

AJUSTE DE LA CURVA DE RELAJACION DE BIRREFRINGENCIA ELECTRICA EN ADN

María E. Ascheri, Pedro A. Willging
Luis A. Pugnaroni, Jorge A. Bertolotto

Fac. de Cs. Exactas y Naturales, U.N.L.Pam.
Av. Uruguay 151, 6300 Santa Rosa, La Pampa, Argentina

RESUMEN

En el estudio de la birrefringencia eléctrica del ADN sometido a campos eléctricos, se obtienen curvas de relajación. Un modelo teórico supone que la curva es una suma de decaimientos exponenciales con el tiempo. Hemos implementado el método de mínimos cuadrados no lineal. Para ello comenzamos por un primer ajuste mediante el método de alineación sucesiva ("peeling"), obteniendo rápidamente valores aproximados de los parámetros de la curva. Luego, a partir del método de Newton mejoramos el error de mínimos cuadrados, reduciéndolo con respecto al de los valores iniciales.

ABSTRACT

Studying electric birrefringence of DNA put in electric fields, curves of relaxation have been obtained. A theoretical model supposes that the curve is the sum of exponential decays time. Nonlinear least square method has been implemented. We began with a first adjustment through the successive alignment method, obtaining fast approximate values of the parameters of the curve. Then, starting from the Newton method, we improved the least squares error, reducing it with respect to that one due to initial values.

INTRODUCCION

El estudio electro-óptico de la materia consiste en el análisis del cambio de las propiedades ópticas de los materiales cuando éstos son sometidos a campos eléctricos externos. Nuestro interés se centra en el estudio de la birrefringencia eléctrica de soluciones acuosas de ADN [1].

Es importante el análisis de la relajación de la birrefringencia con el tiempo, luego del corte del campo eléctrico. De este análisis pueden deducirse tamaños y formas de las moléculas.

Normalmente se estudia esta relajación como una suma de exponenciales decrecientes de la forma

$$\frac{\Delta n(t)}{\Delta n_0} = \sum_{i=1}^n c_i \exp(-t/\tau_i)$$

donde $\Delta n(t)$ es la birrefringencia eléctrica en función del tiempo luego de la supresión del campo eléctrico, Δn_0 la birrefringencia eléctrica en $t=0$, c_i la contribución de cada exponencial de tiempo de relajación τ_i [2].

El modelo que nosotros seguimos considera que deben tomarse en cuenta tres exponenciales.

El análisis de la curva de relajación se puede hacer por medio de distintos métodos de ajuste. Entre ellos se encuentran: el método de transformadas de Fourier [3], método de Prony [4], método de Padé-Laplace [5], método de alineación sucesiva ("peeling") [1], y el método de mínimos cuadrados no lineal [6], [7]. En nuestro caso hemos elegido el método de mínimos cuadrados no lineal.

TEORIA

Método de mínimos cuadrados no lineal

Este método permite la averiguación de los parámetros de una fórmula empírica, la cual no presupone la linealidad en lo que respecta a los parámetros. Supongamos que para un sistema de valores ordenados (x_j, y_j) , $j=1, 2, \dots, n$ se ha seleccionado la fórmula empírica,

$$y = \tilde{f}(x; a_1, a_2, \dots, a_m) \quad (1)$$

que depende de los m parámetros a_v , ($v=1, 2, \dots, m$; $m < n$).

El problema consiste en determinar los parámetros a_1, a_2, \dots, a_m , de forma que los valores de $\tilde{f}(x_j)$ proporcionados por la fórmula (1) coincidan lo mejor posible con los valores y_j dados, es decir, que las desviaciones

$$\varepsilon_j = y_j - \tilde{f}(x_j; a_1, a_2, \dots, a_m) \quad (j=1, 2, \dots, n)$$

sean lo más pequeñas posibles.

