

LUANA APARECIDA DOS REIS

**ESTUDO DA INTERAÇÃO DNA COM O CORANTE
FLUORESCENTE DAPI UTILIZANDO A TÉCNICA DE
PINÇA ÓTICA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Física Aplicada, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2017

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

R375e
2017
Reis, Luana Aparecida dos, 1991-
Estudo da interação DNA com corante fluorescente Dapi
utilizando a técnica de pinça ótica / Luana Aparecida dos Reis. –
Viçosa, MG, 2017.
vii, 56f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndices.

Orientador: Márcio Santos Rocha.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.53-56.

1. Óptica. 2. Instrumentos ópticos. 3. DNA. 4. Corantes.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Física.
Programa de Pós-graduação em Física Aplicada. II. Título.


CDD 22 ed. 535.2

LUANA APARECIDA DOS REIS

**ESTUDO DA INTERAÇÃO DNA COM O CORANTE FLUORESCENTE DAPI
UTILIZANDO A TÉCNICA DE PINÇA ÓTICA**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Física Aplicada,
para obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

APROVADA: 23 de fevereiro de 2017.


Sérgio Luis de Abreu Mello


Marcelo Ribeiro Leite de Oliveira


Silvio da Costa Ferreira Junior


Márcio Santos Rocha
(Orientador)

“Mas isso não significa que nós não possamos contornar as limitações que nossos corpos impõem... A distância entre nós e o que desejamos superar deve ser decidida por nós mesmos, e não somente pela natureza.”

*Enki’När; O espadachim de carvão -
Affonso Solano*

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por sempre ser o meu amparo e socorro em todos os momentos ao longo desta caminhada.

À minha mãe Maria das Graças que, em todos esses anos, foi mãe e pai, que sempre me motivou e me apoiou em todas as minhas escolhas. Ao meu irmão Hugo e ao meu avô José por todo apoio e torcida. Ao meu pai Waldecy (*in memoriam*) que me ensinou muito sobre a vida.

Agradeço aos meus amigos da salinha da pós, Zé (que me aguenta desde a graduação), Ana, Bacon, Leandro, Renan, Cesar e Cacilhas, pelos momentos de estudo e descontração na hora do café. Agradeço também ao Wilder, Bruno (Coçador), Samuel, Tia Lúcia, Maria Inês, Maria Helga, Elaine, Hithiara e Sandy que de forma direta ou indireta fizeram parte de toda essa caminhada. Agradeço a Galera Top CCXP pelas conversas descompromissadas e as boas risadas. Agradeço a minha família Sentinelas da Manhã que foi o meu sustento em muitos momentos.

Agradeço ao meu orientador, professor Marcio, por todo o ensinamento, ajuda, paciência e por ser para mim um exemplo de profissional. Aos colegas de laboratório, Eduardo, Carlos, Bruno, Tiago e Wilson por todas as discussões e auxílio com os experimentos. E em especial ao Fabiano e a Raniella, que não fazem mais parte do grupo de pesquisa, mas que sempre me ajudaram.

Agradeço às agências de fomento: CAPES, FAPEMIG e CNPq pela concessão da bolsa de estudos e pelo financiamento da estrutura do laboratório de Física Biológica.

Sumário

Resumo	vi
Abstract	vii
1 Introdução	1
2 A molécula de DNA	3
2.1 Um breve histórico e a Estrutura do DNA	3
2.1.1 Tipos de DNA	5
2.1.2 O λ -DNA	6
2.2 Propriedades mecânicas: DNA como polímero	7
2.3 Interação DNA – ligante	7
2.3.1 Ligação de fenda	8
2.3.2 Intercalação	8
2.4 Equilíbrio químico na interação DNA – ligante	9
2.4.1 McGhee e von Hippel	10
3 A pinça óptica	11
3.1 Noções Históricas	11
3.2 Princípio de Funcionamento	11
4 Uso da pinça óptica na caracterização da interação do complexo DNA-DAPI	16
4.1 DAPI	16
4.2 Montagem da Pinça Óptica	17
4.3 Preparação de Amostras	18
4.3.1 Construção do porta-amostra	18
4.3.2 Preparação da amostra de DNA	19
4.4 Procedimento Experimental	19
5 Resultados e Discussões	23
5.1 Propriedades mecânicas em função da concentração de DAPI	23
5.2 Parâmetros físico-químicos da interação	27

6 Conclusões e Perspectivas	31
Apêndice A Mecânica de Polímeros	32
Apêndice B McGhee - von Hippel, Modelo de Exclusão de Vizinhos	40
Apêndice C Artigo Publicado	44
Referências Bibliográficas	56

Resumo

REIS, Luana Aparecida dos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2017.
Estudo da interação do DNA com o corante fluorescente DAPI utilizando a técnica de pinça óptica. Orientador: Márcio Santos Rocha

Neste trabalho estudamos a interação do DNA com o corante DAPI em solução com alta (PBS 174 mM) e baixa (PBS 34 mM) força iônica. Para esse estudo utilizamos a técnica experimental de pinçamento óptico. Na primeira parte do experimento extraímos os parâmetros mecânicos da interação (comprimentos de persistência e contorno) em função da concentração total de ligante na solução. Com esses parâmetros mecânicos fazemos uma conexão entre essas propriedades e as propriedades físico-químicas do complexo formado através da isoterma de ligação proposta por McGhee - von Hippel, utilizando modelos desenvolvidos recentemente. Através dessa análise identificamos dois modos de ligação para o DAPI e o DNA, a ligação de fenda menor, que ocorre em baixas concentrações de corante e a intercalação, que ocorre em altas concentrações de corante.

Abstract

REIS, Luana Aparecida dos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2017.
Study of DNA interaction with DAPI fluorescent dye using an optical tweezers technique. Adviser: Márcio Santos Rocha.

