7 da Seção 3.1, respectivamente. A motivação para o uso de polinômios na descrição da estrutura do DNA fica, mais aparente, em sua descrição das ações das topoisomerasas e, particularmente, das enzimas de recombinação. A operação Passagem de Segmento, pode atar ou desatar Nós e a Troca de Segmento pode unir ou separar Catenanes. A questão fundamental é:

Dado um Nó ou Catenane particular, qual é a estrutura do DNA produto depois de uma Passagem de Segmento?

Essa questão é respondida, pelo menos em parte, pelo teorema principal sobre invariantes polinomiais que relaciona o DNA substrato com o DNA produto, através de outro DNA,

no qual um nó (+) ou um nó (-) é substituído por um nó (0) ou um nó (∞). Isso pode ser ilustrado usando as Catenanes DNA da forma toro.

Exemplo 3.3. *Uma Catenane toro paralela sentido direito que se entrelaça n vezes, possui $2n$ nós (+). Uma Passagem de Segmento, em um desses nós, muda-o para um nó (-), e o produto resultante é topologicamente o mesmo que uma Catenane paralela sentido direito que se entrelaça $(n-1)$ vezes. Nesse caso, o estado K_+ é a Catenane entrelaçada n vezes e o estado K_- é a Catenane entrelaçada $(n-1)$ vezes. O Conjunto Estado no qual $n=2$ está ilustrado na Figura 3.9. A mesma figura, mostra que o estado K_∞ é o Nó trivial. De fato, não importa qual o valor que n assume, o estado K_∞ é sempre o Nó trivial. Portanto, se o polinômio de Jones da Catenane com anéis entrelaçados entre si de forma helicoidal $(n-1)$ é conhecida, podemos usar a equação (3.5) para computar o polinômio da n -catenane, já que $VK_\infty(t)=1$.*

Em resumo, o polinômio de Jones pode ser usado para classificar todas as Catenanes DNA toro conhecendo somente o polinômio da Catenane com interligação única.

A segunda operação básica que pode mudar a estrutura do DNA é a Troca de Segmento, na qual dois pedaços de DNA são quebrados e os finais trocados. Esse é o processo de conversão de um nó (0) ou um nó (∞) em um nó (+) ou um nó (-). Novamente a questão fundamental é:

Dado um Nó ou Catenane de DNA particular, qual é o produto final depois da Troca de Segmento?

Para mostrar a utilidade da representação polinomial respondendo a essa questão, desenvolvemos duas aplicações específicas: a primeira aplicação, considerada na Subseção 3.4.2, mostra como podemos prever todos os produtos das reações sucessivas de *resolvase Tn3*, com somente o conhecimento do primeiro produto, e a segunda aplicação, que apresentamos em detalhes na Subseção 3.4.3, se refere a um tipo diferente de enzima de recombinação de um sítio-específico e a utilidade do quarto estado, K_∞ .

3.4.2 Modelo de recombinação *resolvase Tn3*, *in vitro*

Nesta subseção, mostramos os métodos laboratoriais usados nas experiências com *resolvase Tn3* em substratos de DNA circular duplex, [1], [2] e [3]. Os resultados dessas experiências, são apresentados com detalhes e relacionados ao polinômio de duas variáveis, $PK(l, m)$.

Essas experiências, foram de importância fundamental para compreensão e explicação do mecanismo enzimático, bem como para a construção de um modelo matemático capaz de prever os produtos resultantes das rodadas de recombinação *resolvase*.

Nesse tipo de recombinação sítio-específica, usa-se uma recombinase sítio-específica, *resolvase Tn3*, que reage com certos substratos de DNA circular duplex com sítios repetidos diretamente.

Inicia-se com um substrato de DNA que possui a forma de um Nó trivial supertorcido, e o trata com *resolvase*. Essa enzima (ou recombinase), age atando-se ao DNA circular, mediando um único evento de recombinação e liberando o produto *catenarizado*.

O primeiro resultado importante, obtido dessa recombinação, é a catenane com interligação única conhecida como **Link Hopf**, que é o produto da primeira rodada de recombinação.

A *resolvase* não age em Catenanes de DNA livres, ou seja, em DNA que não está atado pela enzima, porque a enzima não pode lidar com a justaposição dos locais quando esses estão em moléculas diferentes. Entretanto, foi observado nas experiências com *resolvase*, que uma vez em cada vinte encontros da enzima com o substrato, ela age processivamente ao longo de um segmento contínuo do DNA, isto é, depois da formação do complexo sináptico, no qual os sítios para serem recombinados são alinhados pela enzima, o processo da troca ocorre usualmente uma vez, mas é repetido ocasionalmente.

Através do encontro, em que a enzima age processivamente, é que foi possível a determinação da estrutura dos produtos, Nós ou Catenanes, dessas rodadas extras de recombinação. Com isso, conseguimos analisar as ações enzimáticas e modelar matematicamente esse mecanismo enzimático, específico para a recombinação *resolvase Tn3*.

Estudos topológicos têm dado uma informação precisa sobre os detalhes do complexo sináptico *resolvase* e do processo da Troca de Segmentos, como ilustrados na Figura 3.16. Observe na Figura 3.16 que durante a recombinação, a enzima atua em ambos os sítios-específicos do DNA, formando assim, dois domínios que são representados na Figura 3.16, por uma linha grossa e uma linha fina. Os sítios *res* sinapsados (sítios que estão atados pela enzima *resolvase*), são alinhados paralelamente pela enzima, com três nós (-) interdominais (nós que são formados pelo cruzamento de domínios diferentes), que permanecem fixos por causa da ação enzimática. Para cada rodada de recombinação um quarto nó (+) interdominal é introduzido. Consideramos S o substrato, e os estados K_1 , K_2 , K_3 e K_4 como os quatro primeiros produtos das rodadas de recombinação, respectivamente. O mecanismo *resolvase* gera uma série de nós (+) ao longo de um segmento contínuo de DNA, um para cada rodada de recombinação. Se o estado K_n é o produto depois de n

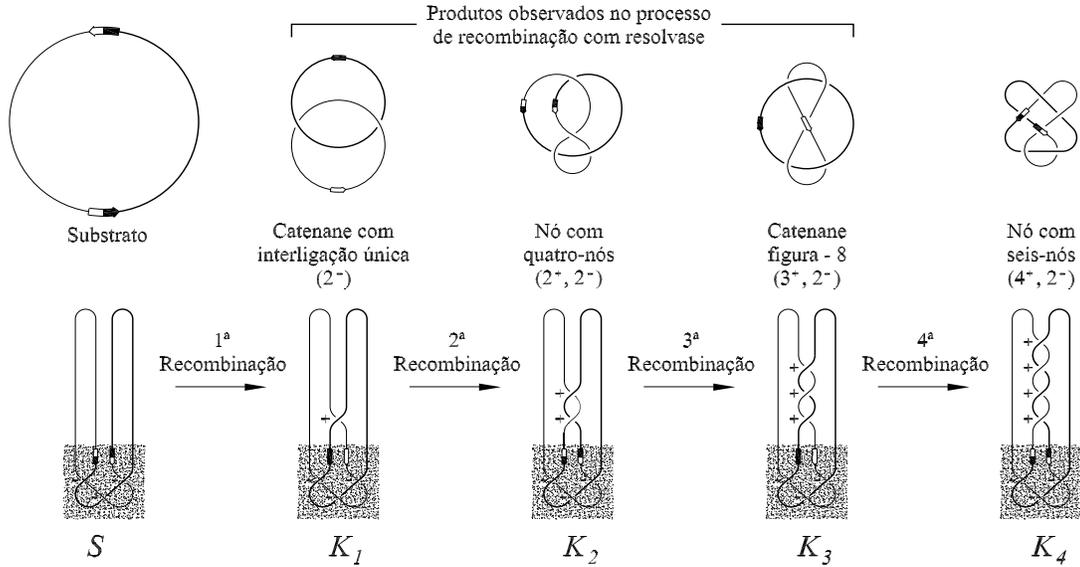


Figura 3.16: Produtos da recombinação de um Nó trivial pelo processo *resolvase*.

rodadas, mostramos a seguir que o estado K_n pode ser completamente determinado por S e K_1 .

Consideramos o Conjunto Estado, para a segunda rodada de recombinação, em que os estados K_0 e K_+ são K_1 e K_2 , respectivamente. O estado K_- é topologicamente equivalente ao substrato original, S . Os polinômios dessas moléculas são relacionados pela equação:

$$lPK_+(l, m) + l^{-1}PK_-(l, m) + mPK_0(l, m) = 0,$$

ou:

$$lPK_2(l, m) + l^{-1}PS(l, m) + mPK_0(l, m) = 0,$$

já que $PK_-(l, m) = PS(l, m)$.

Portanto, podemos escrever o polinômio para o estado K_2 em termos dos polinômios dos estados S e K_1 . De fato, obtemos:

$$PK_2(l, m) = l^{-1}(-mPK_1(l, m) - l^{-1}PS(l, m)).$$

Então, a topologia do estado K_2 é conhecida em termos da topologia dos estados K_1 e S . A seguir, consideramos o conjunto estado, para a terceira rodada de recombinação, em que o estado K_0 é o estado K_2 , o estado K_+ é o produto da terceira rodada (o estado K_3), e o estado K_- é topologicamente equivalente ao estado K_1 (que é o produto da primeira rodada). Seus polinômios são relacionados pela equação:

$$lPK_+(l, m) + l^{-1}PK_-(l, m) + mPK_0(l, m) = 0,$$

ou

$$lPK_3(l, m) + l^{-1}PK_1(l, m) + mPK_2(l, m) = 0,$$

Então, podemos escrever $PK_3(l, m)$ em termos de $PK_1(l, m)$ e $PK_2(l, m)$, obtendo a seguinte equação:

$$PK_3(l, m) = l^{-1}(-mPK_2(l, m) - l^{-1}PK_1(l, m)).$$

Mas $PK_2(l, m)$ é conhecido em termos de $PK_1(l, m)$ e $PS(l, m)$, então obtemos a equação:

$$\begin{aligned} PK_3(l, m) &= l^{-1}[-ml^{-1}(-mPK_1(l, m) - l^{-1}PS(l, m) - l^{-1}PK_1(l, m))] \\ &= (+m^2l^{-2} - l^{-2})PK_1(l, m) + ml^{-2}PS(l, m). \end{aligned}$$

Então, a topologia do estado K_3 é conhecida em termos da topologia dos estados S e K_1 . Se esse procedimento é repetido, obtemos que o estado K_n é conhecido, se os estados K_1 e S são conhecidos.

Existe uma outra propriedade desse tipo de reação. Se iniciarmos a recombinação com o substrato original S (o Nó trivial) e considerando m igual a qualquer inteiro positivo, teremos duas possibilidades:

- Para rodadas **pares**: os estados K_2, K_4, \dots, K_{2m} , serão Nós;
- Para rodadas **ímpares**: os estados $K_1, K_3, \dots, K_{2m-1}$, serão Catenanes.

Podemos então, via teoria polinomial, determinar todos os produtos da reação *resolvase*, se conhecermos quaisquer dois produtos que são sucessivos. Isso pode ser generalizado pela equação:

$$PK_n = -l^{-2}PK_{n-2} - l^{-1}mPK_{n-1}.$$

A importância desse resultado, é o rigor matemático que ele traz para o estudo da recombinação. Pela primeira vez, os produtos de um mecanismo particular de recombinação puderam ser previstos matematicamente. O resultado pode ser generalizado para qualquer processo que gera uma série de nós (+) ou nós (-) ao longo de um segmento contínuo de DNA.

3.4.3 Modelo de recombinação *Integrase* fago lambda (λ), *in vitro*

Nesta subseção mostramos um exemplo de recombinação sítio-específica que ocorre quando a recombinase liga-se a ambos os sítios de recombinação na molécula de DNA, podendo produzir uma inserção. Um exemplo bem estudado, é oferecido pela integração dos chamados fagos temperados (vírus que nem sempre matam seus hospedeiros), dos quais o fago lambda (λ) é o mais entendido. Bacteriófago, ou simplesmente fago, é um vírus específico para bactérias.

Na recombinação sítio-específica do bacteriófago λ de *Escherichia coli*, o DNA do vírus infecta a bactéria *E. coli*, podendo formar um anel de segmento duplo quando se insere na bactéria. Sob certas condições, o DNA viral pode inserir-se no DNA hospedeiro. Essa reação é catalisada por uma enzima chamada *integrase* λ que é codificada pelo DNA viral. A *integrase* age cortando os anéis do DNA viral e do DNA bacterial, e ligando os finais cortados, para que o DNA viral se torne um segmento do cromossomo bacterial.

Em seguida, comentamos os resultados experimentais utilizando a recombinação sítio-específica *integrase* fago lambda (λ), que podem ser encontrados em [1]. Nessas experiências, a enzima reage com substratos de DNA circular duplex supertorcidos da forma plectonêmica, isto é, DNA que possui supertorções negativas com sentido direito, e a *integrase*, age em sítios repetidos diretamente ou em sítios repetidos inversamente.

Essas experiências, foram importantes para a construção de um modelo matemático capaz de obter a estrutura dos produtos gerados pela recombinação sítio-específica usando somente o número de supertorções que estão no substrato sináptico intermediário. Os resultados dessas experiências são apresentados com detalhes e relacionados ao polinômio de uma variável, $VK(t)$.

O polinômio de Jones pode ser escrito em termos do nó (∞), que por definição, não possui uma orientação global específica. Essa é exatamente a propriedade matemática desejada para os sistemas de enzima, tais como a *integrase*, que recombina os sítios-específicos sem considerar a orientação global. Primeiramente, devemos distinguir a orientação local

da orientação global.

Definição 3.15. ***Orientação Global** é a escolha de uma direção, na qual se caminha em um DNA circular. Uma vez que a escolha é feita, ela não pode ser alterada em nenhum caminho do círculo, e portanto todos os segmentos do DNA possuem a mesma direção global.*

Definição 3.16. ***Orientação Local** é a escolha de uma direção, na qual se caminha em um pequeno segmento do círculo de DNA, e portanto a orientação local não precisa coincidir com a orientação global.*

Definição 3.17. ***Repetições Diretas** é quando a orientação global concorda com a orientação local.*

Definição 3.18. ***Repetições Inversas** é quando a orientação global discorda da orientação local.*

Mostramos a seguir, dois exemplos de recombinação *integrase* fago λ , onde iniciamos com um substrato de DNA que possui a forma de um Nó trivial plectonêmico. O Exemplo 3.4 mostra a recombinação *int* agindo em sítios que possuem repetições inversas, e o Exemplo 3.5 apresenta a recombinação *int* agindo em sítios repetidos diretamente.

Exemplo 3.4. *A Figura 3.17, ilustra a recombinação *int* agindo em sítios repetidos inversamente. A orientação local está representada pelas flechas vazias e a orientação global está representada pelas flechas cheias. Temos que, quatro supertorções com nós (-) ficam presas entre os sítios, mas esse número pode variar. Como a resolvase e a integrase, são enzimas que alinham os sítios na forma localmente paralelos, como resultado um nó (∞) é criado. O alinhamento paralelo dos sítios inversos, requer que o número de nós supertorcidos presos entre os sítios sejam pares, isto é, $2m$ onde m é um inteiro. A recombinação introduz um novo nó (+) que altera o sinal dos nós presos entre os sítios, formando assim, um Nó com $2m+1$ nós (+).*

O resultado disso é que podemos obter a estrutura do Nó calculando seu polinômio de Jones por um método de recursão, conhecendo somente o número de nós supertorcidos presos no substrato sináptico intermediário.

O método é ilustrado pelos conjuntos das Figuras 3.5 e 3.18. O substrato é o estado K_∞ , e o estado K_+ é o produto da recombinação. Para calcular $VK_+(t)$ através da equação (3), determinamos $Lk(K_0)$ e $VK_-(t)$ da seguinte forma:



Figura 3.17: Recombinação por *int* entre sítios repetidos inversamente.



Figura 3.18: Conjunto Estado para a recombinação por *int* mostrada na Figura 3.17.

- Se o número de nós presos no substrato é $2m$, então, existe exatamente $2m$ nós (+) no estado K_0 , portanto $Lk(K_0)=m$;
- Se o estado K_- é o produto que seria obtido se o substrato tivesse dois nós presos a menos, isto é, $2m-2$ nós, então, o estado K_+ da Figura 3.5, o Nó trifólico (+), é o produto obtido se dois nós supertorcidos são presos, que é exatamente o estado K_- mostrado na Figura 3.18, onde quatro nós supertorcidos são presos.

Dado K_{2m+1} e K_{2m-1} denotando, respectivamente, os produtos de recombinação cujos substratos possuem $2m$ e $2m-2$ nós supertorcidos presos. Então, usando a equação (3) e as análises anteriores, obtemos:

$$VK_{2m+1}(t) - tVK_{2m-1}(t) - (1-t)t^{3m} = 0.$$

Se $m=1$, Figura 3.5, o estado K_- é o Nó trivial, e então $VK_-(t) = 1$. Portanto, obtemos uma fórmula de recursão:

$$VK_{2m+1}(t) = t^m \left[1 + (1-t) \sum_{k=1}^m t^{2k} \right].$$

Com isso, temos:

- Para $m=1$:

$$VK_3(t) = -t^4 + t^3 + t,$$

que é o polinômio para o trifólico T_+ , Figura 3.5;

- Para $m=2$:

$$VK_5(t) = -t^7 + t^6 - t^5 + t^4 + t^2,$$

que é o polinômio para o Nó toro positivo denotado por 5_1 como mostra a Tabela 3.2, Seção 3.5.