Debido a que estas desviaciones pueden ser positivas o negativas, se toma el cuadrado de estas diferencias para obtener un número no negativo. El cuadrado total de las desviaciones está dado por

$$S = \sum_{j=1}^n (\varepsilon_j)^2 = \sum_{j=1}^n [y_j - \tilde{f}(x_j; a_1, a_2, \dots, a_m)]^2 \quad (2)$$

donde y_j son los datos en x_j , y $\tilde{f}(x_j; a_1, a_2, \dots, a_m)$ es la función propuesta evaluada en x_j y parametrizada por los coeficientes a_1, a_2, \dots, a_m . La fórmula (2) se usa entonces para obtener una estimación del error. Debido a que los m parámetros a_v , ($v=1, 2, \dots, m$; $m < n$) son arbitrarios, se determinan de forma que minimicen a S . El mínimo de S se obtiene si las

derivadas parciales de S con respecto a los m parámetros a_v , ($v=1,2,\dots,m$; $m < n$) se anulan y las derivadas parciales segundas son positivas. Esto es, el error será un extremo cuando

$$\frac{\partial S}{\partial a_v} = 0, \quad \text{para } v=1,2,\dots,m \quad (3)$$

y habremos encontrado un mínimo si

$$\frac{\partial^2 S}{\partial a_v^2} > 0, \quad \text{para } v=1,2,\dots,m \quad (4)$$

Antes de aplicar el método de los mínimos cuadrados, y como un primer ajuste de los datos, se determinan primero valores aproximados de los parámetros $a_1^{(0)}, a_2^{(0)}, \dots, a_m^{(0)}$, usando el método de alineación sucesiva, (también pueden, por ejemplo, obtenerse gráficamente), según el cual se linealiza la fórmula (1).

Este modelo, en su estado transformado, se ajusta usando regresión lineal [8] para evaluar los coeficientes constantes. Después se vuelve a su estado original y se usa entonces para propósitos predictivos.

Los valores aproximados $a_1^{(0)}, a_2^{(0)}, \dots, a_m^{(0)}$ así determinados, son entonces usados como valores iniciales para el método de mínimos cuadrados. Este método tiene la ventaja que las desviaciones ϵ_j son en valor absoluto pequeñas. Una desventaja de este método consiste en los gastos de cálculo relativamente grandes. Por consiguiente, este método se emplea, de ordinario, para la preparación de resultados de observación con gran exactitud cuando también se debe conseguir una exactitud grande en los parámetros.

Sin embargo, adviértase que en este caso los cálculos intermedios tienen que llevarse a cabo con muchas cifras decimales, ya que de otra forma puede tener lugar, en casos desfavorables, una pérdida de exactitud. Como en particular, en la sustracción tiene lugar una pérdida de cifras, los cálculos tienen que llevarse a cabo con un número elevado de las llamadas cifras de protección.

Cuando el método no usa ninguna información acerca de la forma (multidimensional) de S para decidir en que dirección moverse, es posible "pasearse alrededor" de un mínimo, logrando encerrarlo más en cada paso, pero no moviéndose directamente hacia él.

Nuestro objetivo es determinar el punto para el cual

$$\frac{\partial S(a_1, a_2, \dots, a_m)}{\partial a_i} = 0, \quad \text{para } i=1,2,\dots,m. \quad (5)$$

Estas son precisamente las ecuaciones conocidas con el nombre de "ecuaciones normales".

Desarrollando $\frac{\partial S}{\partial a_i}$ alrededor de $(a_1^{(0)}, a_2^{(0)}, \dots, a_m^{(0)})$, conservando solamente los términos lineales,

$$\begin{aligned}
\frac{\partial S(a_1, a_2, \dots, a_m)}{\partial a_i} &= \frac{\partial S(a_1^{(0)}, a_2^{(0)}, \dots, a_m^{(0)})}{\partial a_i} + \\
&+ (a_1 - a_1^{(0)}) \frac{\partial}{\partial a_1} \frac{\partial S(a_1^{(0)}, a_2^{(0)}, \dots, a_m^{(0)})}{\partial a_i} + \\
&+ (a_2 - a_2^{(0)}) \frac{\partial}{\partial a_2} \frac{\partial S(a_1^{(0)}, a_2^{(0)}, \dots, a_m^{(0)})}{\partial a_i} + \dots + \\
&+ (a_m - a_m^{(0)}) \frac{\partial}{\partial a_m} \frac{\partial S(a_1^{(0)}, a_2^{(0)}, \dots, a_m^{(0)})}{\partial a_i} \quad (6)
\end{aligned}$$