In this work we studied the DAPI dye-DNA interaction in high (PBS 174 mM) and low (PBS 34 mM) ionic strength solutions. To perform this task, we used the optical tweezers experimental technique. In the first part of the experiment, we extracted the interaction's mechanical parameters (persistence and contour lengths) as a function of the total ligand concentration in the solution. With these mechanical parameters we made a connection between these properties and the physicochemical properties of the complex formed by the binding isotherm proposed by McGhee-von Hippel, using recently developed models. From such analysis, we identified two DAPI dye-DNA binding modes, namely, the minor groove binding, which occurs at low dye concentrations, and intercalation, which occurs at high dye concentrations.

Capítulo 1

Introdução

Estudar a interação do DNA com ligantes, que podem ser fármacos, proteínas ou corantes é de grande importância, pois com essa análise conseguimos entender e avaliar o que ocorre com ele em diversos processos que ocorrem no meio intracelular ou *in vitro*. Além disso, podemos entender o mecanismo de ação de fármacos usados em quimioterapias e outros tratamentos de doenças humanas. Esse estudo pode ser feito por muitos métodos. Para este trabalho, utilizamos o método de pinçamento óptico.

A pinça óptica foi descoberta em 1969 por Arthur Ashkin e colaboradores nos laboratórios Bell, nos Estados Unidos, consiste em um método de micromanipulação e é formada, nas configurações mais modernas, por um microscópio e um laser [1]. A objetiva do microscópio é responsável por focalizar o feixe de luz, gerando assim um poço de potencial, que consegue aprisionar pequenas partículas dielétricas na região focal da objetiva. Utilizamos esse aparato experimental para realizar estiramentos na molécula de DNA e obtermos um gráfico de força por extensão do DNA.

Com a análise do estiramento da molécula de DNA por esse gráfico de força por extensão obtemos os parâmetros mecânicos de interesse em nosso trabalho, que são: comprimento de contorno (L) e de persistência (A). O primeiro é o comprimento da molécula esticada, sem danos, de uma ponta a outra, que dá uma ideia direta do tamanho linear da molécula de DNA. Já o segundo está ligado à medida de rigidez da mesma. Quanto maior o comprimento de persistência, mais rígida é a molécula e mais difícil de ser dobrada ela é e quanto menor o comprimento de persistência mais maleável é a molécula. Dos parâmetros mecânicos extraídos podemos fazer uma conexão entre as propriedades mecânicas e físico-químicas do sistema utilizando uma isoterma de ligação, que nesse trabalho foi a de McGhee-von Hippel [2]. Uma isoterma de ligação consiste em uma equação que descrevem experimentos realizados a temperatura constante. Com uma equação desse tipo podemos extrair também parâmetros físico-químico de interesse para a ligação e que podem variar com a temperatura. Além disso, como discutiremos adiante, este tipo de análise permite inferir sobre os possíveis modos de ligação entre o ligante e a molécula de DNA.

Nesse trabalho estudamos como as propriedades mecânicas do DNA são alteradas quando ele interage com o corante DAPI (4',6 - *diamidino* - 2 - *fenilindol*), que é um

corante sintético catiônico divalente (2+). O interesse no estudo desse corante se deve ao fato de que, mesmo sendo um corante muito utilizado em técnica de microscopia de fluorescência, tanto no estudo de células como no de DNA, sua interação com o DNA possui algumas peculiaridades, e portanto, vários resultados contraditórios ainda são encontrados na literatura. [3–5]

Nossos experimentos foram realizados com duas soluções salinas contendo forças iônicas diferentes, porém com mesmo pH. Nosso interesse é entender como as propriedades mecânicas e físico-químicas do complexo DNA-DAPI são afetadas quando este se encontra um ambiente com mais ou menos íons.

Esta dissertação contém seis capítulos. No capítulo 2, apresentamos a molécula de DNA com suas principais características e a sua estrutura, discutimos algumas formas de interação entre DNA e ligantes e apresentamos isoterma de ligação do modelo de McGhee – von Hippel. No capítulo 3 apresentamos a técnica utilizadas em nossos experimento, a pinça óptica, discutimos os aspectos gerais sobre o seu principio de funcionamento. No capítulo 4 apresentamos a molécula de ligante estudada e toda a metodologia experimental utilizada na caracterização do complexo DNA-DAPI. No capítulo 5 são apresentados e discutidos os dados experimentais obtidos, variando a concentração de ligante e a força iônica. Por fim, no capítulo 6 relatamos as conclusões obtidas.

Capítulo 2

A molécula de DNA

Neste capítulo abordaremos tanto os aspectos biológicos da molécula de DNA como uma modelagem matemática, baseada na mecânica de polímeros. Introduziremos também algumas formas e características da interação entre o DNA e alguns ligantes.

2.1 Um breve histórico e a Estrutura do DNA

Após os trabalhos do monge Gregor J. Mendel sobre a hereditariedade, no século XIX, houve uma grande preocupação em determinar qual parte da célula carregava a nossa memória genética. Naquela época acreditava-se que eram as proteínas, devido a sua grande variedade, mas, em 1869 que o fisiologista e químico suíço Johann Friedrich Miescher conseguiu isolar o material genético de leucócitos, que são células brancas presente no sangue. A esse material ele deu o nome de nucleína, uma vez que foi retirada do núcleo das células [6].

Em 1950, Erwin Chargaff deu uma importante contribuição para os estudos da molécula de DNA. Estudando uma grande variedade de organismos ele elaborou algumas regras sobre a quantidade de bases nitrogenadas existente na molécula de DNA. Baseado nos experimentos de difração de Raio X feitos por Rosalind Franklin e nos estudos de Chargaff, em 1953, o geneticista americano, James Watson e o físico britânico, Francis Crick propuseram um modelo para a estrutura do DNA. Nesse modelo Watson e Crick mostravam que o DNA é uma dupla hélice. A descoberta os levou ao prêmio Nobel de medicina pela descoberta em 1962 [7,8].