Conclusão do Exemplo 3.4.: O procedimento polinomial utilizado pode ser estendido para substratos contendo qualquer número par de supertorções entre os sítios RI. O produto é sempre um Nó toro positivo, e o número de nós do Nó aumenta de acordo com o número de supertorções que são presas. Isso é exatamente o que se observa nas experiências. Portanto, essa é a primeira previsão matemática rigorosa do resultado e mostra novamente o poder dos invariantes polinomiais.

Exemplo 3.5. *A Figura 3.19, ilustra a recombinação int agindo em sítios repetidos diretamente. A orientação local está representada pelas flechas vazias e a orientação global está representada pelas flechas cheias. Nesse caso, o número de nós supertorcidos que são presos é ímpar, isto é, $2m-1$ onde m é um inteiro. Assim temos que cinco supertorções (-) são presas entre os sítios sinapsados no substrato. Nesse caso, um nó (0) antes que um nó (∞) é formado por uma orientação paralela dos sítios, e a recombinação cria um nó (-), formando uma Catenane com $2m$ nós (-).*

Apresentamos a seguir, um método de recursão para computar o polinômio de Jones do produto, conhecendo somente o número de nós supertorcidos que são presos no substrato sináptico intermediário.

O método está ilustrado nas Figuras 3.10, 3.12 e 3.20. O estado K_0 é o substrato, e o estado K_- é o produto depois da recombinação. Para calcular $VK_-(t)$, usando a equação (2), devemos determinar $VK_+(t)$. O estado K_+ é o produto a ser obtido, se o substrato iniciar com dois nós presos a menos, isto é, $2m-3$ nós (-). Por exemplo, o estado K_- na Figura 3.10, a Catenane negativa com interligação única, é o produto se um nó é



Figura 3.19: Recombinação por *int* entre sítios repetidos diretamente.

preso. Mas isso é precisamente o estado K_+ na Figura 3.12, em que três nós são presos. Similarmente, o estado K_- na Figura 3.12, a Catenane RD_{ap} , é o produto se três nós são presos, e é também o estado K_+ na Figura 3.20, em que cinco nós são presos.

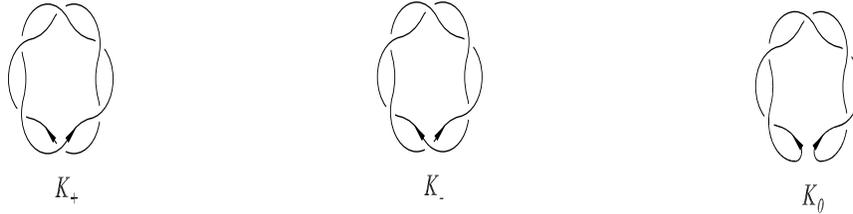


Figura 3.20: Conjunto Estado para a recombinação por *int* mostrada na Figura 3.19.

Sejam K_{2m} e K_{2m-2} , respectivamente, os produtos de recombinação cujos substratos possuem $2m-1$ e $2m-3$ nós presos. Então, usando a equação (2) e a análise anterior, obtemos:

$$t^{-1}VK_{2m-2}(t) - tVK_{2m}(t) - (t^{1/2} - t^{-1/2}) = 0.$$

No caso quando $m=1$, Figura 3.10, o estado K_+ consiste de dois círculos que não estão unidos, para que $VK_+(t) = -(t^{1/2} - t^{-1/2})$. Com isso, obtemos uma fórmula de recursão:

$$VK_{2m}(t) = -t^{-2m}(t^{1/2} + t^{-1/2}) \left[\sum_{k=1}^m t^{1-2k} \right].$$

Portanto, temos que:

- Para $m=1$:

$$VK_2(t) = -t^{-5/2} - t^{-1/2},$$

que é o polinômio da Catenane L_p , Figura 3.10.

- Para $m=2$:

$$VK_4(t) = -t^{-9/2} - t^{-5/2} + t^{-3/2} - t^{-1/2},$$

que é o polinômio da Catenane RD_{ap} , Figura 3.12.

- Para $m=3$:

$$VK_6(t) = -t^{-13/2} - t^{-9/2} + t^{-7/2} - t^{-5/2} + t^{-3/2} - t^{-1/2},$$

que é o polinômio da Catenane toro sentido direito antiparalela com interligação tripla, Tabela 3.1 Seção 3.5, denotada por 6_1^2 , Figura 3.19.

Conclusão do Exemplo 3.5.: O procedimento polinomial utilizado pode ser generalizado para diferentes números ímpares de supertorções entre os sítios no substrato, e o produto sempre pertence à mesma família e difere somente no número de nós. Experiências laboratoriais mostram que os produtos são, de fato, Catenanes toro sentido direito, e essa é a primeira previsão matemática do resultado.

3.5 Tabela de Polinômios

Nesta seção, apresentamos uma tabela contendo os polinômios $PK(l, m)$, de duas variáveis (Lickorish & Millett, 1987), e os polinômios de uma variável $VK(t)$ (Jones, 1985), associados aos Nós Primos.

Para as Catenanes, os anéis possuem as orientações especificadas e são ilustrados por duas linhas, fina e grossa, que são necessárias para facilitar a visualização da quantidade de anéis componentes. Na primeira coluna temos a nomenclatura de Rolfsen, n_j^i , onde n é o número de nós, i é o número de anéis componentes e j distingüi projeções planares diferentes das Catenanes com o mesmo número de nós. A segunda coluna, representa os polinômios $PK(l, m)$ e $VK(t)$ e a terceira coluna representa as projeções planares das Catenanes.

Para os Nós, a primeira coluna representa a notação clássica, n_i de Alexander & Briggs (1927), onde n é o número de nós e i distingüi projeções planares que são diferentes, mas que possuem o mesmo número de nós. A segunda coluna, representa os polinômios $PK(l, m)$ e $VK(t)$ e a terceira coluna representa as projeções planares dos Nós.

Tabela 3.1: Polinômios para Catenanes Diméricas Primos

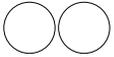
| Notação de Rolfsen | Polinômios de Jones Polinômios de Lickorish-Millett | Projeções Planares |
|--------------------|---|---|
| 0_1^2 | $-t^{-1/2} - t^{1/2}$ $m^{-1}(-l^{-1} - l)$ |  |
| 2_1^2 | $-t^{-5/2} - t^{-1/2}$ $m^{-1}(l + l^3) - ml$ |  |
| 4_1^2 | $-t^{-11/2} + t^{-9/2} - t^{-7/2} - t^{-3/2}$ $m^{-1}(-l^3 - l^5) + m(3l^3 + l^5) - m^3l^3$ |  |
| 5_1^2 | $t^{-7/2} - 2t^{-5/2} + t^{-3/2} - 2t^{-1/2} + t^{1/2} - t^{-3/2}$ $m^{-1}(-l^{-1} - l) + m(l^{-1} + 2l + l^3) - m^3l$ |  |
| 6_1^2 | $-t^{-17/2} + t^{-15/2} - t^{-13/2} + t^{-11/2} - t^{-9/2} - t^{-5/2}$ $m^{-1}(l^5 + l^7) + m(-6l^5 - 3l^7) + m^3(5l^5 + l^7) - m^5l^5$ |  |
| 6_3^2 | $-t^{-15/2} + 2t^{-13/2} - 2t^{-11/2} + 2t^{-9/2} - 3t^{-7/2} + t^{-5/2} - t^{-3/2}$ $m^{-1}(-l^3 - l^5) + m(2l^3 - l^5 - l^7) + m^3(-l^3 + l^5)$ |  |
| 7_7^2 | $-t^{-5/2} - t^{9/2} - t^{13/2} + t^{15/2}$ $m^{-1}(l^{-9} + 3l^{-7} + 2l^{-5}) + m(-4l^{-7} - 6l^{-5}) + m^3(l^{-7} + 5l^{-5}) - m^5l^{-5}$ |  |
| 8_1^2 | $-t^{-23/2} + t^{-21/2} - t^{-19/2} + t^{-17/2} - t^{-15/2} + t^{-13/2} - t^{-11/2} - t^{-7/2}$ |  |

Tabela 3.2: Polinômios para Nós Primos

| Notação de Alexander-Briggs | Polinômios de Jones Polinômios de Lickorish-Millett | Projeções Planares |
|-----------------------------|--|---|
| 0_1 | $\begin{matrix} 1 \\ 1 \end{matrix}$ |  |
| 3_1 | $\begin{matrix} -t^{-4} + t^{-3} + t^{-1} \\ -2l^2 - l^4 + m^2l^2 \end{matrix}$ |  |
| 4_1 | $\begin{matrix} t^{-2} - t^{-1} + 1 - t + t^2 \\ -l^{-2} - l - l^2 + m^2 \end{matrix}$ |  |
| 5_1 | $\begin{matrix} -t^{-7} + t^{-6} - t^{-5} + t^{-4} + t^{-2} \\ 3l^4 + 2l^6 + m^2(-4l^4 - l^6) + m^4l^4 \end{matrix}$ |  |
| 5_2 | $\begin{matrix} -t^{-6} + t^{-5} - t^{-4} + 2t^{-3} - t^{-2} + t^{-1} \\ -l^2 + l^4 + l^6 + m^2(l^2 - l^4) \end{matrix}$ |  |
| 6_1 | $\begin{matrix} t^{-4} - t^{-3} + t^{-2} - 2t^{-1} + 2 - t + t^2 \\ -l^{-2} + l^2 + l^4 + m^2(1 - l^2) \end{matrix}$ |  |
| 6_2 | $\begin{matrix} t^{-5} - 2t^{-4} + 2t^{-3} - 2t^{-2} + 2t^{-1} - 1 + t \\ 2 + 2l^2 + l^4 + m^2(-1 - 3l^2 - l^4) + m^4l^2 \end{matrix}$ |  |
| 7_1 | $\begin{matrix} -t^{-10} + t^{-9} - t^{-8} + t^{-7} - t^{-6} + t^{-5} + t^{-3} \\ -4l^6 - 3l^8 + m^2(10l^6 + 4l^8) + m^4(-6l^6 - l^8) + m^8l^6 \end{matrix}$ |  |
| 7_3 | $\begin{matrix} t^2 - t^3 + 2t^4 - 2t^5 + 3t^6 - 2t^7 + t^8 - t^9 \\ -2l^{-8} - 2l^{-6} + l^{-4} + m^2(l^8 + 3l^6 - 3l^4) + m^4(-l^{-6} + l^4) \end{matrix}$ |  |
| 7_7 | $\begin{matrix} -t^{-3} + 3t^{-2} - 3t^{-1} + 4 - 4t + 3t^2 - 2t^3 + t^4 \\ l^{-4} + 2l^{-2} + 2 + m^2(-2l^{-2} - 2 - l^2) + m^4 \end{matrix}$ |  |
| 8_3 | $\begin{matrix} t^{-4} - t^{-3} + 2t^{-2} - 3t^{-1} + 3 - 3t + 2t^2 - t^3 + t^4 \\ l^{-4} - 1 + l^4 + m^2(-l^{-2} + 2 - l^2) \end{matrix}$ |  |
| 9_1 | $-t^{-13} + t^{-12} - t^{-11} + t^{-10} - t^{-9} + t^{-8} - t^{-7} + t^{-6} + t^{-4}$ |  |
| 9_2 | $-t^{-11} + t^{-10} - 2t^{-9} + 3t^{-8} - 3t^{-7} + 4t^{-6} - 3t^{-5} + 2t^{-4} + t^{-2} - t^{-3}$ |  |

3.6 Conclusões

No estudo da topologia do DNA, polinômios associados com Nós e Catenanes são importantes em dois aspectos. Primeiro, descrevem e classificam Nós e Catenanes de uma maneira precisa, e discriminam suas características principais através de eventuais aspectos da estrutura, permitindo uma determinação rigorosa se duas formas são idênticas ou não, e como as várias formas existentes estão relacionadas. Segundo, delineando aspectos críticos da estrutura, os polinômios facilitam a determinação do mecanismo enzimático que forma Nós e Catenanes.

O problema da classificação é essencialmente solucionado para Nós e Catenanes conhecidos. O número de nós sustenta uma leitura de primeiro nível na codificação e é também fundamental para a estrutura do DNA em solução.

Apresentamos exemplos dos mecanismos de recombinação sítio-específica que utilizam *resolvase* e *integrase*, onde o supertorcimento do substrato contribui para produzir estruturas de Nós e Catenanes, através de uma abordagem polinomial. Isso foi realizado, através da comparação do substrato e do produto no conjunto estado. Portanto, a estrutura dos produtos de diferentes mecanismos de recombinação pode ser prevista com precisão.

Capítulo 4

Método de Aplicação do Polinômio de Jones para Nós Primos e Catenanes Diméricas

Neste capítulo apresentamos, através de exemplos, o método de aplicação polinomial para se calcular o polinômio de Jones dos Nós Primos 5_1 e 7_7 , e das Catenanes Diméricas 5_1^2 e 7_7^2 . A concepção desse método de aplicação polinomial, é de extrema importância para a compreensão do Capítulo 5. Este método de aplicação polinomial pode ser encontrado em [1].

4.1 Nó Primo 5_1

Nesta seção apresentamos, passo a passo, uma fórmula de recursão para se calcular o polinômio de Jones do Nó Primo 5_1 . Essa fórmula de recursão, é usada quando o substrato de DNA possui a forma de um Nó trivial plectonêmico ou de sua imagem refletida.

1º Passo) Para encontrarmos o Conjunto Estado do Nó Primo 5_1 , procedemos da seguinte maneira:

1. Usamos a projeção planar do Nó Primo 5_1 , veja Tabela 3.2 do Capítulo 3, e damos a ela uma orientação. A orientação, é a escolha de uma direção específica a ser percorrida e mantida por todo o fio do DNA, e nesse caso, pode ser feita de duas maneiras: *sentido horário* ou *sentido anti-horário*, em nosso caso, escolhemos o sentido anti-horário. Para os Nós qualquer que seja a escolha de uma direção es-

pecífica, não acarretará em mudanças nos sinais dos nós, pois Nós possuem apenas um componente;

2. Escolhemos qualquer um dos nós, e o definimos como sendo um dos estados do Conjunto Estado, de acordo com o sinal do nó escolhido. Em nosso exemplo, o Nó Primo 5_1 possui todos os nós (-), portanto escolhemos um deles e o definimos como sendo o estado K_- do Conjunto Estado;
3. Através do estado K_- , conseguimos encontrar os estados K_+ , K_0 e K_∞ aplicando as seguintes regras:
 - (a) A *Passagem de Segmento* que, em nosso caso, converte o sinal (-) escolhido em um sinal (+) formando assim, o estado K_+ ;
 - (b) A *Troca de Segmento* que deleta o nó (-) escolhido, formando o estado K_0 ;
 - (c) O *quarto estado* (K_∞) que, em nosso caso, é gerado de um Nó com um nó (-) em K_- , então o nó (∞) é definido da seguinte forma: A parte superior do segmento do nó (∞) é orientada da direita para a esquerda, enquanto que a parte inferior do segmento é orientada da esquerda para direita. A Figura 4.1 ilustra o Conjunto Estado do Nó Primo 5_1 .

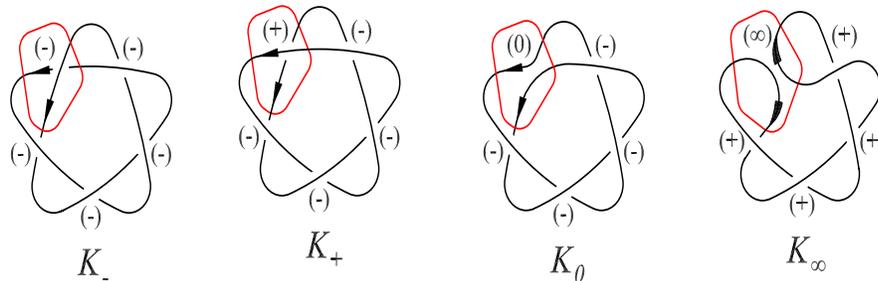


Figura 4.1: Conjunto Estado do Nó Primo 5_1 .