Definiendo

$$\delta_i^{(0)} = a_i - a_i^{(0)}, \quad (\text{términos de corrección})$$

$$S_i = \frac{\partial S(a_1^{(0)}, a_2^{(0)}, \dots, a_m^{(0)})}{\partial a_i},$$

$$S_{ij} = \frac{\partial^2 S(a_1^{(0)}, a_2^{(0)}, \dots, a_m^{(0)})}{\partial a_i \partial a_j},$$

arribamos al conjunto de ecuaciones lineales,

$$\begin{aligned}
S_{11}\delta_1^{(0)} + S_{12}\delta_2^{(0)} + \dots + S_{1m}\delta_m^{(0)} &= -S_1 \\
S_{21}\delta_1^{(0)} + S_{22}\delta_2^{(0)} + \dots + S_{2m}\delta_m^{(0)} &= -S_2 \\
\cdot &\quad \cdot \quad \cdot \quad \cdot \quad \cdot \\
\cdot &\quad \cdot \quad \cdot \quad \cdot \quad \cdot \\
\cdot &\quad \cdot \quad \cdot \quad \cdot \quad \cdot \\
S_{m1}\delta_1^{(0)} + S_{m2}\delta_2^{(0)} + \dots + S_{mm}\delta_m^{(0)} &= -S_m
\end{aligned} \quad (7)$$

Estas ecuaciones son lineales, debido a que conservamos solamente los términos lineales en el desarrollo de las derivadas parciales [ecuación (6)]. Podemos escribirlas en la forma matricial como

$$\begin{aligned}
\begin{bmatrix} S_{11} & S_{12} & \dots & S_{1m} \\ S_{21} & S_{22} & \dots & S_{2m} \\ \cdot & \cdot & \dots & \cdot \\ \cdot & \cdot & \dots & \cdot \\ S_{m1} & S_{m2} & \dots & S_{mm} \end{bmatrix} & \begin{bmatrix} \delta_1^{(0)} \\ \delta_2^{(0)} \\ \cdot \\ \cdot \\ \delta_m^{(0)} \end{bmatrix} &= & \begin{bmatrix} S_1 \\ S_2 \\ \cdot \\ \cdot \\ S_m \end{bmatrix}
\end{aligned} \quad (8)$$

El arreglo cuadrado cuyos elementos son las derivadas parciales segundas de S , es conocido como el Hessiano de S .

Siendo ésta una ecuación matricial lineal, usamos el método de Crout [9], [10] para obtener los $\delta^{(0)}$ de la ecuación (8).

Una mejor aproximación para la localización del mínimo será entonces,

$$a_i^{(1)} = a_i^{(0)} + \delta_i^{(0)}, \quad (i=1, 2, \dots, m). \quad (9)$$

Este es virtualmente el mismo procedimiento usado para hallar las raíces de ecuaciones, excepto que ahora tenemos un conjunto de ecuaciones simultáneas para resolver. Como en aquel caso, este proceso es ejecutado repetidamente, de modo que para la k -ésima iteración escribiremos

$$a_i^{(k)} = a_i^{(k-1)} + \delta_i^{(k-1)}, \quad (k=1, 2, \dots). \quad (10)$$

Este proceso continúa hasta que los δ son todos suficientemente pequeños o hasta que las iteraciones no logren reducir significativamente a S .

Este método no es nada más que el método de Newton [11], [12] extendido a diferentes funciones en varias variables independientes. Cerca de un mínimo, converge bastante rápidamente, pero si es iniciado lejos del mínimo, el método de Newton puede ser lento para converger, y puede en efecto, irse a una región totalmente distinta del espacio de parámetros. No se puede garantizar que el método de Newton tenga éxito; para lograrlo necesita una muy buena aproximación inicial del mínimo.

ALGORITMO DE AJUSTE

Implementamos el método mediante un programa en lenguaje QBasic versión 4.0 [13] en una PC IBM 486DX de 8 Mb de RAM y 25 MHz de velocidad.

El procesamiento de los datos se realiza en dos partes:

- i) Ajuste por alineación sucesiva
- ii) Ajuste por mínimos cuadrados no lineal.

En la figura 1 se muestra un diagrama de flujo del programa, que permite obtener los datos, desde un osciloscopio digital que registra la señal proveniente del fotomultiplicador.

El primer paso en el ajuste de la curva consiste en obtener valores aproximados de los parámetros, por el método de "peeling". Para esto, el programa muestra en pantalla la parte del oscilograma correspondiente a la relajación (luego de la supresión del campo eléctrico).

El usuario determina en forma cualitativa la parte de la curva sobre la cual predomina la componente de mayor tiempo de relajación. El programa linealiza esta parte de la curva y la ajusta por una exponencial de amplitud a_1 y tiempo de relajación a_2 . A continuación el programa resta esta exponencial de la curva experimental.