O DNA é uma molécula formada por quatro nucleotídeos básicos. Cada nucleotídeo possui um grupo fosfato (PO_4^-), um açúcar do tipo pentose (no caso do DNA é a desoxirribose) e uma base nitrogenada, que pode ser a adenina (A), a timina (T), a citosina (C) ou a guanina (G). É estas bases nitrogenadas são o que diferenciam os nucleotídeos entre si. As bases nitrogenadas são ligadas ao carbono 1' da pentose e o grupo fosfato é ligado ao carbono 5', como mostrado na figura 2.1 [8].

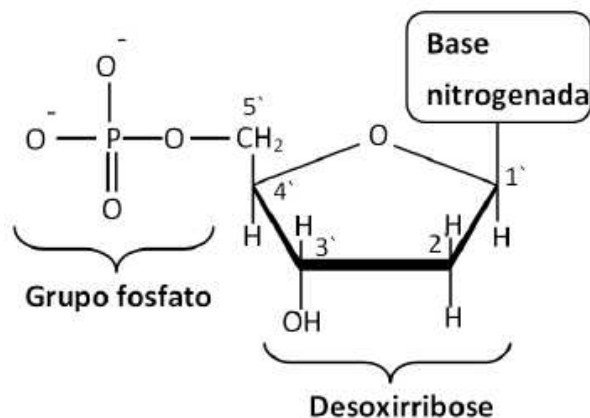


Figura 2.1: Constituição de um nucleotídeo: Grupo fosfato, desoxirribose e base nitrogenada. [9]

As bases nitrogenadas possuem estruturas químicas diferentes, porém a adenina e a guanina são semelhantes em sua estrutura química, por isso, são chamadas de purinas, tendo dois anéis em sua estrutura. Já a timina e a citosina, que também são semelhantes, possuem apenas um anel e são estruturas conhecidas como pirimidinas, como vemos na figura 2.2

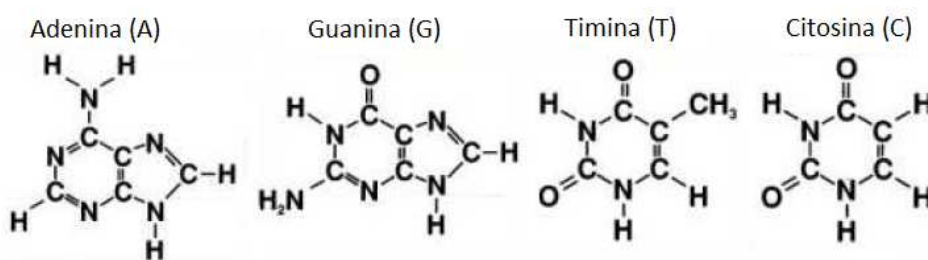


Figura 2.2: Estrutura de anéis das bases nitrogenadas. [10]

Para que uma fita da molécula de DNA seja formada, cada nucleotídeo deve se ligar uns aos outros. Essa ligação se dá entre o grupo fosfato e o grupo hidroxila do carbono 3' do nucleotídeo adjacente por meio de uma ligação fosfodiéster. É importante salientar que a fita de DNA tem a mesma orientação relativa. Por exemplo, se o carbono 5' da pentose do primeiro nucleotídeo estiver voltado para cima todos nucleotídeos da cadeia terão a mesma orientação. Dessa forma a direção da cadeia é definida como sendo 5' → 3' [8].

As regras básicas sobre a quantidade de cada nucleotídeo no DNA desenvolvidas por Chargaff de forma empírica são:

1. A quantidade total de pirimidinas é igual à quantidade total de purinas, ou seja, $T+C = A+G$.
2. A quantidade total de timina, T, ao longo da cadeia de DNA é sempre igual à

quantidade total de adenina, A, e a quantidade total de guanina, G, é sempre igual a quantidade total de citosina, C.

Dessa forma sempre temos a mesma quantidade de purinas e pirimidinas no DNA. É importante salientar que a quantidade AT e CG não é a mesma, variando de espécie para espécie.

A dupla hélice é formada pela união de duas fitas antiparalelas, uma com direção $5' \rightarrow 3'$ e outra com direção $3' \rightarrow 5'$, as fitas são ligadas através das bases nitrogenadas por meio de ligações de hidrogênio, que são ligações relativamente fracas, o que é de extrema importância para a replicação do DNA. As pontes de hidrogênio ocorrem sempre entre uma purina e uma pirimidina, sendo que G pareia-se sempre com C através de três pontes de hidrogênio, e A sempre se pareia com T através de duas pontes de hidrogênio. Como os pares AT e GC tem aproximadamente o mesmo tamanho, isso permite uma uniformidade ao longo da molécula de DNA. Ao longo da fita existem cavidades desiguais que são denominadas fenda maior ou fenda menor. Na cavidade maior as bases estão mais expostas ao meio. Dessa forma moléculas que interagem com sequências específicas de bases podem identificar essas sequências sem romper a estrutura da dupla hélice. Na figura 2.3, podemos ver a fita formada entre os fosfatos e a desoxirribose e a dupla hélice.