2º Passo) Analisamos cada estado do Conjunto Estado do Nó Primo 5_1 , e concluímos que o estado K_∞ , que representa o substrato da recombinação, é um substrato de DNA que possui a imagem refletida de um Nó trivial plectonêmico. Sendo assim, podemos usar uma fórmula de recursão que nos permite calcular, de forma mais ágil, o polinômio de Jones através do número de supertorções que ficam presas entre os sítios de um substrato plectonêmico, pois através do Corolário 3.1 podemos fazer as devidas substituições para

encontrarmos o polinômio da imagem refletida. A aplicação desse método, para este caso, é realizada da seguinte maneira:

1. O substrato plectonêmico, que é a imagem refletida do estado K_∞ , possui sítios com repetições inversas e pode ter seu polinômio de Jones calculado através de uma fórmula de recursão. Quando isso ocorre, o número de nós supertorcidos presos entre os sítios tem que ser par, isto é, $2m$ onde m é um inteiro. Neste caso, o número de nós presos entre os sítios é igual a 4, então, temos que: $2m = 4 \implies m = 2$;
2. Se o número de nós presos no substrato é $2m$, então, existe exatamente $2m$ nós (+) intercomponentes no estado que é a imagem refletida do estado K_0 , e portanto $Lk(K_0) = m$. Analisando a imagem refletida do estado K_0 , temos exatamente que $Lk(K_0) = m = 2$, e $2m$ nós (+) = 4 nós (+) intercomponentes. Usando o método de recursão, temos:

$$\begin{aligned}
 VK_{2m-1}(t) &= t^m \left[1 + (1-t) \sum_{k=1}^m t^{2k} \right] \\
 VK_{5(-)}(t) &= t^2 \left[1 + (1-t) \sum_{k=1}^2 t^{2k} \right] \\
 VK_{5(-)}(t) &= t^2 [1 + (1-t)(t^2 + t^4)] \\
 VK_{5(-)}(t) &= -t^7 + t^6 - t^5 + t^4 + t^2.
 \end{aligned}$$

3. Pelo Corolário 3.1 do Capítulo 3, temos que: $VK_{5_1(-)}(t) = VK_{5_1(+)}(t^{-1})$. Então, o polinômio de Jones correspondente ao Nó Primo 5_1 é:

$$VK_{5_1(-)}(t) = -t^{-7} + t^{-6} - t^{-5} + t^{-4} + t^{-2}.$$

4.2 Nó Primo 7_7

Nesta seção mostramos, passo a passo, todo o procedimento do método de aplicação polinomial para se calcular o polinômio de Jones do Nó Primo 7_7 .

1º Passo) Para encontrarmos o Conjunto Estado do Nó Primo 7_7 , procedemos da seguinte maneira:

1. Usamos a projeção planar do Nó Primo 7_7 , e damos a ela uma orientação específica;
2. Escolhemos qualquer um dos nós, e o definimos como sendo um dos estados do Conjunto Estado, de acordo com o sinal do nó escolhido. No caso em consideração,

o Nó Primo 7_7 , escolhemos um sinal (-), e o definimos com sendo o estado K_- do Conjunto Estado;

3. Através do estado K_- , conseguimos encontrar os estados K_+ , K_0 e K_∞ aplicando as seguintes regras:

- (a) A *Passagem de Segmento* que, em nosso caso, converte o sinal (-) em um sinal (+) formando assim, o estado K_+ ;
- (b) A *Troca de Segmento* que deleta o nó (-), formando o estado K_0 ;
- (c) O *quarto estado* (K_∞) que, em nosso caso, é gerado de um Nó, com um nó (-) em K_- , então o nó (∞) é definido da seguinte forma: A parte superior do segmento do nó (∞) é orientada da direita para a esquerda, enquanto que a parte inferior do segmento é orientada da esquerda para direita. A Figura 4.2 ilustra o Conjunto Estado do Nó Primo 7_7 .

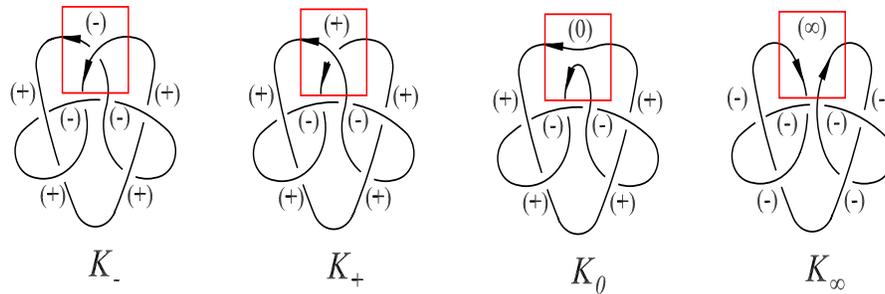


Figura 4.2: Conjunto Estado do Nó Primo 7_7 .

2º Passo) Analisamos cada estado do Conjunto Estado do Nó Primo 7_7 , e concluímos que:

- 1. O estado K_- é o Nó Primo 7_7 , cujo polinômio queremos encontrar;
- 2. O estado K_+ é a mesma projeção do Nó Primo 7_7 , diferenciando apenas no nó (-) escolhido;
- 3. O estado K_0 é uma Catenane;
- 4. O estado K_∞ é um Nó.

3º Passo) Nas análises acima, ainda não foi possível relacionar os estados K_+ e K_0 com Nós e Catenanes que possuem polinômios conhecidos, portanto será necessário encontrarmos o Conjunto Estado para cada um desses estados. Para isso, procedemos da seguinte forma:

1. Calculando o polinômio de Jones do estado K_+ :

(a) Seguimos exatamente o procedimento utilizado no **1º Passo**, e obtemos o Conjunto Estado para o estado K_+ . A Figura 4.3 ilustra esse Conjunto Estado;

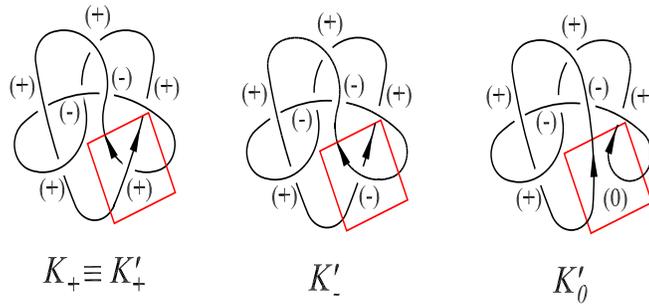


Figura 4.3: Conjunto Estado do estado K_+ .

(b) Analisamos o Conjunto Estado, e concluímos que:

- i. O estado K'_+ é um Nó;
- ii. O estado K'_- é um Nó trivial, que por definição é:
 $VK'_-(t) = 1$;
- iii. O estado K'_0 é a Catenane R_p , logo seu polinômio de Jones é:
 $VK'_0(t) = -t^{5/2} - t^{1/2}$.

(c) Calculamos o polinômio de Jones do estado K'_+ da seguinte maneira:

$$\begin{aligned}
 VK'_+(t) &= t^2VK'_-(t) + (t^{3/2} - t^{1/2})VK'_0(t) \\
 VK'_+(t) &= t^2(1) + (t^{3/2} - t^{1/2})(-t^{5/2} - t^{1/2}) \\
 VK'_+(t) &= -t^4 + t^3 + t.
 \end{aligned}$$

Observe que o estado K'_+ é topologicamente igual ao trifólio T_+ .

2. Calculando o polinômio de Jones do estado K_0 :

- (a) Seguimos exatamente o procedimento utilizado no 1º Passo, e obtemos o Conjunto Estado para o estado K_0 . A Figura 4.4 ilustra esse Conjunto Estado;

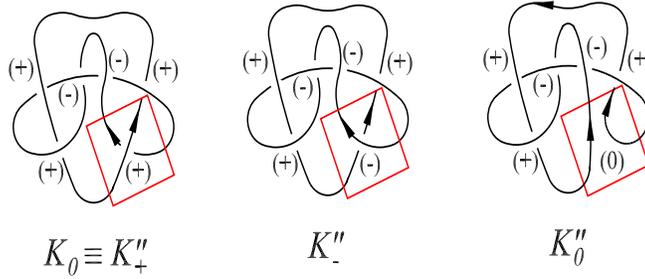


Figura 4.4: Conjunto Estado do estado K_0 .

- (b) Analisamos o Conjunto Estado, e concluímos que:

- i. O estado K_+'' é uma Catenane;
- ii. O estado K_-'' é a catenane R_p , logo seu polinômio é:
 $VK_-''(t) = -t^{5/2} - t^{1/2}$;
- iii. O estado K_0'' é o Nó F, portanto seu polinômio é:
 $VK_0''(t) = t^{-2} - t^{-1} + 1 - t + t^2$.

- (c) Calculamos o polinômio de Jones do estado K_+'' , da seguinte maneira:

$$\begin{aligned}
 VK_+''(t) &= t^2VK_-''(t) + (t^{3/2} - t^{1/2})VK_0''(t) \\
 VK_+''(t) &= t^2(-t^{5/2} - t^{1/2}) + (t^{3/2} - t^{1/2})(t^{-2} - t^{-1} + 1 - t + t^2) \\
 VK_+''(t) &= -t^{-3/2} + 2t^{-1/2} - 2t^{1/2} + 2t^{3/2} - 3t^{5/2} + t^{7/2} - t^{9/2}.
 \end{aligned}$$

Observe que o estado K_+'' é topologicamente igual a Catenane 6_3^2 .

- (d) Temos os polinômios de Jones correspondentes aos estados K_+ e K_0 , onde:

- $VK_+(t) = VK_+'(t) = -t^4 + t^3 + t$.
- $VK_0(t) = VK_+''(t) = -t^{-3/2} + 2t^{-1/2} - 2t^{1/2} + 2t^{3/2} - 3t^{5/2} + t^{7/2} - t^{9/2}$.

4º Passo) Substituindo os estados K_+ e K_0 na equação (3.2) do Capítulo 3, calculamos o polinômio de Jones para o estado K_- :

$$\begin{aligned}
 VK_-(t) &= t^{-2}VK_+(t) + (t^{-3/2} - t^{-1/2})VK_0(t) & (3.2) \\
 VK_-(t) &= t^{-2}(-t^4 + t^3 + t) + (t^{-3/2} - t^{-1/2}) \\
 &\quad (-t^{-3/2} + 2t^{-1/2} - 2t^{1/2} + 2t^{3/2} - 3t^{5/2} + t^{7/2} - t^{9/2}) \\
 VK_-(t) &= -t^{-3} + 3t^{-2} - 3t^{-1} + 4 - 4t + 3t^2 - 2t^3 + t^4.
 \end{aligned}$$

Então, o polinômio de Jones para o Nó Primo 7_7 é:

$$VK_{7_7}(t) = -t^{-3} + 3t^{-2} - 3t^{-1} + 4 - 4t + 3t^2 - 2t^3 + t^4.$$

4.3 Catenane Dimérica 5_1^2

Nesta seção, mostramos o procedimento usado para se calcular o polinômio de Jones da Catenane Dimérica 5_1^2 . Esse procedimento é o mesmo usado na Seção 4.2, para se calcular o polinômio do Nó Primo 7_7 .

1º Passo) Para encontrarmos o Conjunto Estado da Catenane Dimérica 5_1^2 , procedemos da seguinte maneira:

1. Usamos a projeção planar da Catenane Dimérica 5_1^2 , com a mesma orientação da Tabela 3.1 do Capítulo 3, pois uma mudança na orientação em um dos anéis componentes da Catenane, acarreta em uma alteração nos sinais dos nós;
2. Escolhemos qualquer um dos nós, e o definimos como sendo um dos estados do Conjunto Estado, de acordo com o sinal do nó escolhido. Em nosso exemplo, a Catenane Dimérica 5_1^2 , escolhemos um sinal (-), e o definimos com sendo o estado K_- do nosso Conjunto Estado;
3. Através do estado K_- , conseguimos encontrar os estados K_+ , K_0 e K_∞ aplicando as seguintes regras:
 - (a) A *Passagem de Segmento* que, em nosso caso, converte o sinal (-) em um sinal (+) formando assim, o estado K_+ ;
 - (b) A *Troca de Segmento* que deleta o nó (-), formando o estado K_0 ;
 - (c) O estado K_∞ , em nosso caso, é gerado de uma Catenane, com um nó (-) em K_- , então o nó (∞) é definido da seguinte forma: A parte superior e a parte

inferior do segmento do nó (∞) são orientadas da esquerda para a direita. A Figura 4.5 ilustra o Conjunto Estado da Catenane Dimérica 5_1^2 .

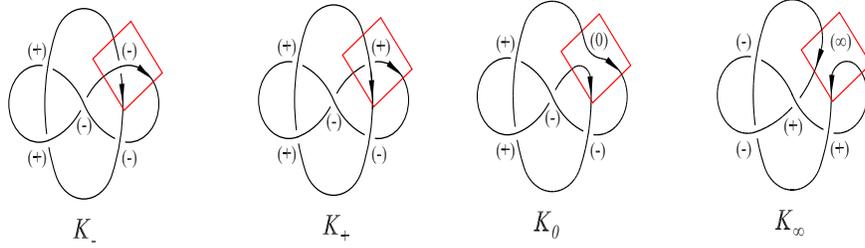


Figura 4.5: Conjunto Estado da Catenane Dimérica 5_1^2 .

2º Passo) Analisamos cada estado do Conjunto Estado da Catenane Dimérica 5_1^2 , e concluímos que:

1. O estado K_- é a Catenane Dimérica 5_1^2 , cujo polinômio queremos calcular;
2. O estado K_+ é a Catenane R_p , portanto seu polinômio de Jones é:
 $VK_+(t) = -t^{5/2} - t^{1/2}$;
3. O estado K_0 é o Nó F, logo seu polinômio de Jones é:
 $VK_0(t) = t^{-2} - t^{-1} + 1 - t + t^2$;
4. O estado K_∞ é o Nó trifólico $T(-)$, então seu polinômio é:
 $VK_\infty(t) = -t^{-4} + t^{-3} + t^{-1}$.

3º Passo) Substituindo os estados K_+ e K_0 na equação (3.2) do Capítulo 3, calculamos o polinômio de Jones para o estado K_- :

$$\begin{aligned}
 VK_-(t) &= t^{-2}VK_+(t) + (t^{-3/2} - t^{-1/2})VK_0(t) & (3.2) \\
 VK_-(t) &= t^{-2}(-t^{5/2} - t^{1/2}) + (t^{-3/2} - t^{-1/2}) \\
 &\quad (t^{-2} - t^{-1} + 1 - t + t^2) \\
 VK_-(t) &= t^{-7/2} - 2t^{-5/2} + t^{-3/2} - 2t^{-1/2} + t^{1/2} - t^{3/2}.
 \end{aligned}$$

Então, o polinômio de Jones para a Catenane Dimérica 5_1^2 é:

$$VK_{5_1^2}(t) = t^{-7/2} - 2t^{-5/2} + t^{-3/2} - 2t^{-1/2} + t^{1/2} - t^{3/2}.$$

4.4 Catenane Dimérica 7_7^2

Nesta seção, mostramos como calcular o polinômio da Catenane Dimérica 7_7^2 .

1º Passo) Para encontrarmos o Conjunto Estado da Catenane Dimérica 7_7^2 , procedemos da seguinte maneira:

1. Usamos a projeção planar da Catenane Dimérica 7_7^2 , com a mesma orientação da Tabela 3.1 do Capítulo 3, pois uma mudança na orientação em um dos anéis componentes da Catenane, causa alteração nos sinais dos nós;
2. Escolhemos qualquer um dos nós, e o definimos como sendo um dos estados do Conjunto Estado, de acordo com o sinal do nó escolhido. Em nosso exemplo, a Catenane dimérica 7_7^2 , escolhemos um sinal (+), e o definimos com sendo o estado K_+ do nosso Conjunto Estado;
3. Através do estado K_+ , conseguimos encontrar os estados K_- , K_0 e K_∞ aplicando as seguintes regras:
 - (a) A *Passagem de Segmento* que, em nosso caso, converte o sinal (+) em um sinal (-) formando assim, o estado K_- ;
 - (b) A *Troca de Segmento* que deleta o nó (+), formando o estado K_0 ;
 - (c) O estado K_∞ , em nosso caso, é gerado de uma Catenane, com um nó (+) em K_+ , então o nó (∞) é definido da seguinte forma: A parte superior e a parte inferior do segmento do nó (∞) são orientadas da esquerda para a direita. A figura 4.6 ilustra o Conjunto Estado da Catenane Dimérica 7_7^2 .

2º Passo) Analisamos cada estado do Conjunto Estado da Catenane Dimérica 7_7^2 , e concluímos:

1. O estado K_+ é a Catenane Dimérica 7_7^2 , cujo polinômio queremos calcular;
2. O estado K_- é a mesma projeção da Catenane Dimérica 7_7^2 , diferenciando apenas no nó (+) escolhido;
3. O estado K_0 é um Nó;

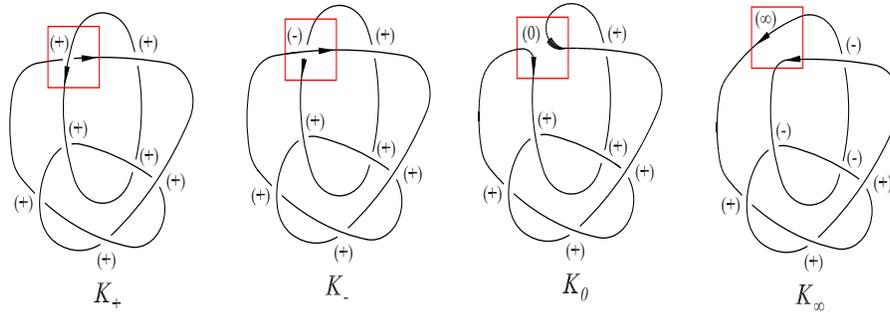


Figura 4.6: Conjunto Estado da Catenane Dimérica 7^2_7 .