Se reitera este proceso dos veces más, hasta obtener los parámetros a_3, a_4, a_5, a_6 de las otras dos exponenciales decrecientes.

En cualquiera de estos pasos, el programa permite volver a repetir el procedimiento para obtener una mejor aproximación, por simple comparación visual.

Los parámetros obtenidos, son pasados al módulo del programa en donde se realiza el ajuste por mínimos cuadrados no lineal, que toma a estos valores como aproximaciones iniciales. En este punto, el programa calcula los elementos de la matriz Hessiana. Luego se resuelve el sistema (8) usando el método de Crout con utilización de técnicas de pivotación, y además dividiendo cada fila por el elemento maximal con el objeto de acondicionar el sistema.

La solución δ_i del sistema se suma a los valores iniciales de los parámetros a_i , obteniéndose una nueva aproximación de los mismos.

Es aquí donde el programa compara los valores del error cuadrático total actual y anterior, y guarda el menor de ellos junto con los a_i correspondientes.

El programa repite el proceso usando las nuevas aproximaciones hasta que las correcciones sean menores que un ϵ dado. El resultado que arroja son parámetros correspondientes al error cuadrático total mínimo.

En la figura (1) se muestra un diagrama de flujo del programa.

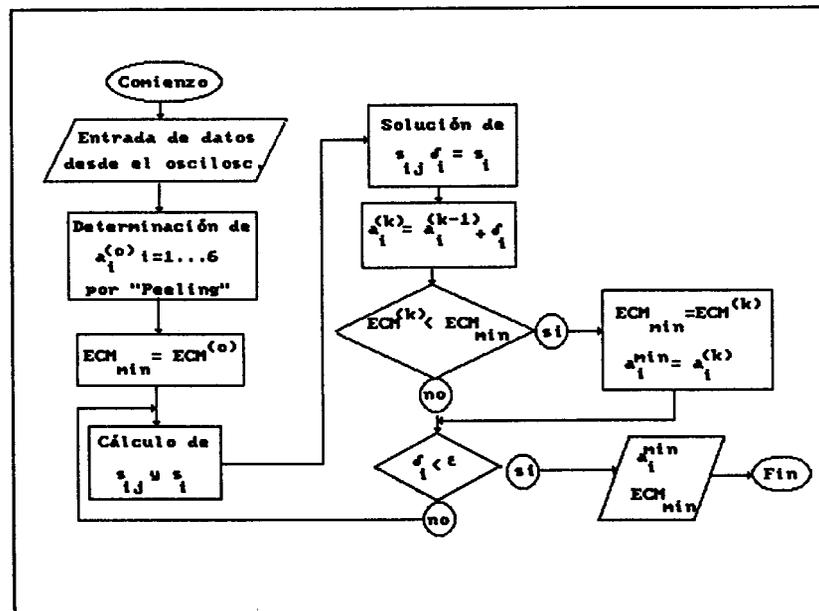


Figura 1

RESULTADOS

El dispositivo experimental para obtener los datos consta basicamente de cuatro partes:

- i) un sistema electrónico para controlar el campo eléctrico aplicado a la muestra de ADN (generador de pulsos) [14],
- ii) un sistema óptico para el análisis de la birrefringencia de la muestra (espectrofotómetro adaptado),
- iii) un sistema de detección (fotomultiplicador),
- iv) un sistema de conversión y adquisición de datos analógico-digital (osciloscopio digital de registro).

En la figura (2) se muestra el oscilograma correspondiente a la relajación de la birrefringencia de una muestra de ADN nativo de timo de ternera, con una concentración de 100 mg/dl en solución acuosa de NaCl 10^{-3} M/l, que fue sometida a un campo eléctrico de 210 V/cm durante 68 ms.

Este oscilograma consta de 627 puntos experimentales.

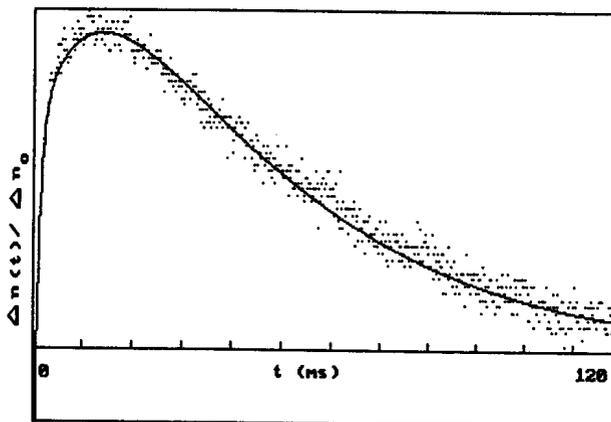


Figura 2

Esta figura también muestra el ajuste producido por el programa.