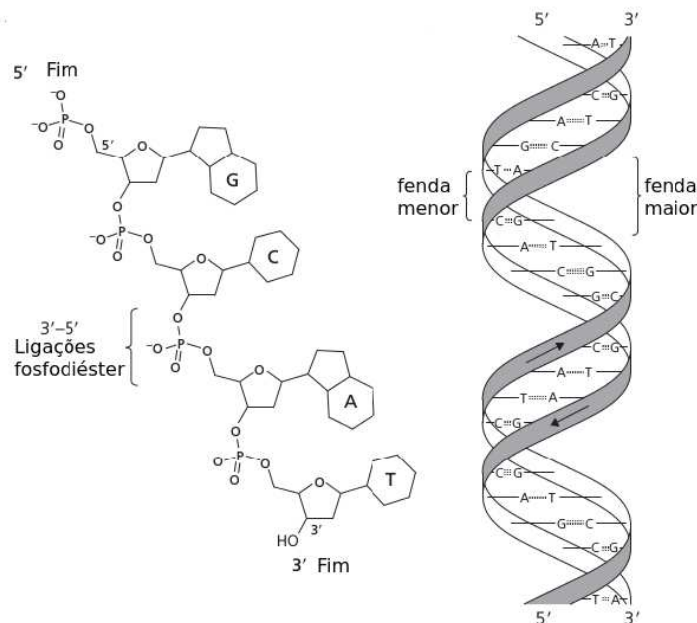


Figura 2.3: Estrutura do DNA. Fita simples e dupla hélice. [9]

2.1.1 Tipos de DNA

O DNA pode assumir diferentes conformações dependendo do meio onde se encontra. Na natureza existem três tipos de conformação para o DNA: DNA tipo B, tipo A e tipo Z [8], como podemos ver na figura 2.4

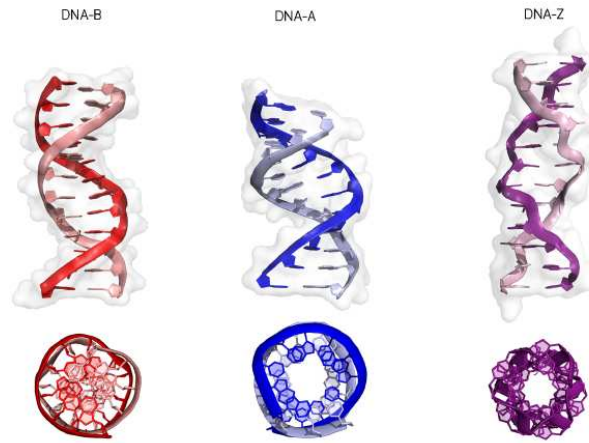


Figura 2.4: Estrutura do DNA. Fita simples e dupla hélice [9].

O DNA tipo B é a forma mais abundante encontrada nas células. Possui as seguintes características: O giro da dupla hélice é para a direita com uma rotação entre os pares de base adjacentes de $34,6^\circ$, então, a cada 10 pares de base, mais ou menos, a hélice dá uma volta completa; a distância média entre os pares de base é de 0,33 nm; o diâmetro da dupla hélice é de aproximadamente 2,37 nm.

O DNA tipo A em contraste com a forma B, possui uma distância entre os pares de base de aproximadamente 0,26 nm e um diâmetro de 2,55 nm, isso faz com que sua cavidade maior seja mais estreita e profunda, e a cavidade menor mais larga e rasa. O DNA do tipo A, assim como o tipo B possui uma rotação para a direita, mas com 11 pares de base a cada volta completa. Esse DNA não é encontrado em condições fisiológicas.

O DNA tipo Z é mais longo e fino que o tipo B, ele possui uma distância média entre os pares de base de 0,456 nm e um diâmetro de aproximadamente 1,84 nm, isso faz com que sua cavidade maior praticamente desapareça e a menor torne-se muito profunda. Uma volta completa da molécula de DNA do tipo Z completa uma volta da dupla hélice a cada 12 pares de base, em contraste com as formas A e B que possuem um giro da dupla hélice para a direita, a forma Z possui um giro para a esquerda.

Existem ainda na natureza organismos ainda mais simples que possuem DNA de fita simples, como é o caso de alguns vírus animais, vegetais e bacteriófagos [8].

2.1.2 O λ -DNA

Em nossos experimentos, o DNA usado é o do fago λ , um vírus que infecta a bactéria *E. coli*. Ele é um DNA do tipo B. Este DNA é ideal para os experimentos de estiramento, devido ao seu tamanho. Uma molécula de λ -DNA possui aproximadamente 48.500 pares de base, o que resulta em um comprimento médio de 16,5 μm [11, 12].

2.2 Propriedades mecânicas: DNA como polímero

Polímeros são cadeias formadas por subunidades, os monômeros, ligadas umas as outras. Essas subunidades não precisam ser idênticas e são de grande importância para a Física Biológica, visto que, o DNA é um polímero biológico semi-flexível, constituído por quatro monômeros básicos que são os seus nucleotídeos.

No estudo da mecânica de polímeros, existem duas propriedades que são de extrema importância pra nossos experimentos, que são o comprimento de contorno, L , e o comprimento de persistência, A . O comprimento de contorno, L , é o comprimento do polímero, sem danos, de uma ponta a outra (tamanho linear). Já o comprimento de persistência, A , está diretamente ligado à rigidez do polímero, podendo ser entendido como a distância média entre duas dobras consecutivas ao longo da cadeia polimérica, ou seja, quanto maior o comprimento de persistência mais rígido é o polímero e vice - versa.

Nesta seção apresentaremos apenas a equação de Marko e Siggia para estiramentos arbitrários [13]. No apêndice 6 fazemos a dedução de alguns modelos matemáticos de mecânica de polímeros até chegarmos na expressão utilizada para análise de nossos experimentos.

O modelo WLC (Worm-Like Chain) é um modelo derivado da física de polímeros. Esse modelo tem sido, nos últimos anos, o padrão para a análise de experimento de estiramento da molécula de DNA. Ele descreve, de maneira satisfatória, o comportamento elástico de polímeros semi-flexíveis, dentro do regime entrópico ($\sim 5pN$).