4. O estado K_∞ é um Nó.

3º Passo) Nas análises acima, ainda não foi possível relacionar os estados K_- e K_0 com Catenanes e Nós que possuem polinômios conhecidos, portanto será necessário encontrarmos o Conjunto Estado para cada um desses estados. Para isso, procedemos desta forma:

1. Calculando o polinômio de Jones do estado K_- :

(a) Seguimos exatamente o procedimento utilizado no **1º Passo**, e obtemos o Conjunto Estado para o estado K_- . A Figura 4.7 ilustra esse Conjunto Estado;

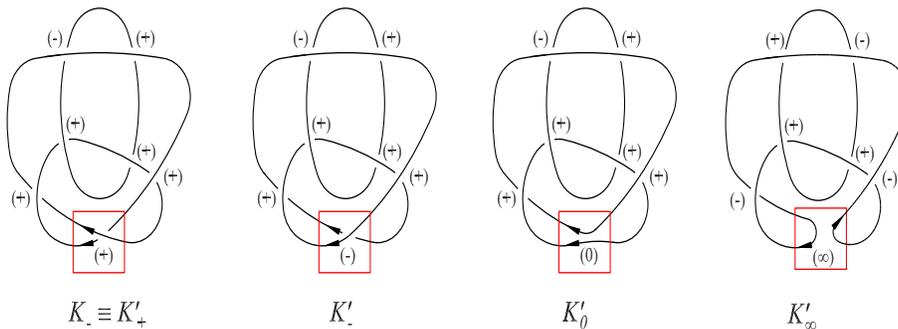


Figura 4.7: Conjunto Estado do estado K_- .

(b) Analisamos o Conjunto Estado, e concluímos que:

- i. O estado $K'_+ = K_-$;
- ii. O estado K'_- é a Catenane R_p , logo seu polinômio é:

$$VK_-(t) = -t^{5/2} - t^{1/2};$$

iii. O estado K'_0 é uma Catenane e $Lk(K_0)=(+1)$, porque o lado que ocorreu a deleção do nó (+) escolhido, compreende a ligação de dois anéis da Catenane;

iv. O estado K'_∞ é a Catenane R_p , logo seu polinômio de Jones é:

$$VK'_\infty(t) = -t^{5/2} - t^{1/2}.$$

(c) Agora podemos calcular o polinômio de Jones do estado K'_+ , da seguinte maneira:

$$\begin{aligned} VK'_+(t) &= tVK'_-(t) + (1-t)t^{3Lk(K_0)}VK'_\infty(t) \\ VK'_+(t) &= t(-t^{5/2} - t^{1/2}) + (1-t)t^{3(1)}(-t^{5/2} - t^{1/2}) \\ VK'_+(t) &= t^{13/2} - t^{11/2} + t^{9/2} - 2t^{7/2} - t^{3/2}. \end{aligned}$$

2. Calculando o polinômio de Jones do estado K_0 :

(a) Seguimos exatamente o procedimento utilizado no **1º Passo**, e obtemos o Conjunto Estado para o estado K_0 . A Figura 4.8 ilustra esse Conjunto Estado.

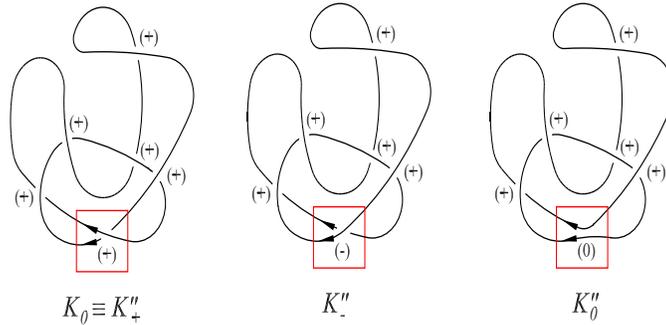


Figura 4.8: Conjunto Estado do estado K_0 .

(b) Analisamos o Conjunto Estado, e concluímos que:

i. O estado $K_+''=K_0$;

ii. O estado K_+'' é um Nó;

iii. O estado K_-'' é o trifólico $T(+)$, logo seu polinômio é:

$$VK_-''(t) = -t^4 + t^3 + t;$$

iv. O estado K_0'' é a Catenane RD_p , portanto seu polinômio é:

$$VK_0''(t) = -t^{11/2} + t^{9/2} - t^{7/2} - t^{3/2}.$$

(c) Agora podemos calcular o polinômio de Jones do estado K_+'' , da seguinte maneira:

$$\begin{aligned} VK_+''(t) &= t^2VK_-''(t) + (t^{3/2} - t^{1/2})VK_0''(t) \\ VK_+''(t) &= t^2(-t^4 + t^3 + t) + (t^{3/2} - t^{1/2}) \\ &\quad (-t^{11/2} + t^{9/2} - t^{7/2} - t^{3/2}) \\ VK_+''(t) &= -t^7 + t^6 - t^5 + t^4 + t^2. \end{aligned}$$

Observe que o estado K_+'' é topologicamente igual a imagem refletida do Nó Primo 5_1 .

(d) Temos os polinômios de Jones correspondentes aos estados K_- e K_0 , onde:

- $VK_-(t) = VK_+'(t) = t^{13/2} - t^{11/2} + t^{9/2} - 2t^{7/2} - t^{3/2}$.
- $VK_0(t) = VK_+''(t) = -t^7 + t^6 - t^5 + t^4 + t^2$.

4º Passo) Substituindo os estados K_- e K_0 , na equação (3.2) do Capítulo 3, calculamos o polinômio de Jones para o estado K_+ :

$$\begin{aligned} VK_+(t) &= t^2VK_-(t) + (t^{3/2} - t^{1/2})VK_0(t) \quad (3.2) \\ VK_+(t) &= t^2(t^{13/2} - t^{11/2} + t^{9/2} - 2t^{7/2} - t^{3/2}) + \\ &\quad + (t^{3/2} - t^{1/2})(-t^7 + t^6 - t^5 + t^4 + t^2) \\ VK_+(t) &= t^{15/2} - t^{13/2} - t^{9/2} - t^{5/2}. \end{aligned}$$

Então, o polinômio de Jones para a Catenane Dimérica 7_7^2 é:

$$VK_{7_7^2} = t^{15/2} - t^{13/2} - t^{9/2} - t^{5/2}.$$

4.5 Conclusões

Neste capítulo, procuramos apresentar com detalhes, o procedimento de aplicação polinomial, que classifica Nós e Catenanes através de um único polinômio de Jones. Essa classificação é feita relacionando os estados do Conjunto Estado de um Nó ou Catenane com formas de Nós ou Catenanes que possuem polinômios que já são conhecidos. Nosso objetivo, é de esclarecer o método da aplicação polinomial que é fundamental para compreensão do presente trabalho.

Capítulo 5

Aplicação do Polinômio de Jones na Recombinação do Nó Primo 5_1

5.1 Introdução

Neste capítulo, apresentamos propostas para construções de modelos matemáticos, que possam prever todos os produtos gerados através de todas as possibilidades de recombinação do Nó Primo 5_1 , baseando-se nas experiências laboratoriais realizadas com as enzimas *resolvase Tn3* e *integrase*, mostradas nas Seções 3.4.2 e 3.4.3 do Capítulo 3. Este procedimento faz uso do método polinomial, onde cada forma topológica está associada a um único polinômio de Jones. Este polinômio além de permitir uma determinação rigorosa das moléculas de DNA que formam Nós e Catenanes, indica a estrutura das moléculas relacionadas. Os polinômios dos produtos das rodadas de recombinação do Nó Primo 5_1 , foram obtidos através do uso das Tabelas 3.1 e 3.2 e das definições do Capítulo 3. O processo de recombinação em consideração, aborda dois casos: a geração de uma série de nós (+) ou (-) ao longo de um segmento contínuo do DNA que possui sítios com repetições diretas e a geração de uma série de nós (+) ou (-) ao longo de um segmento contínuo do DNA que possui sítios com repetições inversas. Embora o segundo caso não tenha sido considerado em artigos que versam sobre o problema em consideração, não podemos descartar a hipótese de que outras enzimas possam executar esse tipo de recombinação, devido a complexidade das reações enzimáticas.

Mostramos através de exemplos, que é possível determinar a melhor forma topológica para facilitar a compreensão em cada tipo de recombinação, porém fica a cargo do leitor perceber que não existem regras específicas que conduzam à equivalência entre a topologia resultante da recombinação e a topologia final, nesse caso o único instrumento a ser usado

é a intuição.

Primeiramente, na Seção 5.2 mostramos como é feita a recombinação do Nó Primo 5_1 com sítios repetidos diretamente. Nas Subseções 5.2.1 e 5.2.2, definimos respectivamente, as duas possibilidades desse tipo de recombinação, isto é, a geração de um nó (+) ou um nó (-) em cada rodada de recombinação. A Seção 5.3, apresenta as possibilidades de recombinação do Nó Primo 5_1 com sítios repetidos inversamente, que estão divididas em duas partes: a Subseção 5.3.1 mostra a recombinação gerando um nó (+) em cada rodada e a Subseção 5.3.2 apresenta a geração de um nó (-) para cada rodada de recombinação. A seguir, na Seção 5.4, apresentamos a construção de um modelo matemático para a recombinação com sítios repetidos diretamente e repetidos inversamente ocorrendo em Nós Primos. Finalmente, na Seção 5.5 apresentamos as conclusões deste capítulo.

5.2 Recombinação do Nó Primo 5_1 com Sítios Repetidos Diretamente (RD)

Apresentamos nesta seção, o mecanismo de recombinação do Nó Primo 5_1 que ocorre em sítios repetidos diretamente. Esse evento de recombinação ocorre quando as recombinases, enzimas que catalisam o processo, reconhecem seqüências curtas específicas em ambos os sítios de recombinação e executam a troca recíproca entre esses sítios, podendo gerar nós (+) ou nós (-), como poderemos observar nos modelos de recombinação que serão apresentados nas Subseções 5.2.1 e 5.2.2, respectivamente.

Os dois modelos foram baseados, na experiência da recombinação realizada em plasmídeo, molécula de DNA circular, mediado por *resolvase Tn3 in vitro*, descrita na Subseção 3.4.2 do Capítulo 3. Nesse tipo de recombinação, a enzima age quase sempre em repetições diretas gerando um nó (+) para cada rodada, [1], [2] e [3].

Os dois modelos apresentados mostram as duas possibilidades de recombinação do Nó Primo 5_1 com repetições diretas, gerando um nó (+) ou um nó (-) em cada rodada de recombinação. Nos dois casos o número de componentes é alterado em cada rodada da recombinação, e os resultados obtidos comprovam os resultados demonstrados em [1].

5.2.1 Recombinação gerando um nó (+) em cada rodada da recombinação

Nesta subseção, mostramos como determinar os polinômios de Jones dos produtos resultantes das quatro primeiras rodadas de recombinação do Nó Primo 5_1 . Essa re-

combinação ocorre em sítios RD, gerando um nó (+) em cada rodada. Posteriormente, comentamos sobre esses resultados polinomiais.

Primeiramente, considere como substrato o Nó Primo 5_1 , que definimos como S ; e para os produtos resultantes dessa recombinação definimos, K_1 , K_2 , K_3 e K_4 como sendo, respectivamente, a primeira, a segunda, a terceira e a quarta rodada da recombinação. A Figura 5.1, ilustra essas quatro primeiras rodadas de recombinação do substrato S .

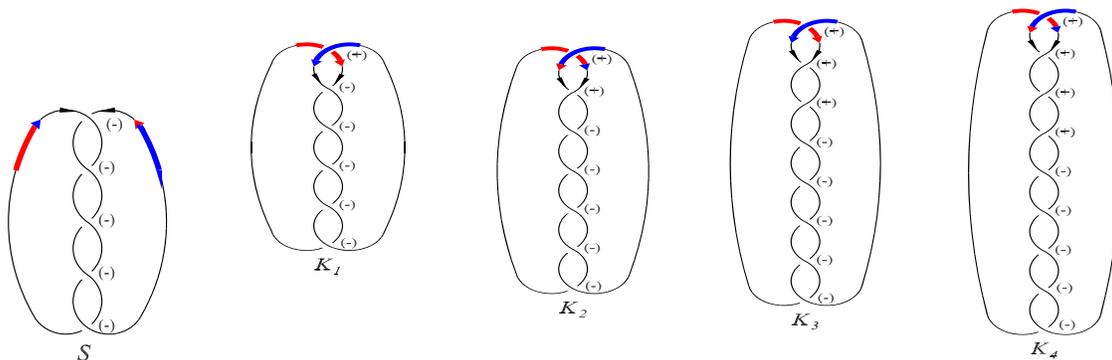


Figura 5.1: As quatro primeiras rodadas de recombinação do Nó Primo 5_1 .

Mostramos a seguir, o procedimento usado para calcular os polinômios de Jones correspondentes aos produtos resultantes de cada uma das quatro rodadas de recombinação do Nó Primo 5_1 :

1º) Determinamos os conjuntos estados para K_1 , K_2 , K_3 e K_4 , da seguinte forma:

(a) Em cada rodada de recombinação um nó (+) foi gerado, definimos cada uma dessas rodadas como sendo o estado K_+ , e aplicamos em K_+ as seguintes regras:

- *Passagem de Segmento*, que nesse caso, converte o nó (+) gerado em K_+ em um nó (-), formando assim o estado K_- ;
- *Troca de Segmento*, que nesse caso, converte o nó (+) do estado K_+ em um nó (0), formando o estado K_0 ;
- *O Quarto Estado* que, para esse caso, converte o nó (+) do estado K_+ em um nó (∞), formando o estado K_∞ .

(b) As Figuras 5.2, 5.3, 5.4 e 5.5 ilustram, respectivamente, os conjuntos estados de K_1 , K_2 , K_3 e K_4 . Observe que, iniciando com um Nó como substrato e para qualquer m inteiro positivo, temos que:

1. Para as rodadas K_2, K_4, \dots, K_{2m} , os produtos dessas rodadas serão sempre Nós;
2. Para as rodadas $K_1, K_3, \dots, K_{2m-1}$, os produtos dessas rodadas serão sempre Catenanes.

2º) Analisamos os conjuntos estados acima, para cada rodada de recombinação e associamos as formas topológicas encontradas nos estados K_-, K_0 e K_∞ com as formas topologicamente equivalentes das Tabelas 3.1 e 3.2, Seção 3.5 do Capítulo 3, as quais já possuem polinômios conhecidos. Posteriormente, substituímos os polinômios encontrados em K_-, K_0 e K_∞ de cada conjunto estado na equação (3.2), Seção 3.2 do Capítulo 3, para calcular os respectivos polinômios de Jones dos produtos resultantes das quatro primeiras rodadas de recombinação. Em seguida, associamos cada polinômio com a sua respectiva forma topológica através das Tabelas 3.1 e 3.2.

1. Para o conjunto estado de K_1 (Figura 5.2), temos:

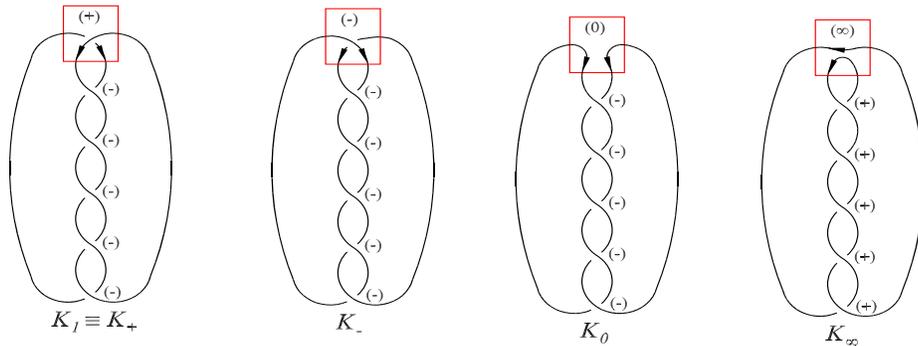


Figura 5.2: Conjunto Estado da primeira rodada de recombinação, K_1 .

1.1. Relacionando as formas topológicas:

- $K_+ \equiv K_1$, portanto:
 $VK_+(t) = VK_1(t)$;
- $K_- \equiv$ A Catenane 6_1^2 , então:
 $VK_-(t) = -t^{-17/2} + t^{-15/2} - t^{-13/2} + t^{-11/2} - t^{-9/2} - t^{-5/2}$;

- $K_0 \equiv S$, logo:
 $VK_0(t) = -t^{-7} + t^{-6} - t^{-5} + t^{-4} + t^{-2}$;
- $K_\infty \equiv$ Nó trivial, que por definição:
 $VK_\infty(t) = 1$.