La reducción del error cuadrático total producido por el método de mínimos cuadrados no lineal respecto del método de "peeling" es del 12,9%, en este caso.

En la tabla I se resumen los parámetros y el porcentaje de mejora del error cuadrático total encontrados para ésta y otras señales obtenidas para distintos campos y concentraciones.

Las columnas rotuladas con números identifican muestras de características diferentes.

La primer fila indica el campo eléctrico (E) aplicado a la muestra, la segunda la concentración (C) de ADN en la solución. Entre la tercera y la sexta fila se encuentran los parámetros del ajuste de la curva. Los parámetros a_1 , a_2 , a_3 son las contribuciones de cada exponencial, y a_4 , a_5 son los inversos de los tiempos de relajación, que corresponden a las distintas especies presentes en la muestra. La última fila contiene el porcentaje de corrección del método de mínimos cuadrados con respecto al método de alineación sucesiva. Como puede observarse, en todos los casos se ha mejorado el ajuste, aunque no con la misma eficiencia.

Tabla I

Muestra	1	2	3
E (V/cm)	210	250	860
C (mg/dl)	100	50	50
a ₁	10.89083	11.2041	11.04973
a ₂	-22.50643	-22.97524	-22.91264
a ₃	-6.14561	-6.044902	-5.891933
a ₄	-73.04377	-68.15489	-69.04501
a ₅	-5.060729	-4.248744	-4.719481
a ₆	-585.8795	-326.9183	-369.2132
Corrección	12.9 %	8.77 %	8.36 %

Las componentes positivas y negativas de la birrefringencia, se deben a fenómenos de orientación de las cadenas de ADN débilmente curvadas que se orientan perpendicularmente al campo eléctrico aplicado [15]. Se encuentra en desarrollo la teoría física que explique la componente positiva de la birrefringencia.

REFERENCIAS

1. Fredericq E. & Houssier C., "Electric Dichroism and Electric Birefringence", Clarendon Press, Oxford, 1973.
2. O'Konski C. H. (Ed.), "Molecular Electro-Optics: Part 2, Application to Biological Molecules", Marcel Dekker, New York, 1976.
3. Dyson R. D. & Isenberg I. I., Biochemistry 10(17), 3233, 1971.
4. Jury E. I., "Theory and Applications of Z-Transform Method", Krieger, New York, 1973.
5. Bowers J. S., Prud'Homme R. K. & Farinato R. S., "An Assessment of The Padé-Laplace Method for Transient Electric Birefringence Decay Analysis", Computers Chem., Vol. 16, N°3, 249-259, 1992.
6. Rice J. R., "The Aproximation of Functions", Vol. 1, Addison-Wesley Publishing Company, Inc. Reading, Mass, 1964.
7. DeVries P. L., "A First Course in Computational Physics", John Wiley & Sons, Inc., New York, 1994.
8. Guest P. G., "Numerical Methods of Curve Fitting", Cambridge University Press, New York, 1961.
9. Dahlquist G. & Bjorck A., "Numerical Methods", Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New York, 1974.

10. Ralston A., "A First Course in Numerical Analysis", Mc-Graw-Hill, New York, 1965.
11. Ostrowski A. M., "Solution of Equations and Systems of Equations", Academic Press, Inc., New York, 1960.
12. Traub J. F., "Iterative Methods for the Solution of Equations", Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New York, 1964.
13. Microsoft Corporation, "Microsoft Quick Basic 4.0 Basic Language Reference", 1987.
14. Bertolotto J. A. y Fariás de la Torre E. M., "Generador de pulsos para aplicaciones en electro-óptica: I) campos eléctricos pequeños, II) pulsos inversos", Revista Telegráfica electrónica, 871, 218-220, 1986.
15. Porschke D. , "DNA double helice with positive electric dichroism and permanent dipole moments: Non-symmetric charge distributions and "Frozen" configurations", Biophysical Chemistry, 49, 127-139, 1994.