Em 1995 Marko e Siggia [13] resolveram o modelo analiticamente e obtiveram uma expressão aproximada para a força em função da extensão do polímero para a força entrópica da molécula de DNA em função da extensão,

$$F = \frac{k_B T}{A} \left[\frac{z}{L} + \frac{1}{4 \left(1 - \frac{z}{L}\right)^2} - \frac{1}{4} \right] \quad (2.1)$$

Vale a pena ressaltar que, apesar de ser válida para estiramentos arbitrários, a equação 2.1 é uma expressão aproximada. A expressão diverge em $z = L$. Além disso, ela é válida apenas no chamado regime entrópico, isto é, quando as forças aplicadas não são suficientemente grandes para romper as ligações químicas entre os nucleotídeos.

2.3 Interação DNA – ligante

É dado o nome de ligante à todas as substâncias químicas que interagem com o DNA, podendo ser, proteínas, enzimas, fármacos, corantes entre outras. Essas interações podem ocorrer de diversas maneiras, dependendo da estrutura química do ligante e das condições da solução onde as moléculas se encontram. Abaixo veremos dois tipos de ligações que podem ocorrer entre a molécula de DNA e o ligante.

2.3.1 Ligação de fenda

Alguns ligantes tem uma preferência por se ligar à molécula de DNA eletrostaticamente. Nesse grupo de ligantes existem aqueles que exibem uma preferência em ligar-se a fenda maior ou menor do DNA. Esse tipo de composto pode interagir por forças de Van der Waals e ligações de hidrogênio, além das interações puramente eletrostáticas. Moléculas como o Distamicina A e o antibiótico Netropsin, são exemplos de moléculas que se ligam a fenda menor do DNA em regiões ricas em AT, já o peptídeo α -Hélice interage com o DNA por meio de uma ligação de fenda maior [11]. Existem ainda moléculas que são tanto ligantes de fenda como intercalantes, que é o caso do HOECHST 33258 [14], do Berenil e dos corantes YO e YOYO [11]. Vemos na figura 2.5, a representação de uma molécula de Distamicina ligada a fenda de uma molécula de DNA.

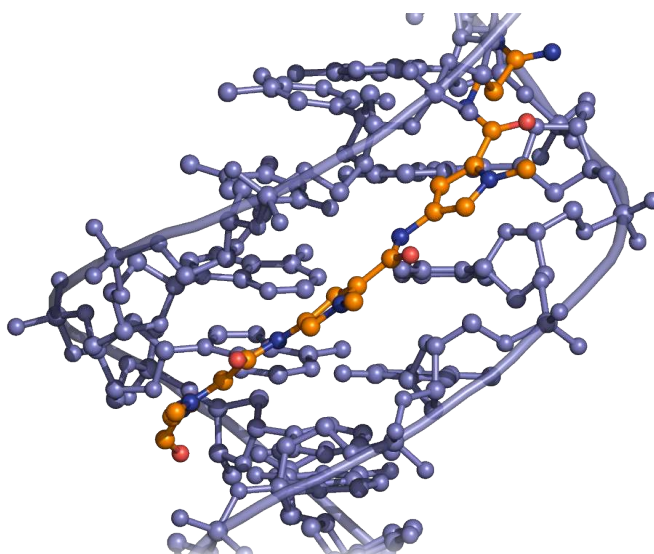


Figura 2.5: Representação de uma molécula ligada a fenda do DNA. Extraída do site <http://www.atdbio.com/content/16/Nucleic-acid-drug-interactions>

2.3.2 Intercalação

Na intercalação, as moléculas do fármaco encaixam-se entre os pares de base da molécula de DNA, ficando “empilhadas” dentro do DNA, esse “empilhamento” se dá via interação com os orbitais- π destes pares de base, algumas vezes essas ligações podem ser combinadas com ligações de hidrogênio. Devido a esta interação o DNA sofre algumas modificações em sua estrutura. Por exemplo, o comprimento de contorno aumenta, já que agora passamos a ter moléculas de ligante entre os pares de base. Esse aumento do comprimento de contorno é seguido por um giro da dupla hélice de forma a desfazê-la. Algumas moléculas como a Daunomicina e a Doxorrubicina e o corante Brometo de Etídio (EtBr) [11], são moléculas intercalantes típicas. Vemos na figura 2.6 a representação de uma molécula de EtBr intercalada entre os pares de base de molécula de DNA.

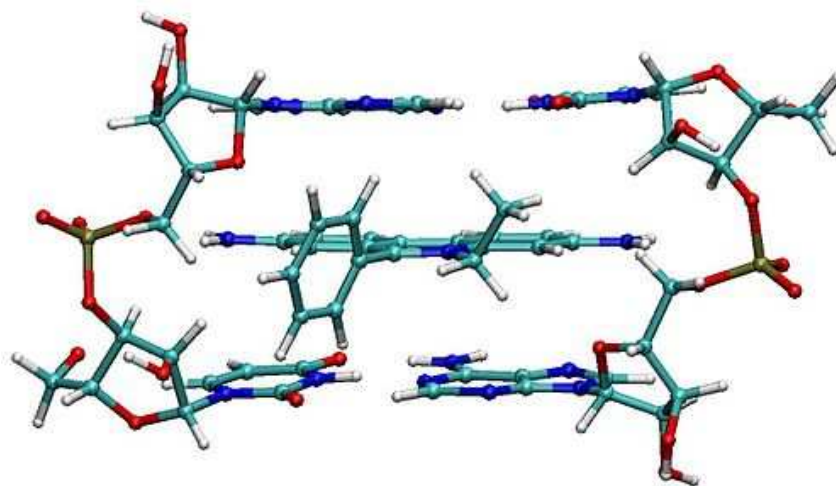


Figura 2.6: Representação de uma moléculas intercaladas entre os pares de base do DNA [9].

2.4 Equilíbrio químico na interação DNA – ligante

O equilíbrio químico de uma reação ocorre quando não há mais troca líquida de moléculas entre as partições distintas do sistema, ou seja, o número médio de moléculas nas partições permanece constante.