1.2. Calculando o polinômio de Jones correspondente:

$$\begin{aligned}
 VK_1(t) &= VK_+(t) = t^2VK_-(t) + (t^{3/2} - t^{1/2})VK_0(t) \\
 VK_1(t) &= VK_+(t) = t^2(-t^{-17/2} + t^{-15/2} - t^{-13/2} + t^{-11/2} - t^{-9/2} - t^{-5/2}) \\
 &\quad + (t^{3/2} - t^{1/2})(-t^{-7} + t^{-6} - t^{-5} + t^{-4} + t^{-2}) \\
 VK_1(t) &= -t^{-11/2} + t^{-9/2} - t^{-7/2} - t^{-3/2}.
 \end{aligned}$$

1.3. Associando o polinômio calculado com a sua respectiva forma topológica:

- O polinômio de Jones do estado K_1 , é o polinômio de Jones da Catenane 4_1^2 . Portanto o estado K_1 é a Catenane 4_1^2 .

2. Para o conjunto estado de K_2 (Figura 5.3), temos:

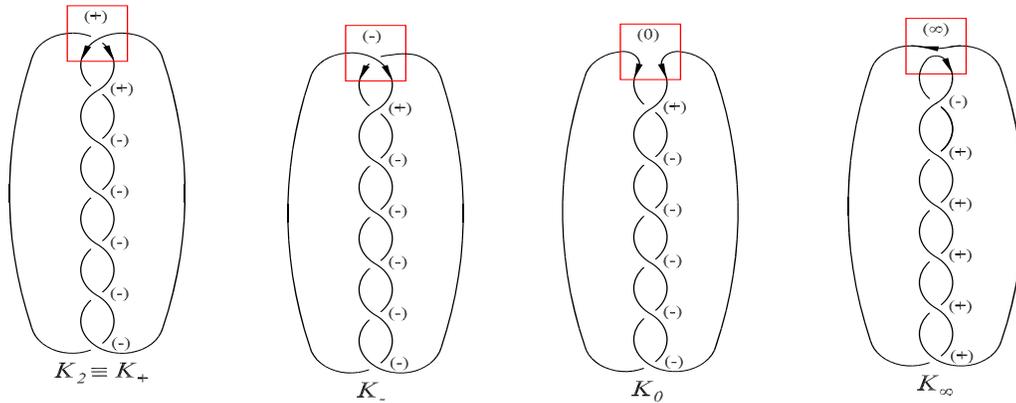


Figura 5.3: Conjunto Estado da segunda rodada de recombinação, K_2 .

2.1. Relacionando as formas topológicas:

- $K_+ \equiv K_2$, logo:
 $VK_+(t) = VK_2(t)$;

- $K_- \equiv S$, portanto:
 $VK_-(t) = -t^{-7} + t^{-6} - t^{-5} + t^{-4} + t^{-2}$;
- $K_0 \equiv K_1$, então:
 $VK_0(t) = -t^{-11/2} + t^{-9/2} - t^{-7/2} - t^{-3/2}$;
- $K_\infty \equiv$ Nó trivial, que por definição:
 $VK_\infty(t) = 1$.

2.2. Calculando o polinômio de Jones correspondente:

$$\begin{aligned} VK_2(t) &= VK_+(t) = t^2VK_-(t) + (t^{3/2} - t^{1/2})VK_0(t) \\ VK_2(t) &= VK_+(t) = t^2(-t^{-7} + t^{-6} - t^{-5} + t^{-4} + t^{-2}) \\ &\quad + (t^{3/2} - t^{1/2})(-t^{-11/2} + t^{-9/2} - t^{-7/2} - t^{-3/2}) \\ VK_2(t) &= -t^{-4} + t^{-3} + t^{-1}. \end{aligned}$$

2.3. Associando o polinômio calculado com a sua respectiva forma topológica:

- O polinômio de Jones do estado K_2 , é o polinômio de Jones do Nó Trifólico negativo T_- . Portanto o estado K_2 é o trifólico (-).

3. Para o conjunto estado de K_3 (Figura 5.4), temos:

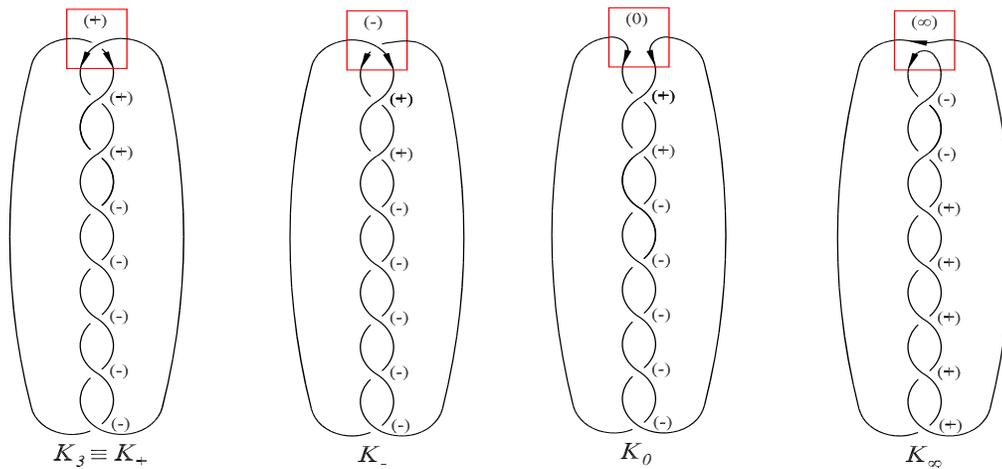


Figura 5.4: Conjunto Estado da terceira rodada de recombinação, K_3 .

3.1. Relacionando as formas topológicas:

- $K_+ \equiv K_3$, logo:
 $VK_+(t) = VK_3(t)$;
- $K_- \equiv K_1$, então:
 $VK_-(t) = -t^{-11/2} + t^{-9/2} - t^{-7/2} - t^{-3/2}$;
- $K_0 \equiv$ Nó trifólico negativo (T_-), portanto:
 $VK_0(t) = -t^{-4} + t^{-3} + t^{-1}$;
- $K_\infty \equiv$ Nó trivial, que por definição:
 $VK_\infty(t) = 1$.

3.2. Calculando o polinômio de Jones correspondente:

$$\begin{aligned} VK_3(t) &= VK_+(t) = t^2VK_-(t) + (t^{3/2} - t^{1/2})VK_0(t) \\ VK_3(t) &= VK_+(t) = t^2(-t^{-11/2} + t^{-9/2} - t^{-7/2} - t^{-3/2}) + (t^{3/2} - t^{1/2}) \\ &\quad (-t^{-4} + t^{-3} + t^{-1}) \\ VK_3(t) &= -t^{-5/2} - t^{-1/2}. \end{aligned}$$

3.3. Associando o polinômio calculado com a sua respectiva forma topológica:

- O polinômio de Jones do estado K_3 , é o polinômio de Jones da Catenane 2_1^2 . Portanto o estado K_3 é a Catenane 2_1^2 .

4. Para o conjunto estado de K_4 (Figura 5.5), temos:

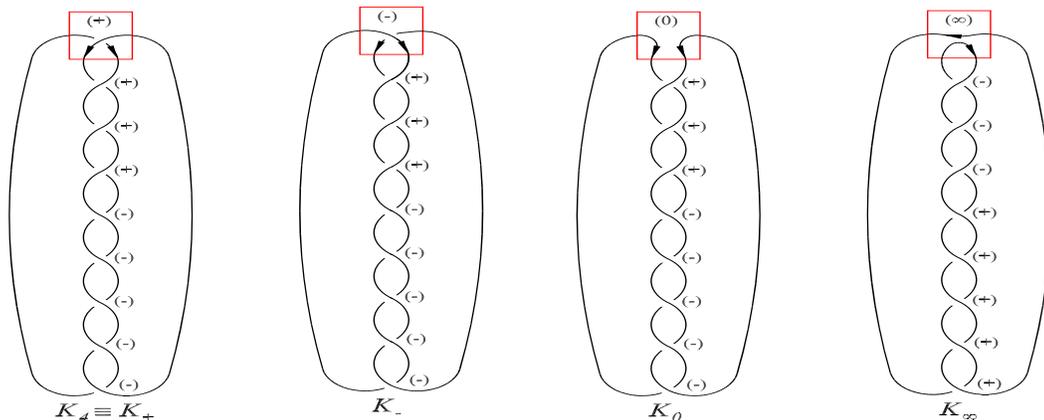


Figura 5.5: Conjunto Estado da quarta rodada de recombinação, K_4 .

4.1. Relacionando as formas topológicas:

- $K_+ \equiv K_4$, então:
 $VK_+(t) = VK_4(t)$;
- $K_- \equiv$ Nó trifólico negativo (T_-), portanto:
 $VK_0(t) = -t^{-4} + t^{-3} + t^{-1}$;
- $K_0 \equiv K_3$, logo:
 $VK_0(t) = -t^{-5/2} - t^{-1/2}$;
- $K_\infty \equiv$ Nó trivial, que por definição:
 $VK_\infty(t) = 1$.

4.2. Calculando o polinômio de Jones correspondente:

$$\begin{aligned} VK_4(t) &= VK_+(t) = t^2VK_-(t) + (t^{3/2} - t^{1/2})VK_0(t) \\ VK_4(t) &= VK_+(t) = t^2(-t^{-4} + t^{-3} + t^{-1}) + (t^{3/2} - t^{1/2}) \\ &\quad (-t^{-5/2} - t^{-1/2}) \\ VK_4(t) &= 1. \end{aligned}$$

4.3. Associando o polinômio calculado com a sua respectiva forma topológica:

- O polinômio de Jones do estado K_4 , é o polinômio de Jones do Nó Trivial. Portanto o estado K_4 é o Nó trivial.

3º) Analisando os resultados anteriores, concluímos que:

1. $VK_+(t) = VK_n(t)$;
2. $VK_-(t) = VK_{n-2}$;
3. $VK_0(t) = VK_{n-1}$;
4. $VK_\infty(t) = 1$.

Então, via teoria polinomial, podemos determinar todos os produtos da recombinação com sítios repetidos diretamente que geram um nó (+) em cada rodada de recombinação, se conhecermos dois produtos quaisquer sucessivos. O polinômio de Jones pode ser computado através da seguinte equação geral:

$$VK_n(t) = VK_+(t) = t^2VK_{n-2} + (t^{3/2} - t^{1/2})VK_{n-1}. \quad (5.1)$$

5.2.2 Recombinação gerando um nó (-) em cada rodada da recombinação

Nesta subseção, mostramos como determinar os polinômios de Jones dos produtos resultantes das quatro primeiras rodadas de recombinação do Nó Primo 5_1 . Essa recombinação ocorre em sítios RD, gerando um nó (-) em cada rodada. Posteriormente, comentamos sobre esses resultados polinomiais. A Figura 5.6, ilustra as quatro primeiras rodadas de recombinação do substrato S , já definidos na Subseção 5.2.1, diferindo apenas na geração de um nó (-).

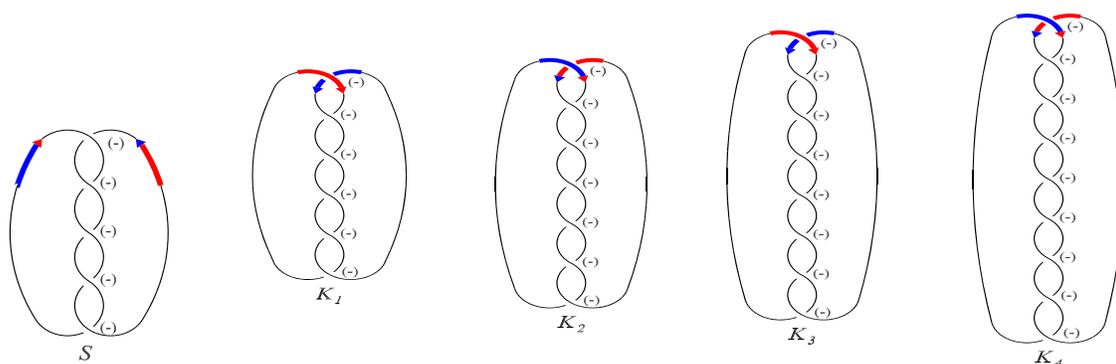


Figura 5.6: As quatro primeiras rodadas de recombinação do Nó Primo 5_1 .

Mostramos a seguir, exatamente o mesmo procedimento usado na Subseção 5.2.1, para calcular os polinômios de Jones correspondentes aos produtos resultantes de cada uma das quatro rodadas de recombinação do Nó Primo 5_1 :

1º) Determinamos os conjuntos estados para K_1 , K_2 , K_3 e K_4 , da seguinte forma:

(a) Em cada rodada de recombinação um nó (-) foi gerado, definimos cada uma dessas rodadas como sendo o estado K_- , e aplicamos em K_- as seguintes regras:

- *Passagem de Segmento*, que converte o nó (-) gerado em K_- em um nó (+), formando assim o estado K_+ ;
- *Troca de Segmento*, que converte o nó (-) de K_- em um nó (0), formando o estado K_0 ;
- *O Quarto Estado*, que converte o nó (-) de K_- em um nó (∞), formando o estado K_∞ .

(b) As Figuras 5.7, 5.8, 5.9 e 5.10 ilustram, respectivamente, os conjuntos estados de K_1 , K_2 , K_3 e K_4 .

2º) Analisamos os conjuntos estados acima, para cada rodada de recombinação e associamos as formas topológicas encontradas nos estados K_+ , K_0 e K_∞ com as formas topologicamente equivalentes das Tabelas 3.1 e 3.2, Seção 3.5 do Capítulo 3, as quais já possuem polinômios conhecidos. Posteriormente, substituímos os polinômios encontrados em K_+ , K_0 e K_∞ de cada conjunto estado na equação (3.2), Seção 3.2 do Capítulo 3, para calcular os respectivos polinômios de Jones dos produtos resultantes das quatro primeiras rodadas de recombinação. Em seguida, associamos cada polinômio com sua respectiva forma topológica através das Tabelas 3.1 e 3.2.

1. Para o conjunto estado de K_1 (Figura 5.7), temos:

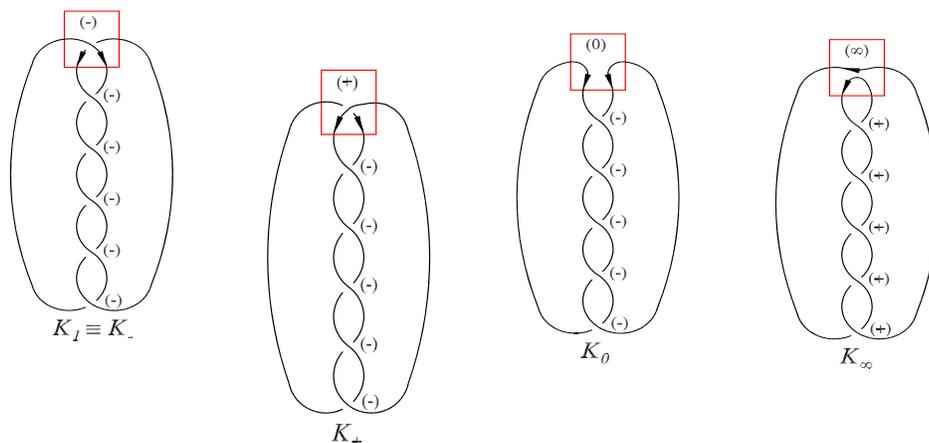


Figura 5.7: Conjunto Estado da primeira rodada de recombinação, K_1 .

1.1. Relacionando as formas topológicas:

- $K_- \equiv K_1$, logo:
 $VK_-(t) = VK_1(t)$;
- $K_+ \equiv$ A Catenane LD_p , então:
 $VK_+(t) = -t^{-11/2} + t^{-9/2} - t^{-7/2} - t^{-3/2}$;
- $K_0 \equiv S$, portanto:
 $VK_0(t) = -t^{-7} + t^{-6} - t^{-5} + t^{-4} + t^{-2}$;

- $K_\infty \equiv$ Nó trivial, que por definição:

$$VK_\infty(t) = 1.$$

1.2. Calculando o polinômio de Jones correspondente:

$$\begin{aligned} VK_1(t) &= VK_-(t) = t^{-2}VK_+(t) + (t^{-3/2} - t^{-1/2})VK_0(t) \\ VK_1(t) &= VK_-(t) = t^{-2}(-t^{-11/2} + t^{-9/2} - t^{-7/2} - t^{-3/2}) \\ &\quad + (t^{-3/2} - t^{-1/2})(-t^{-7} + t^{-6} - t^{-5} + t^{-4} + t^{-2}) \\ VK_1(t) &= -t^{-17/2} + t^{-15/2} - t^{-13/2} + t^{-11/2} - t^{-9/2} - t^{-5/2}. \end{aligned}$$

1.3. Associando o polinômio calculado com a sua respectiva forma topológica:

- O polinômio de Jones do estado K_1 , é o polinômio de Jones da Catenane 6_1^2 . Portanto o estado K_1 é a Catenane 6_1^2 .

2. Para o conjunto estado de K_2 (Figura 5.8), temos:

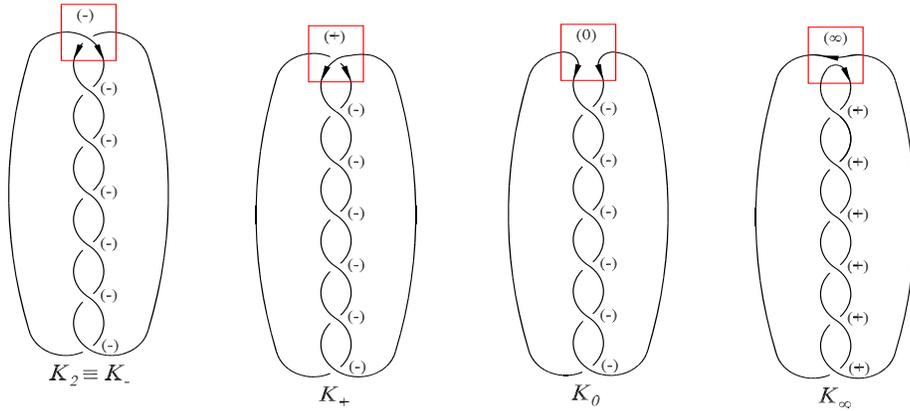


Figura 5.8: Conjunto Estado da segunda rodada de recombinação, K_2 .

2.1. Relacionando as formas topológicas:

- $K_- \equiv K_2$, logo:

$$VK_-(t) = VK_2(t);$$

- $K_+ \equiv S$, portanto:

$$VK_+(t) = -t^{-7} + t^{-6} - t^{-5} + t^{-4} + t^{-2};$$

- $K_0 \equiv K_1$, então:
 $VK_0(t) = -t^{-17/2} + t^{-15/2} - t^{-13/2} + t^{-11/2} - t^{-9/2} - t^{-5/2}$;
- $K_\infty \equiv$ Nó trivial, que por definição:
 $VK_\infty(t) = 1$.

2.2. Calculando o polinômio de Jones correspondente:

$$\begin{aligned}
 VK_2(t) &= VK_-(t) = t^{-2}VK_+(t) + (t^{-3/2} - t^{-1/2})VK_0(t) \\
 VK_2(t) &= VK_-(t) = t^{-2}(-t^{-7} + t^{-6} - t^{-5} + t^{-4} + t^{-2}) + (t^{-3/2} - t^{-1/2}) \\
 &\quad (-t^{-17/2} + t^{-15/2} - t^{-13/2} + t^{-11/2} - t^{-9/2} - t^{-5/2}) \\
 VK_2(t) &= -t^{-10} + t^{-9} - t^{-8} + t^{-7} - t^{-6} + t^{-5} + t^{-3}.
 \end{aligned}$$

2.3. Associando o polinômio calculado com a sua respectiva forma topológica:

- O polinômio de Jones do estado K_2 , é o polinômio de Jones do Nó 7₁. Portanto o estado K_2 é o Nó 7₁.

3. Para o conjunto estado de K_3 (Figura 5.9), temos:

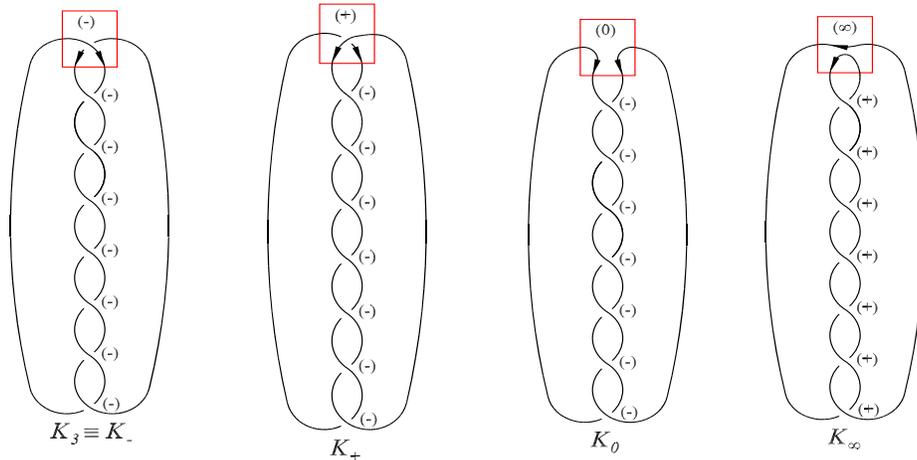


Figura 5.9: Conjunto Estado da terceira rodada de recombinação, K_3 .

3.1. Relacionando as formas topológicas:

- $K_- \equiv K_3$, logo:
 $VK_-(t) = VK_3(t)$;

- $K_+ \equiv K_1$, então:
 $VK_+(t) = -t^{-17/2} + t^{-15/2} - t^{-13/2} + t^{-11/2} - t^{-9/2} - t^{-5/2}$;
- $K_0 \equiv K_2$, portanto:
 $VK_0(t) = -t^{-10} + t^{-9} - t^{-8} + t^{-7} - t^{-6} + t^{-5} + t^{-3}$;
- $K_\infty \equiv$ Nó trivial, que por definição:
 $VK_\infty(t) = 1$.

3.2. Calculando o polinômio de Jones correspondente:

$$\begin{aligned} VK_3(t) &= VK_-(t) = t^{-2}VK_+(t) + (t^{-3/2} - t^{-1/2})VK_0(t) \\ VK_3(t) &= VK_-(t) = t^{-2}(-t^{-17/2} + t^{-15/2} - t^{-13/2} + t^{-11/2} - t^{-9/2} - t^{-5/2}) \\ &\quad + (t^{-3/2} - t^{-1/2})(-t^{-10} + t^{-9} - t^{-8} + t^{-7} - t^{-6} + t^{-5} + t^{-3}) \\ VK_3(t) &= -t^{-23/2} + t^{-21/2} - t^{-19/2} + t^{-17/2} - t^{-15/2} + t^{-13/2} - t^{-11/2} - t^{-7/2}. \end{aligned}$$

3.3. Associando o polinômio calculado com a sua respectiva forma topológica:

- O polinômio de Jones do estado K_3 , é o polinômio de Jones da Catenane 8_1^2 . Portanto o estado K_3 é a Catenane 8_1^2 .

4. Para o conjunto estado de K_4 (Figura 5.10), temos:

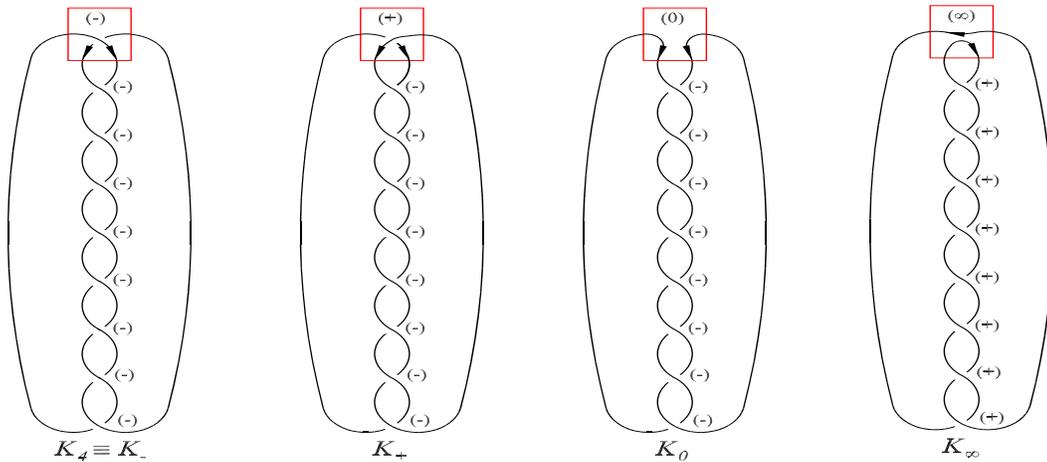


Figura 5.10: Conjunto Estado da quarta rodada de recombinação, K_4 .

4.1. Relacionando as formas topológicas:

- $K_- \equiv K_4$, então:

$$VK_-(t) = VK_4(t);$$

- $K_+ \equiv K_2$, portanto:

$$VK_+(t) = -t^{-10} + t^{-9} - t^{-8} + t^{-7} - t^{-6} + t^{-5} + t^{-3};$$

- $K_0 \equiv K_3$, logo:

$$VK_0(t) = -t^{-23/2} + t^{-21/2} - t^{-19/2} + t^{-17/2} - t^{-15/2} + t^{-13/2} - t^{-11/2} - t^{-7/2};$$

- $K_\infty \equiv$ Nó trivial, que por definição:

$$VK_\infty(t) = 1.$$

4.2. Calculando o polinômio de Jones correspondente:

$$\begin{aligned} VK_4(t) &= VK_-(t) = t^{-2}VK_+(t) + (t^{-3/2} - t^{-1/2})VK_0(t) \\ VK_4(t) &= VK_-(t) = t^{-2}(-t^{-10} + t^{-9} - t^{-8} + t^{-7} - t^{-6} + t^{-5} + t^{-3}) \\ &\quad + (t^{-3/2} - t^{-1/2})(-t^{-23/2} + t^{-21/2} - t^{-19/2} + t^{-17/2} - t^{-15/2} \\ &\quad + t^{-13/2} - t^{-11/2} - t^{-7/2}) \\ VK_4(t) &= -t^{-13} + t^{-12} - t^{-11} + t^{-10} - t^{-9} + t^{-8} - t^{-7} + t^{-6} + t^{-4}. \end{aligned}$$

4.3. Associando o polinômio calculado com a sua respectiva forma topológica:

- O polinômio de Jones do estado K_4 , é o polinômio de Jones do Nó 9_1 . Portanto o estado K_4 é o Nó 9_1 .

3º) Analisando os resultados anteriores, concluímos que:

1. $VK_-(t) = VK_n(t)$;
2. $VK_+(t) = VK_{n-2}$;
3. $VK_0(t) = VK_{n-1}$;
4. $VK_\infty(t) = 1$.

Então, via teoria polinomial, podemos determinar todos os produtos da recombinação com sítios repetidos diretamente que geram um nó (-) em cada rodada de recombinação,

se conhecermos dois produtos quaisquer sucessivos. O polinômio de Jones pode ser computado através da seguinte equação geral:

$$VK_n(t) = VK_-(t) = t^{-2}VK_{n-2} + (t^{-3/2} - t^{-1/2})VK_{n-1}. \quad (5.2)$$

5.3 Recombinação do Nó Primo 5_1 com Sítios Repetidos Inversamente (RI)

Apresentamos nesta seção, o mecanismo de recombinação do Nó Primo 5_1 que ocorre em sítios repetidos inversamente. A recombinação ocorre via troca recíproca entre ambos os sítios, que são reconhecidos pelas recombinases, podendo gerar nós (+) ou nós (-) ao longo de um segmento contínuo de DNA, como poderemos observar nas Subseções 5.3.1 e 5.3.2, respectivamente.

Nos dois casos apresentados, o número de componentes não é alterado em cada rodada de recombinação. Seguimos o procedimento adotado nas subseções anteriores, para calcular os polinômios dos produtos gerados pela recombinação do Nó Primo 5_1 .

Até onde é de nosso conhecimento, trataremos nas Subseções 5.3.1 e 5.3.2, e na Seção 5.4, de propostas de construções de modelos matemáticos capazes de prever os produtos resultantes desses tipos de recombinações, em um contexto não considerado anteriormente na literatura científica. Os resultados obtidos, nas subseções citadas anteriormente, podem ser generalizados para qualquer processo que gera uma série de nós (+) ou (-) ao longo de um segmento contínuo de um Nó Primo de DNA, com sítios repetidos inversamente.

5.3.1 Recombinação gerando um nó (+) em cada rodada da recombinação

Nesta subseção, mostramos como determinar os polinômios de Jones dos produtos resultantes das quatro primeiras rodadas de recombinação do Nó Primo 5_1 . Essa recombinação ocorre em sítios RI, gerando um nó (+) em cada rodada. Posteriormente, comentamos sobre esses resultados polinomiais.

Considere as mesmas definições já feitas anteriormente para o substrato S , Nó Primo 5_1 , e para os produtos resultantes dessa recombinação, isto é, K_1 , K_2 , K_3 e K_4 . A Figura 5.11, ilustra essas quatro primeiras rodadas de recombinação do substrato S .

Mostramos a seguir, o procedimento que usamos para calcular os polinômios de Jones

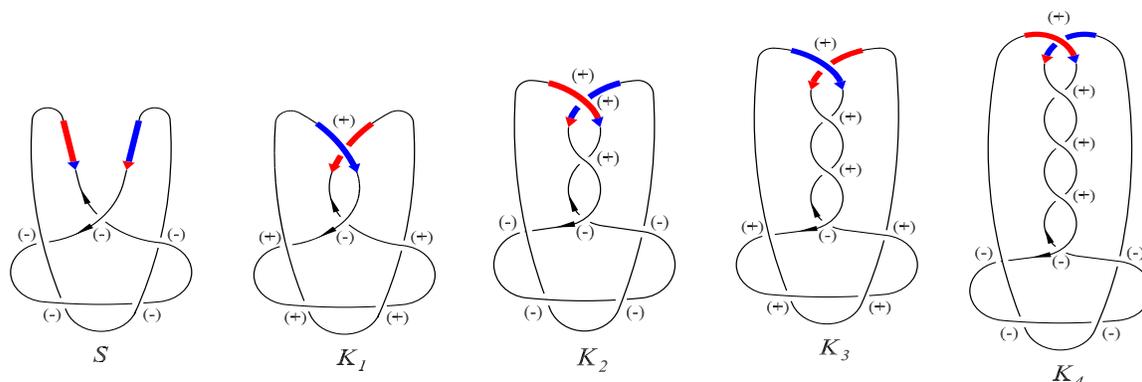


Figura 5.11: As quatro primeiras rodadas de recombinação com sítios RI do Nó Primo 5₁.

correspondentes aos produtos resultantes de cada uma das quatro rodadas de recombinação do Nó Primo 5₁:

1º) Determinamos os conjuntos estados para K_1 , K_2 , K_3 e K_4 , da seguinte forma:

(a) Em cada rodada de recombinação um nó (+) foi gerado, definimos cada uma dessas rodadas como sendo o estado K_+ , e aplicamos em K_+ as seguintes regras:

- *Passagem de Segmento*, que nesse caso, converte o nó (+) gerado em K_+ em um nó (-), formando assim o estado K_- ;
- *Troca de Segmento*, que nesse caso, converte o nó (+) do estado K_+ em um nó (0), formando o estado K_0 ;
- *O Quarto Estado* que, para esse caso, converte o nó (+) do estado K_+ em um nó (∞), formando o estado K_∞ .

(b) As Figuras 5.12, 5.13 e 5.14 ilustram, respectivamente, os conjuntos estados de K_1 , K_2 , K_3 e K_4 .

2º) Analisamos os conjuntos estados acima, para cada rodada de recombinação e associamos as formas topológicas encontradas nos estados K_- , K_0 e K_∞ com as formas topologicamente equivalentes das Tabelas 3.1 e 3.2, Seção 3.5 do Capítulo 3, as quais já possuem polinômios conhecidos. Posteriormente, substituímos os polinômios encontrados em K_- , K_0 e K_∞ de cada conjunto estado, na equação (3.2), Seção 3.2 do Capítulo 3, para calcular os respectivos polinômios de Jones dos produtos resultantes das quatro primeiras rodadas de recombinação. Em seguida, associamos cada polinômio com sua respectiva

forma topológica através das Tabelas 3.1 e 3.2.

1. Para o conjunto estado de K_1 , temos:

1.1. Relacionando as formas topológicas:

- $K_+ \equiv K_1$ que é um Nó trivial, portanto:
 $VK_+(t) = 1$.

1.2. Associando o polinômio calculado com a sua respectiva forma topológica:

- O polinômio de Jones do estado K_1 , é o polinômio de Jones do Nó trivial. Portanto o estado K_1 é o Nó trivial.

2. Para o conjunto estado de K_2 (Figura 5.12), temos:

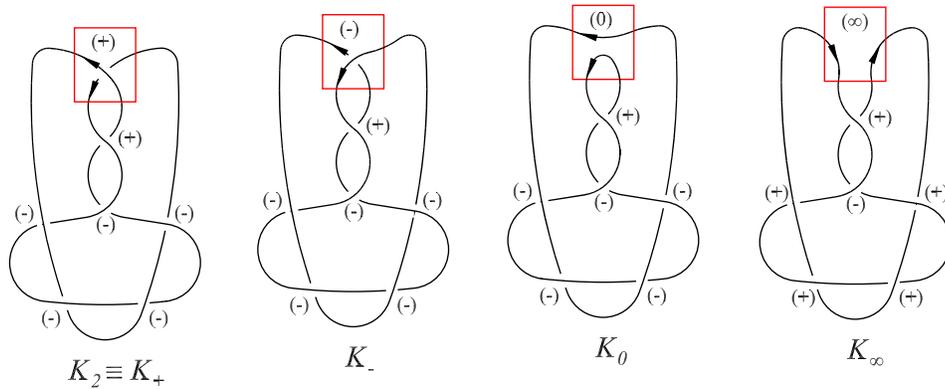


Figura 5.12: Conjunto Estado da segunda rodada de recombinação, K_2 .