No nosso trabalho, a molécula de DNA e a solução na qual ela se encontra são as nossas partições do sistema, neste sistema as moléculas de ligantes podem estar livres em solução ou ligadas ao DNA. Nosso interesse em investigar o equilíbrio químico do complexo DNA-ligante se deve ao fato de que ele pode ser representado por uma isoterma de ligação, que está intimamente ligada as mudanças nas propriedades mecânicas do complexo DNA-ligante.

Para nosso problema consideraremos duas moléculas A e B que quando associadas resultam na molécula C . Podemos representar o mecanismo dessa reação química na forma,



onde K_i e K_d são, respectivamente, as constantes de ligação intrínseca de equilíbrio da associação e dissociação.

K_i e K_d são definidas em termos da concentração molar das substâncias envolvidas da seguinte forma:

$$K_i = \frac{[C]}{[A][B]} \quad (2.3)$$

e

$$K_d = \frac{[A][B]}{[C]} = K_i^{-1} \quad (2.4)$$

Renomeamos agora os termos para tratarmos do caso do complexo DNA-ligante. Definimos, $[A] \equiv C_f$, como sendo a concentração de ligantes livres em solução e $[C] \equiv C_b$, como sendo a concentração de ligantes ligados ao DNA, ou seja, o resultado da reação e $[B] \equiv C_{bp} - C_b$ como sendo a concentração de sítios livres ligáveis na molécula de DNA, onde C_{bp} é a concentração total de pares de base, que é constante.

Definimos agora a quantidade r como sendo a fração de sítios ligados, escrita como:

$$r = \frac{C_b}{C_{bp}} \quad (2.5)$$

Uma isoterma de ligação relaciona a fração de sítios ligados, (r), com a concentração de ligantes livres, (C_f).

2.4.1 McGhee e von Hippel

McGhee e von Hippel propuseram em 1974, um modelo que se dedicava a analisar, de maneira mais rigorosa, os detalhes da interação da molécula de DNA com ligantes que ocupavam mais de um par de base. Nesse modelo é contabilizado o tamanho do ligante pela introdução do parâmetro de exclusão N , que é o número de pares de base que um ligante ocupa, efetivamente, quando se liga ao DNA [2].

A isoterma de ligação do modelo de exclusão de vizinhos, que será demonstrada no apêndice 6, é dada por:

$$\frac{r}{C_f} = K(1 - Nr) \left[\frac{1 - Nr}{1 - (N - 1)r} \right]^{N-1} \quad (2.6)$$

A grande importância desse modelo está no fato dele levar em conta o tamanho do ligante e os efeitos relacionados a este fato. Essa característica é de extrema relevância para o estudo de ligantes que interagem com o DNA por meio da intercalação.

Capítulo 3

A pinça óptica

Neste capítulo abordaremos algumas noções históricas sobre o desenvolvimento da pinça óptica e introduziremos os aspectos gerais do funcionamento de uma pinça óptica.

3.1 Noções Históricas

Desde muito tempo discutia-se se a luz poderia exercer forças sobre objetos nos quais ela incide, mas foi no século XIX, com o desenvolvimento da teoria eletromagnética, por James Clerk Maxwell, onde demonstrou-se, de fato, que a luz pode exercer força sobre os objetos nos quais ela incide, uma vez que ela transfere momento para este.

Nos anos 1960 Arthur Ashkin [1], trabalhando com dois feixes de laser, simultaneamente, iniciou experimentos em que ele poderia mover partículas com um tamanho da ordem de micrômetros [15, 16]. Esses experimentos abriram portas para que em 1986 Ashkin, juntamente com colaboradores, passassem um feixe de laser pela lente de uma objetiva, com alta abertura numérica, e mostrarem um aparato experimental capaz de aprisionar partículas dielétricas [17, 18], da ordem de $25nm$ a $10\mu m$, na região focal da objetiva.

3.2 Princípio de Funcionamento

Como mencionado anteriormente, é devido ao fato de que a luz é capaz de transferir momento para o objeto (que trataremos como uma microesfera) no qual ela está incidindo que ocorre o fenômeno de pinçamento óptico. Podemos estimar a ordem de grandeza das forças envolvidas no pinçamento óptico, uma vez que é de nosso conhecimento que um fóton possui momento linear dado por:

$$\vec{p} = \hbar \vec{k} \quad (3.1)$$

onde \hbar é a constante de Planck h dividida por 2π e \vec{k} é o vetor de onda do fóton, que possui módulo, $k = \omega/c$, onde ω é a frequência angular da luz incidente e c é a velocidade

da luz.

Como a energia de um fóton é dada por:

$$E = \hbar\omega \quad (3.2)$$

podemos escrever o módulo do momento como:

$$p = \hbar k = \hbar \frac{\omega}{c} = \frac{E}{c} \quad (3.3)$$

Para N fótons, temos uma energia total que é dada por, $E_{tot} = N\hbar\omega = NE$.

Sabemos, da 2ª Lei de Newton, que a força é dada pela variação de momento, podemos, então, calcular a força exercida por um feixe de laser com N fótons incidindo sobre uma microesfera utilizando a equação 3.3, temos,

$$F = \frac{dp}{dt} = \frac{d}{dt} \left(\frac{E_{tot}}{c} \right) = \frac{P_{tot}}{c} \quad (3.4)$$

onde P_{tot} é a potência total do feixe incidente.

A partir da equação 3.4 podemos estimar o módulo da força total exercida pela pinça óptica, já que o feixe de laser utilizado para o pinçamento tem uma potência da ordem de mW (miliWatts).

$$F_{tot} \approx \frac{1 \times 10^{-3}W}{3 \times 10^8 m/s} \approx 10^{-11} pN = 10pN \quad (3.5)$$

Obtemos uma força com magnitude da ordem de pico-Newtons.