2.1. Relacionando as formas topológicas:

- $K_+ \equiv K_2$, logo:
 $VK_+(t) = VK_2(t)$;
- $K_- \equiv S$, portanto:
 $VK_-(t) = -t^{-7} + t^{-6} - t^{-5} + t^{-4} + t^{-2}$;
- $K_0 \equiv$ A Catenane LD_p , então:
 $VK_0(t) = -t^{-11/2} + t^{-9/2} - t^{-7/2} - t^{-3/2}$;

- $K_\infty \equiv K_1$, portanto:
 $VK_\infty(t) = 1$.

2.2. Calculando o polinômio de Jones correspondente:

$$\begin{aligned} VK_2(t) &= VK_+(t) = t^2VK_-(t) + (t^{3/2} - t^{1/2})VK_0(t) \\ VK_2(t) &= VK_+(t) = t^2(-t^{-7} + t^{-6} - t^{-5} + t^{-4} + t^{-2}) + (t^{3/2} - t^{1/2}) \\ &\quad (-t^{-11/2} + t^{-9/2} - t^{-7/2} - t^{-3/2}) \\ VK_2(t) &= -t^{-4} + t^{-3} + t^{-1}. \end{aligned}$$

2.3. Associando o polinômio calculado com a sua respectiva forma topológica:

- O polinômio de Jones do estado K_2 , é o polinômio de Jones do Nó Trifólico negativo T_- . Portanto o estado K_2 é o trifólico (-).

3. Para o conjunto estado de K_3 (Figura 5.13), temos:

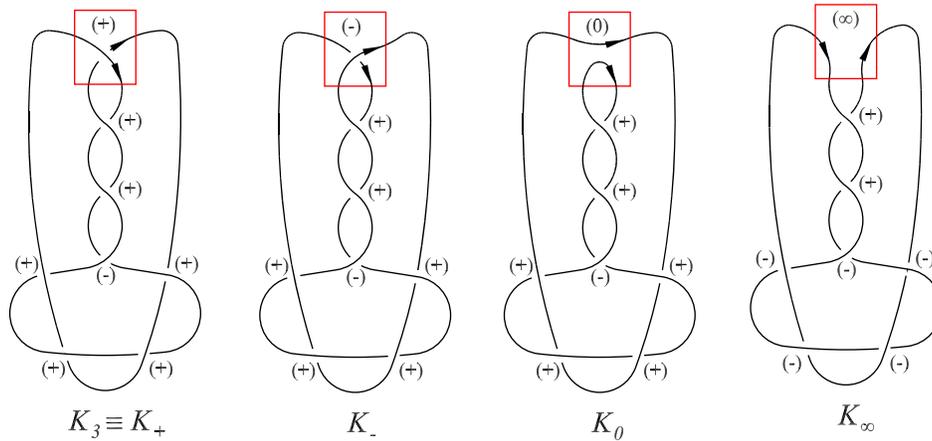


Figura 5.13: Conjunto Estado da terceira rodada de recombinação, K_3 .

3.1. Relacionando as formas topológicas:

- $K_+ \equiv K_3$, logo:
 $VK_+(t) = VK_3(t)$;
- $K_- \equiv K_1$, então:
 $VK_-(t) = 1$;

- $K_0 \equiv$ A Catenane LD_{ap} , portanto:
 $VK_0(t) = -t^{9/2} - t^{5/2} + t^{3/2} - t^{1/2}$;
- $K_\infty \equiv K_2$, então:
 $VK_\infty(t) = -t^{-4} + t^{-3} + t^{-1}$.

3.2. Calculando o polinômio de Jones correspondente:

$$\begin{aligned}
 VK_3(t) &= VK_-(t) = t^2VK_+(t) + (t^{3/2} - t^{1/2})VK_0(t) \\
 VK_3(t) &= VK_+(t) = t^2(1) + (t^{3/2} - t^{1/2}) \\
 &\quad (-t^{9/2} - t^{5/2} + t^{3/2} - t^{1/2}) \\
 VK_3(t) &= -t^6 + t^5 - t^4 + 2t^3 - t^2 + t.
 \end{aligned}$$

3.3. Associando o polinômio calculado com a sua respectiva forma topológica:

- O polinômio de Jones do estado K_3 , é o polinômio de Jones da imagem refletida do Nó primo 5₂. Portanto o estado K_3 é a imagem refletida do Nó Primo 5₂.

4. Para o conjunto estado de K_4 (Figura 5.14), temos:

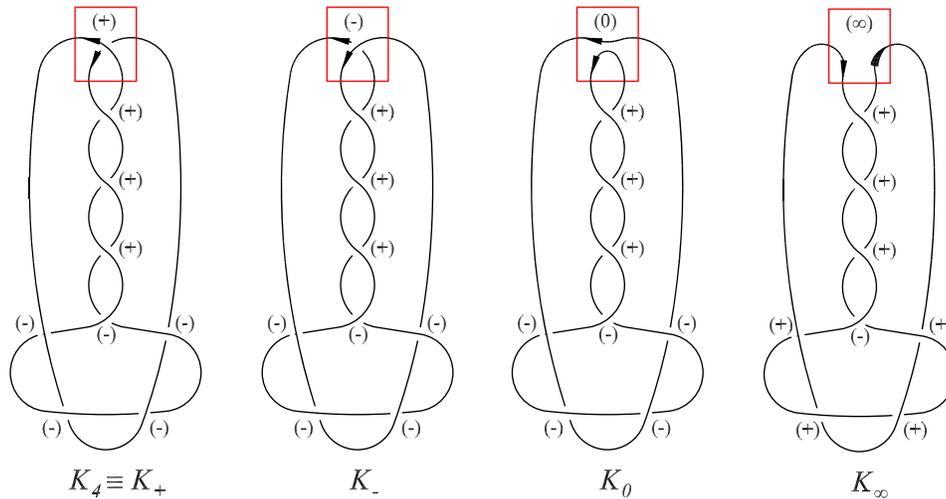


Figura 5.14: Conjunto Estado da quarta rodada de recombinação, K_4 .

4.1. Relacionando as formas topológicas:

- $K_+ \equiv K_4$, logo:
 $VK_+(t) = VK_4(t)$;

- $K_- \equiv K_2$, portanto:
 $VK_-(t) = -t^{-4} + t^{-3} + t^{-1}$;
- $K_0 \equiv$ A Catenane LD_p , então:
 $VK_0(t) = -t^{-11/2} + t^{-9/2} - t^{-7/2} - t^{-3/2}$;
- $K_\infty \equiv K_3$, portanto:
 $VK_\infty(t) = -t^6 + t^5 - t^4 + 2t^3 - t^2 + t$.

4.2. Calculando o polinômio de Jones correspondente:

$$\begin{aligned}
 VK_4(t) &= VK_+(t) = t^2VK_-(t) + (t^{3/2} - t^{1/2})VK_0(t) \\
 VK_4(t) &= VK_+(t) = t^2(-t^{-4} + t^{-3} + t^{-1}) + (t^{3/2} - t^{1/2}) \\
 &\quad (-t^{-11/2} + t^{-9/2} - t^{-7/2} - t^{-3/2}) \\
 VK_4(t) &= t^{-5} - 2t^{-4} + 2t^{-3} - 2t^{-2} + 2t^{-1} + t - 1.
 \end{aligned}$$

4.3. Associando o polinômio calculado com a sua respectiva forma topológica:

- O polinômio de Jones do estado K_4 , é o polinômio de Jones do Nó Primo 6_2 . Portanto o estado K_4 é o Nó Primo 6_2 .

3º) Analisando os resultados anteriores, concluímos que:

- Para rodadas pares:
 1. $VK_+(t) = VK_n(t)$;
 2. $VK_-(t) = VK_{n-2}$;
 3. $VK_0(t) = VK_{LD_p}$;
 4. $VK_\infty(t) = VK_{n-1}$.
- Para rodadas ímpares:
 1. $VK_+(t) = VK_n(t)$;
 2. $VK_-(t) = VK_{n-2}$;
 3. $VK_0(t) = VK_{LD_{ap}}$;
 4. $VK_\infty(t) = VK_{n-1}$.

Então, via teoria polinomial, podemos determinar todos os produtos da recombinação com sítios repetidos inversamente que geram um nó (+) em cada rodada de recombinação, se conhecermos dois produtos quaisquer sucessivos. Considerando:

1. $n =$ o número de rodadas;
2. $Lk(K_{0(K_{n-2})}) =$ o número de ligações da Catenane do estado K_0 da rodada K_{n-2} ;

Então, o polinômio de Jones pode ser computado através da seguinte equação geral:

$$VK_n(t) = VK_+(t) = tVK_{n-2} + (1 - t)^{3Lk(K_{0(K_{n-2})})}VK_{n-1}. \quad (5.3)$$

5.3.2 Recombinação gerando um nó (-) em cada rodada da recombinação

Nesta subseção, mostramos como determinar os polinômios de Jones dos produtos resultantes das quatro primeiras rodadas de recombinação do Nó Primo 5₁. Essa recombinação ocorre em sítios RI, gerando um nó (-) em cada rodada. Posteriormente, comentamos sobre esses resultados polinomiais. A Figura 5.15, ilustra as quatro primeiras rodadas de recombinação do substrato S , já definidos na Subseção 5.3.1, diferindo apenas na geração de um nó (-).

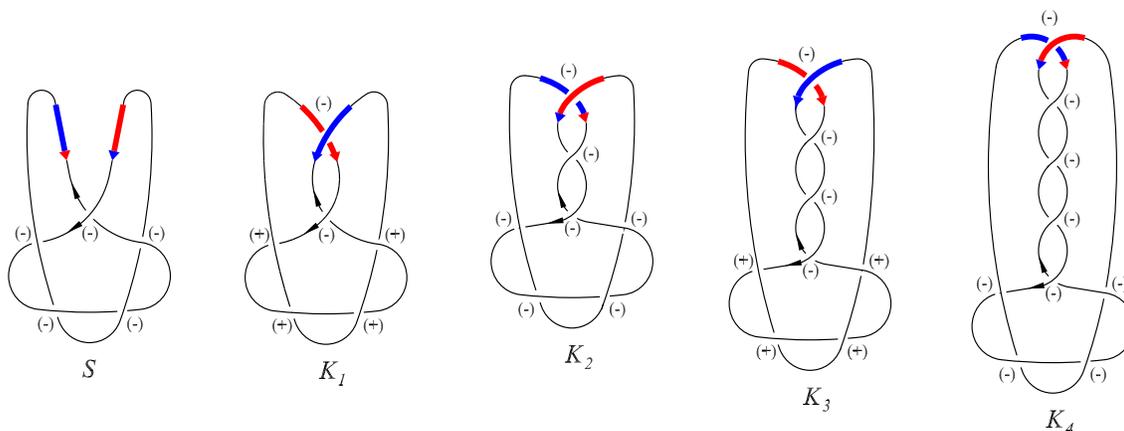


Figura 5.15: As quatro primeiras rodadas de recombinação com sítios RI do Nó Primo 5₁.

Mostramos a seguir, exatamente o mesmo procedimento usado na Subseção 5.3.1, para calcular os polinômios de Jones correspondentes aos produtos resultantes de cada uma das quatro rodadas de recombinação do Nó Primo 5_1 :

1º) Determinamos os conjuntos estados para K_1 , K_2 , K_3 e K_4 , da seguinte forma:

(a) Em cada rodada de recombinação um nó (-) foi gerado, definimos cada uma dessas rodadas como sendo o estado K_- , e aplicamos em K_- as seguintes regras:

- *Passagem de Segmento*, que converte o nó (-) gerado em K_- em um nó (+), formando assim o estado K_+ ;
- *Troca de Segmento*, que converte o nó (-) de K_- em um nó (0), formando o estado K_0 ;
- *O Quarto Estado*, que converte o nó (-) de K_- em um nó (∞), formando o estado K_∞ .

(b) As Figuras 5.16, 5.17, 5.18 e 5.19 ilustram, respectivamente, os conjuntos estados de K_1 , K_2 , K_3 e K_4 .

2º) Analisamos os conjuntos estados acima, para cada rodada de recombinação e associamos as formas topológicas encontradas nos estados K_+ , K_0 e K_∞ com as formas topologicamente equivalentes das Tabelas 3.1 e 3.2, Seção 3.5 do Capítulo 3, as quais já possuem polinômios conhecidos. Posteriormente, substituímos os polinômios encontrados em K_+ , K_0 e K_∞ de cada conjunto estado, na equação (3.2), Seção 3.2 do Capítulo 3, para calcular os respectivos polinômios de Jones dos produtos resultantes das quatro primeiras rodadas de recombinação. Em seguida, associamos cada polinômio com sua respectiva forma topológica através das Tabelas 3.1 e 3.2.

1. Para o conjunto estado de K_1 (Figura 5.16), temos:

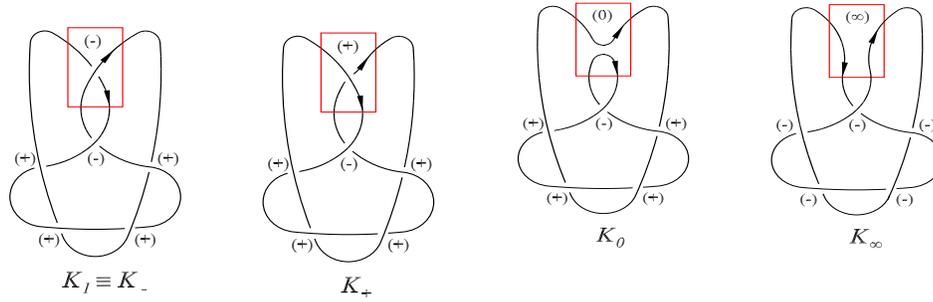


Figura 5.16: Conjunto Estado da primeira rodada de recombinação, K_1 .

1.1. Relacionando as formas topológicas:

- $K_- \equiv K_1$, logo:
 $VK_-(t) = VK_1(t)$;
- $K_+ \equiv$ Nó trivial, que por definição:
 $VK_+(t) = 1$;
- $K_0 \equiv$ A Catenane LD_{ap} , então:
 $VK_0(t) = -t^{9/2} - t^{5/2} + t^{3/2} - t^{1/2}$;
- $K_\infty \equiv S$, portanto:
 $VK_\infty(t) = -t^{-7} + t^{-6} - t^{-5} + t^{-4} + t^{-2}$.

1.2. Calculando o polinômio de Jones correspondente:

$$\begin{aligned}
 VK_1(t) &= VK_-(t) = t^{-2}VK_+(t) + (t^{-3/2} - t^{-1/2})VK_0(t) \\
 VK_1(t) &= VK_-(t) = t^{-2}(1) + (t^{-3/2} - t^{-1/2}) \\
 &\quad (-t^{9/2} - t^{5/2} + t^{3/2} - t^{1/2}) \\
 VK_1(t) &= t^{-2} - t^{-1} + 2 - 2t + t^2 - t^3 + t^4.
 \end{aligned}$$

1.3. Associando o polinômio calculado com a sua respectiva forma topológica:

- O polinômio de Jones do estado K_1 , é o polinômio de Jones da imagem refletida do Nó Primo 6₁. Portanto o estado K_1 é a imagem refletida do Nó Primo 6₁.

2. Para o conjunto estado de K_2 (Figura 5.17), temos:

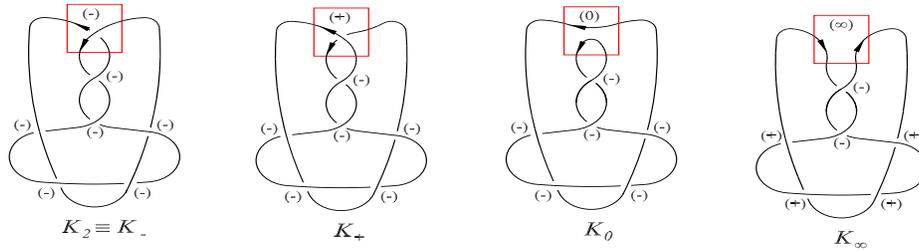


Figura 5.17: Conjunto Estado da segunda rodada de recombinação, K_2 .

2.1. Relacionando as formas topológicas:

- $K_- \equiv K_2$, logo:
 $VK_-(t) = VK_2(t)$;
- $K_+ \equiv S$, portanto:
 $VK_+(t) = -t^{-7} + t^{-6} - t^{-5} + t^{-4} + t^{-2}$;
- $K_0 \equiv$ A Catenane LD_p , então:
 $VK_0(t) = -t^{-11/2} + t^{-9/2} - t^{-7/2} - t^{-3/2}$;
- $K_\infty \equiv K_1$, portanto:
 $VK_\infty(t) = t^{-2} - t^{-1} + 2 - 2t + t^2 - t^3 + t^4$.