Agora que sabemos qual o módulo da força que um feixe de luz com uma determinada potência é capaz de produzir, analisaremos como essa força atua em uma microesfera dielétrica, podemos assim entender qualitativamente o princípio de funcionamento do pinçamento óptico.

Existem dois tipos de forças ópticas que atuam na microesfera, uma é a pressão de radiação e a outra é devido à refração da luz. A pressão de radiação ocorre quando a luz é refletida ou absorvida ao incidir na interface entre dois meios, ou seja, a contribuição da reflexão para a força total do feixe está na pressão de radiação. E a outra ocorre quando a luz sofre refração por esse meio, esta exige que o índice de refração do meio seja menor que o índice de refração da microesfera e que o feixe de laser seja fortemente focalizado. A origem deste tipo de força está no fato de que o momento linear total do sistema isolado raio-microesfera tem que ser o mesmo antes e depois da refração. Quando um raio de luz é refratado pela microesfera, é desviado de sua trajetória, o raio refratado terá seu momento linear com uma direção diferente da do raio incidente. Pela 2ª Lei de Newton, a microesfera terá uma variação de momento contrária à variação de momento do raio de luz. Os raios refratados deste feixe de luz exercerão sobre a esfera uma força de gradiente. A competição entre essas duas forças, pressão de radiação e força de gradiente, dá origem

ao pinçamento óptico.

Em nosso trabalho o raio da microesfera é muito maior que o comprimento de onda da luz incidente ($a \gg \lambda$), ou seja, trabalhamos no regime da óptica geométrica, além disso usamos uma pinça óptica usual, em que o feixe de luz é focalizado e tem perfil de intensidade gaussiano.

Para analisarmos a pressão de radiação, observamos a figura 3.1, nela vemos dois raios, (1) e (2), saindo das extremidades opostas do feixe, incidindo na microesfera e sendo refletidos por sua superfície. Devido à reflexão ambos os raios exercem força sobre a microesfera, o raio (1) quando refletido na superfície da microesfera exerce uma força \vec{F}_1 sobre a microesfera e o raio (2) exerce uma força \vec{F}_2 . A força resultante, nesse caso, tende a empurrar a microesfera na direção de propagação do feixe e para fora do foco do feixe de laser.

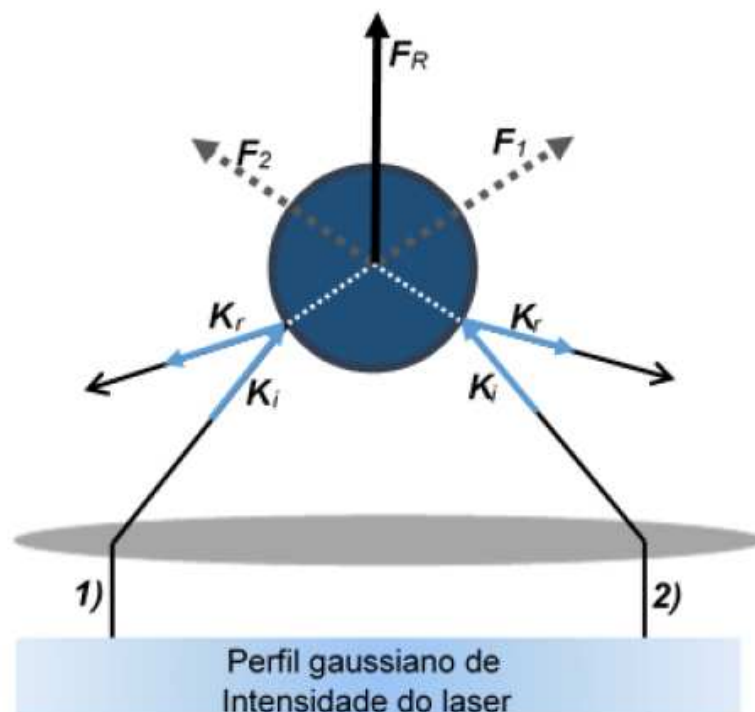


Figura 3.1: Pressão de radiação. Reflexão sofrida pela luz na superfície da microesfera. [9]

Para analisarmos agora a força de gradiente para duas situações, uma onde a microesfera se encontra abaixo e outra onde ela se encontra acima do foco. A figura 3.2, mostra o raio (2), que sai do centro do feixe, sendo desviado de sua trajetória original, sofrendo, portanto uma variação em seu momento, pela lei de conservação do momento linear, o momento total do sistema microesfera e raio de luz deve ser conservado, então, a microesfera sofrerá também uma variação no seu momento de mesmo módulo, mas sentido contrário, o que provoca o surgimento de uma força \vec{F}_2 sobre ela. O mesmo acontece com o raio (1), que sai de uma das extremidades do feixe, fazendo surgir a força \vec{F}_1 . Mas como o perfil de intensidade do feixe de laser é gaussiano, a intensidade do raio (2) é maior que a do

raio (1), então a força \vec{F}_2 será maior que a força \vec{F}_1 , portanto a força resultante empurrará para cima a microesfera, ou seja, para o foco do feixe de laser.