2.2. Calculando o polinômio de Jones correspondente:

$$\begin{aligned}
 VK_2(t) &= VK_-(t) = t^{-2}VK_+(t) + (t^{-3/2} - t^{-1/2})VK_0(t) \\
 VK_2(t) &= VK_-(t) = t^{-2}(-t^{-7} + t^{-6} - t^{-5} + t^{-4} + t^{-2}) \\
 &\quad + (t^{-3/2} - t^{-1/2})(-t^{-11/2} + t^{-9/2} - t^{-7/2} - t^{-3/2}) \\
 VK_2(t) &= -t^{-9} + t^{-8} - 2t^{-7} + 3t^{-6} - 2t^{-5} + 2t^{-4} - t^{-3} + t^{-2}.
 \end{aligned}$$

2.3. Associando o polinômio calculado com a sua respectiva forma topológica:

- O polinômio de Jones do estado K_2 , é o polinômio de Jones da imagem refletida do Nó Primo 7₃. Portanto o estado K_2 é a imagem refletida do Nó Primo 7₃.

3. Para o conjunto estado de K_3 (Figura 5.18), temos:

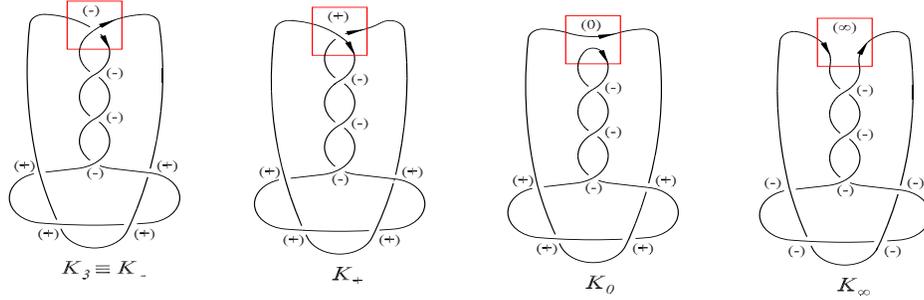


Figura 5.18: Conjunto Estado da terceira rodada de recombinação, K_3 .

3.1. Relacionando as formas topológicas:

- $K_- \equiv K_3$, logo:
 $VK_-(t) = VK_3(t)$;
- $K_+ \equiv K_1$, portanto:
 $VK_+(t) = t^{-2} - t^{-1} + 2 - 2t + t^2 - t^3 + t^4$;
- $K_0 \equiv$ A Catenane LD_{ap} , então:
 $VK_0(t) = -t^{9/2} - t^{5/2} + t^{3/2} - t^{1/2}$;
- $K_\infty \equiv K_2$, então:
 $VK_\infty(t) = -t^{-9} + t^{-8} - 2t^{-7} + 3t^{-6} - 2t^{-5} + 2t^{-4} - t^{-3} + t^{-2}$.

3.2. Calculando o polinômio de Jones correspondente:

$$\begin{aligned}
 VK_3(t) &= VK_-(t) = t^{-2}VK_+(t) + (t^{-3/2} - t^{-1/2})VK_0(t) \\
 VK_3(t) &= VK_-(t) = t^{-2}(t^{-2} - t^{-1} + 2 - 2t + t^2 - t^3 + t^4) \\
 &\quad + (t^{-3/2} - t^{-1/2})(-t^{9/2} - t^{5/2} + t^{3/2} - t^{1/2}) \\
 VK_3(t) &= t^{-4} - t^{-3} + 2t - 2 - 3t^{-1} + 3 - 3t + 2t^2 - t^3 + t^4.
 \end{aligned}$$

3.3. Associando o polinômio calculado com a sua respectiva forma topológica:

- O polinômio de Jones do estado K_3 , é o polinômio de Jones da imagem refletida do Nó Primo 8₃. Portanto o estado K_3 é a imagem refletida do Nó Primo 8₃.

4. Para o conjunto estado de K_4 (Figura 5.19), temos:

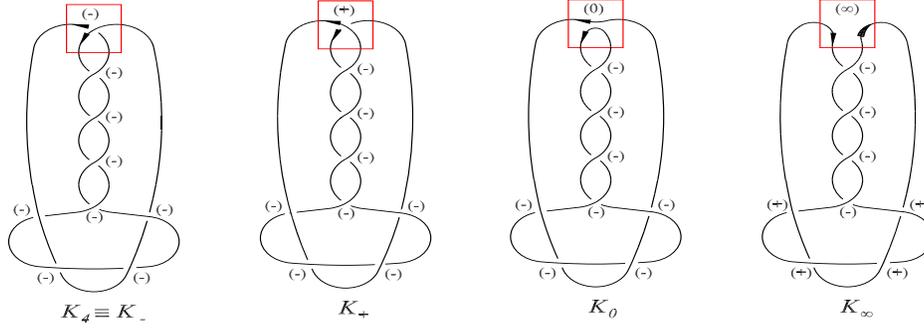


Figura 5.19: Conjunto Estado da quarta rodada de recombinação, K_4 .

4.1. Relacionando as formas topológicas:

- $K_- \equiv K_4$, logo:
 $VK_-(t) = VK_4(t)$;
- $K_+ \equiv K_2$, então:
 $VK_+(t) = -t^{-9} + t^{-8} - 2t^{-7} + 3t^{-6} - 2t^{-5} + 2t^{-4} - t^{-3} + t^{-2}$;
- $K_0 \equiv$ A Catenane LD_p , portanto:
 $VK_0(t) = -t^{-11/2} + t^{-9/2} - t^{-7/2} - t^{-3/2}$;
- $K_\infty \equiv K_3$, então:
 $VK_\infty(t) = t^{-4} - t^{-3} + 2t - 2 - 3t^{-1} + 3 - 3t + 2t^2 - t^3 + t^4$.

4.2. Calculando o polinômio de Jones correspondente:

$$\begin{aligned}
 VK_4(t) &= VK_-(t) = t^{-2}VK_+(t) + (t^{-3/2} - t^{-1/2})VK_0(t) \\
 VK_4(t) &= VK_-(t) = t^{-2}(-t^{-9} + t^{-8} - 2t^{-7} + 3t^{-6} - 2t^{-5} + 2t^{-4} - t^{-3} + t^{-2}) \\
 &\quad + (t^{-3/2} - t^{-1/2})(-t^{-11/2} + t^{-9/2} - t^{-7/2} - t^{-3/2}) \\
 VK_4(t) &= -t^{-11} + t^{-10} - 2t^{-9} + 3t^{-8} - 3t^{-7} + 4t^{-6} - 3t^{-5} + 2t^{-4} + t^{-2} - t^{-3}.
 \end{aligned}$$

4.3. Associando o polinômio calculado com a sua respectiva forma topológica:

- O polinômio de Jones do estado K_4 , é o polinômio de Jones do Nó Primo 9_2 . Portanto o estado K_4 é o Nó Primo 9_2 .

3º) Analisando os resultados anteriores, concluímos que:

• Para rodadas pares:

1. $VK_-(t) = VK_n(t)$;
2. $VK_+(t) = VK_{n-2}$;
3. $VK_0(t) = VK_{LD_p}$;
4. $VK_\infty(t) = VK_{n-1}$.

• Para rodadas ímpares:

1. $VK_-(t) = VK_n(t)$;
2. $VK_+(t) = VK_{n-2}$;
3. $VK_0(t) = VK_{LD_{ap}}$;
4. $VK_\infty(t) = VK_{n-1}$.

Então, via teoria polinomial, podemos determinar todos os produtos da recombinação com sítios repetidos inversamente que geram um nó (-) em cada rodada de recombinação, se conhecermos dois produtos quaisquer sucessivos. Considerando:

1. n = o número de rodadas;
2. $Lk(K_0(K_{n-2}))$ = o número de ligações da Catenane do estado K_0 da rodada K_{n-2} ;

Então, o polinômio de Jones pode ser computado através da seguinte equação geral:

$$VK_n(t) = VK_-(t) = t^{-1}VK_{n-2} + (1 - t^{-1})^{3Lk(K_0(K_{n-2}))}VK_{n-1}. \quad (5.4)$$

5.4 Construção de um Modelo Matemático para Recombinações de Nós Primos com Sítios RD da Família Plectonêmica

Nesta seção, apresentamos um modelo matemático capaz de prever o produto resultante de qualquer rodada de recombinação, de Nós e Catenanes Diméricas Primos que pertençam a família plectonêmica, considerando somente o número de nós do substrato e o número da rodada que se deseja conhecer o produto. Considere as seguintes definições:

Definição 5.1. Denote por N o número de nós do substrato que pertença a família plectonêmica.

Definição 5.2. Denote por n o número da rodada que se deseja conhecer o produto resultante da recombinação.

Então, via teoria polinomial, podemos calcular o polinômio de qualquer rodada de recombinação através dos seguintes teoremas:

Teorema 5.1. Para a recombinação que gera nós (+) ao longo de um segmento contínuo de DNA, calculamos os polinômios dos produtos dos seguintes substratos:

1. Para Nós Primos Plectonêmicos:

(a) Para $0 \leq n \leq N - 2$, temos:

$$VK_n(t) = \left[(-1)^n \sum_{k=(n-N)}^{-2} (-t)^k + (-1)^n \right] t^{(n-N+1)/2}. \quad (5.5)$$

(b) Para:

- $n = N - 1$, o polinômio de Jones é: $VK_n(t) = 1$;
- $n = N$, o polinômio de Jones é: $VK_n(t) = (-t^{-1/2} - t^{1/2})$;
- $n = N + 1$, o polinômio de Jones é: $VK_n(t) = 1$.

(c) Para $n \geq N + 2$, temos:

$$VK_n(t) = \left[(-1)^n \sum_{k=2}^{n-N} (-t)^k + (-1)^n \right] t^{(n-N-1)/2}. \quad (5.6)$$

2. Para Catenanes Diméricas Plectonêmicas:

(a) Para $0 \leq n \leq N - 2$, temos:

$$VK_n(t) = \left[(-1)^{n+1} \sum_{k=(n-N)}^{-2} (-t)^k + (-1)^{n+1} \right] t^{(n-N+1)/2}. \quad (5.7)$$

(b) Para:

- $n = N - 1$, o polinômio de Jones é: $VK_n(t) = 1$;
- $n = N$, o polinômio de Jones é: $VK_n(t) = (-t^{-1/2} - t^{1/2})$;
- $n = N + 1$, o polinômio de Jones é: $VK_n(t) = 1$.

(c) Para $n \geq N + 2$, temos:

$$VK_n(t) = \left[(-1)^{n+1} \sum_{k=2}^{n-N} (-t)^k + (-1)^{n+1} \right] t^{(n-N-1)/2}. \quad (5.8)$$

Teorema 5.2. Para recombinação que gera nós (-) ao longo de um segmento contínuo de DNA, calculamos os polinômios dos produtos dos seguintes substratos:

1. Para Nós Primos Plectonêmicos:

$$VK_n(t) = \left[(-1)^n \sum_{k=(-n-N)}^{-2} (-t)^k + (-1)^n \right] t^{(-n-N+1)/2}. \quad (5.9)$$

2. Para Catenanes Diméricas Plectonêmicas:

$$VK_n(t) = \left[(-1)^{n+1} \sum_{k=(-n-N)}^{-2} (-t)^k + (-1)^{n+1} \right] t^{(-n-N+1)/2}. \quad (5.10)$$

5.5 Conclusões

Neste capítulo, até onde é de nosso conhecimento, apresentamos um modelo matemático capaz de prever os produtos resultantes de recombinações de Nós e Catenanes Diméricas Primos, com sítios RD e RI que geram uma série de nós (+) ou (-) ao longo de um segmento contínuo de DNA, em um contexto não considerado anteriormente na literatura científica. Nosso objetivo, é de agilizar os cálculos dos polinômios de Jones e mostrar que

para a obtenção dos polinômios de Jones, da família de Nós e Catenanes plectonêmicos, não é necessário conhecer duas rodadas sucessivas.

Conseguimos obter os polinômios de Jones de qualquer rodada de recombinação, de um substrato que pertence a família plectonêmica, considerando somente o número de nós do substrato e o número da rodada que se deseja conhecer o produto. Eliminando assim, a necessidade de encontrar duas rodadas sucessivas de recombinação, e o conjunto estado de cada uma dessas rodadas.

Capítulo 6

Conclusões

Os procedimentos utilizados na construção de modelos matemáticos para os mecanismos *resolvase Tn3* e *integrase* capazes de preverem os produtos resultantes da recombinação, encontrados nas literaturas [1], [2] e [3], consistem basicamente em conhecer duas rodadas sucessivas quaisquer para se determinar todos os produtos de recombinação e saber a quantidade de nós supertorcidos presos entre os sítios do substrato, respectivamente. Ressalta-se que para calcular o polinômio de um produto de recombinação que possui sítios com repetições diretas é necessário determinar o conjunto estado das duas rodadas anteriores, associando cada um desses estados com as formas das Tabelas 3.1 e 3.2 que são topologicamente iguais a esses estados e que já possuem um polinômio conhecido, e para calcular o polinômio de um produto de recombinação que possui sítios com repetições inversas é necessário que o substrato possua a forma de um Nó trivial plectonêmico.

Por essa ser uma tarefa bastante árdua, havia a necessidade de se determinar um método mais simples para obtenção dos polinômios de tais produtos de recombinação. E essa foi a motivação principal desta dissertação, determinar modelos matemáticos mais simples capazes de preverem os produtos das rodadas das recombinações que possuem sítios repetidos diretamente e inversamente.

6.1 Contribuições

No Capítulo 5 deste trabalho, encontram-se as suas contribuições. Nesse capítulo, inicialmente estabeleceu-se uma proposta para construção de um modelo matemático capaz de prever todos os produtos de recombinação do Nó Primo 5_1 . Tal proposta consiste basicamente em se determinar, através do uso da técnica polinomial apresentada em [1],

todos os produtos gerados por meio das quatro possibilidades de recombinação que gera um nó (+) ou um nó (-) ao longo de um segmento contínuo do DNA em cada rodada de recombinação. Em seguida, os produtos gerados por recombinação com sítios que possuem repetições inversas, foram utilizados como passo intermediário para a construção de um modelo matemático capaz de prever, através de duas rodadas sucessivas, todos os produtos desse tipo de recombinação. Esse resultado pode ser generalizado para qualquer processo que gera uma série de nós (+) ou nós (-) ao longo de um segmento de DNA que possui repetições inversas. Enfatiza-se que, caso o substrato seja da família plectonêmica, inovou-se ao empregar um modelo matemático capaz de prever todos os produtos resultantes das rodadas de recombinação, sem o conhecimento de qualquer rodada. A importância desses resultados está no rigor matemático que eles acrescentam nos estudos da recombinação, na agilidade para obtenção dos polinômios de Jones em recombinações com sítios que possuem repetições inversas e na praticidade de se obter os polinômios de Jones dos produtos de recombinação dos substratos da família plectonêmica.

6.2 Propostas para Trabalhos Futuros

Como temas para futuras pesquisas, propõem-se:

- Determinar métodos mais simples capazes de preverem os produtos resultantes da recombinação de outras famílias de Nós ou Catenanes;
- Utilizar o método polinomial para compreender o mecanismo enzimático de outras enzimas;
- Pesquisar os vários campos de aplicação polinomial dentro da biologia molecular e focar um problema a ser estudado e modelado matematicamente através do método polinomial;
- Aplicar o método polinomial no campo da terapia gênica.

Referências Bibliográficas

- [1] J. H. White, K. C. White Millett, N. R. Cozzarelli, “Description of the Topological Entanglement of DNA Catenanes and Knots by a Powerful Method Involving Strand Passage and Recombination”, *J. Mol. Biology*, vol. 197, pp. 585-603, 1987.
- [2] S. A. Wasserman e N. R. Cozzarelli, “Biochemical Topology: Applications to DNA Recombination and Replication”, *Science*, vol. 232, , pp. 951-960, 1986.
- [3] D. W. Summers Jr., “Untangling DNA”, *Math. Intelligencer*, vol. 12, No. 3, pp. 71-80, 1990.
- [4] J. C. Wang, “DNA Topoisomerases”, *Scientific American*, vol. 247, pp. 94-109, 1982.
- [5] D. Voet, J. G. Voet, C. W. Pratt, *Fundamentos de Bioquímica*, Editora Artmed, 1ª Reimpressão, 2002.
- [6] T. M. Devlin, *Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas*, Editora Edgard Blücher Ltda, 2000.
- [7] L. Stryer, *Bioquímica*, Editora Guanabara Koogan S.A., 4ª Edição, 1996.
- [8] S. J. Spengler, A. Stasiak & N. R. Cozzarelli, *Cell*, vol. 42, pp. 325, 1985.
- [9] H. Schubert, “Math. Z.”, vol. 65, pp. 133-170, 1956.
- [10] V. F. R. Jones, “Bull. A.M.S.”, vol. 12, pp. 103-111, 1985.
- [11] P. Freyd, D. Yetter, J. Hoste, W. B. R. Lickorish, K. Millett & A. Ocneanu, “Bull. A.M.S.”, vol. 12, pp. 239-246, 1985.
- [12] J. Hoste, “Pac. J. Math.”, vol. 124, pp. 295-320, 1986.
- [13] J. W. Alexander, “Trans. Amer. Math. Soc.”, vol. 30, pp. 275-306, 1928.

- [14] J. H. Conway, *In Computational Problems in Abstract Algebra*, Pergamon Press, Oxford., pp. 329-358, 1969.
- [15] W. B. R. Lickorish & K. C. Millett, “Topology”, vol. 26, pp. 107-141, 1987.