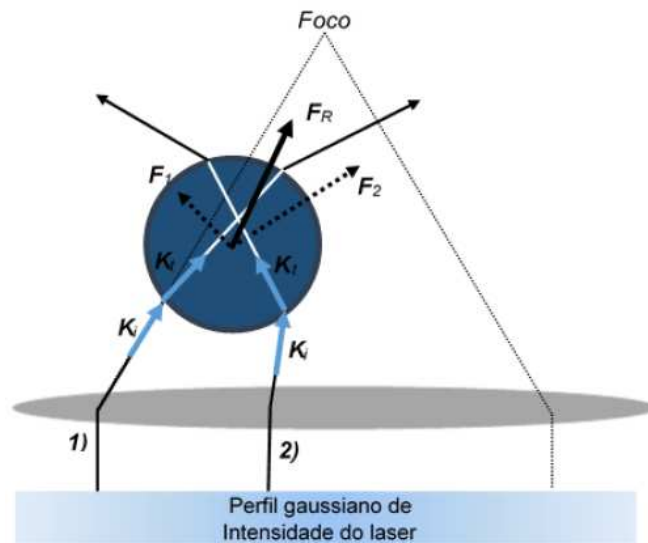


Figura 3.2: Refração sofrida pela luz na microesfera. Microesfera antes do foco. [9]

Na figura 3.3, vemos os dois raios (1) e (2) saindo cada um de uma extremidade do feixe e encontram a microesfera depois do foco, e como na situação apresentada anteriormente surgirão forças, \vec{F}_1 e \vec{F}_2 , respectivamente, de maneira que o momento linear total do sistema seja conservado. Mas neste caso a resultante dessas forças puxará para baixo a microesfera, ou seja, para o foco do feixe de laser.

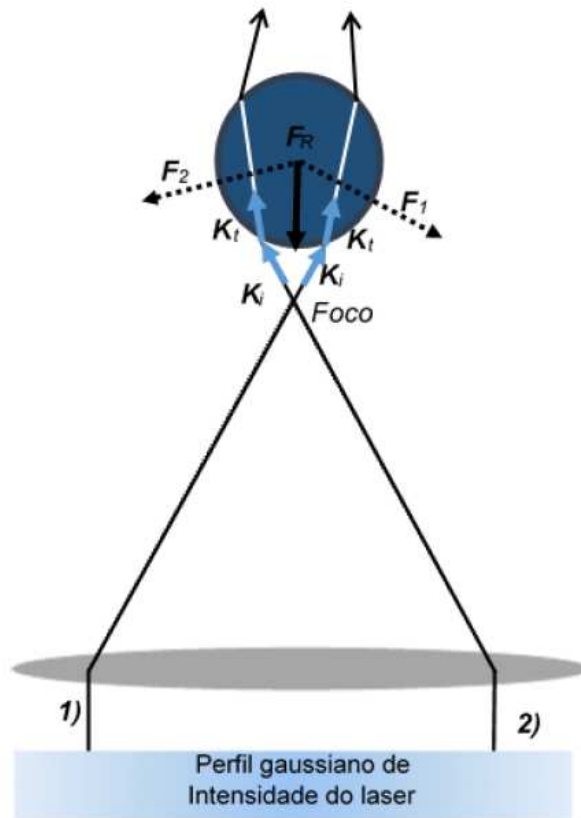


Figura 3.3: Refração sofrida pela luz na microesfera. Microesfera depois do foco. [9]

Toda a nossa análise foi feita usando a óptica geométrica, mas existem ainda outras teorias que abordam os princípios envolvidos no aprisionamentos de partículas. Podemos citar a Teoria de Rayleigh, válida para partículas com raios muito menores que o comprimento de onda da luz incidente ($a \ll \lambda$). Nesse caso, a partícula se comporta como um dipolo elétrico em um campo elétrico e a força que atua na partícula é proporcional ao gradiente da intensidade do campo elétrico da radiação incidente. Aqui, assim como na situação onde ($a \gg \lambda$) a força tende a deslocar a microesfera para o foco da objetiva, já que essa é a região de maior intensidade do campo elétrico [11, 19]. Temos também a Teoria MDSA (Mie Debye Spherical Aberration), proposta por A.Mazolli, P. A. Maia Neto e H.M. Nussenzveig, da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Essa teoria é a mais geral sobre pinças ópticas, sendo capaz de prever a força do laser sobre uma microesfera de raio e índice de refração arbitrários [20, 21].

Capítulo 4

Uso da pinça óptica na caracterização da interação do complexo DNA-DAPI

Neste capítulo apresentaremos o ligante utilizado em nosso trabalho, DAPI, e uma descrição de como nosso experimento é realizado, descrevendo a preparação do porta-amostra e das amostras de DNA, assim também como o procedimento para extrair os parâmetros mecânicos de interesse.

4.1 DAPI

O DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) é um marcador fluorescente sintético, muito utilizado para marcar células vivas e DNA em experimentos de microscopia de fluorescência. Alguns trabalhos anteriores relatam que essa molécula se liga preferencialmente à fenda menor do DNA em regiões ricas em AT, porém o DAPI pode exibir diferentes formas de ligação com o DNA, incluindo a intercalação em regiões ricas em CG, dependendo da sequência do DNA e das condições onde ele se encontra [3–5, 22].

O DAPI foi sintetizado pela primeira vez em 1971, como parte de uma pesquisa no tratamento de tripanossomíase, mas não foi bem sucedida como droga. Após outras investigações foi notada uma forte ligação com o DNA e um aumento na fluorescência, cerca de 20 vezes mais do que o DNA sozinho. Esse aumento na fluorescência fez com que o DAPI fosse amplamente usado em microscopia de fluorescência. O DAPI quando ligado ao DNA possui sua faixa de absorção no ultravioleta e a de emissão no azul [23].

Na figura 4.1, vemos a estrutura do DAPI, ela possui uma carga positiva em cada uma das suas extremidades, ou seja, é um cátion divalente.

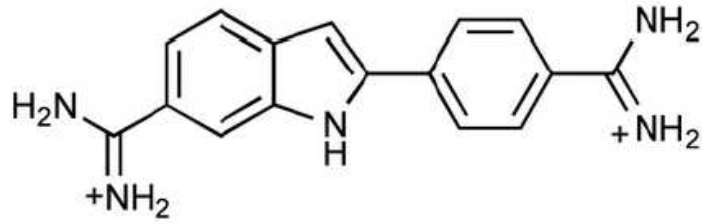


Figura 4.1: Estrutura química de um cátion de DAPI

4.2 Montagem da Pinça Óptica

Na figura 4.2 vemos o esquema da montagem experimental a usada em nossos experimentos.

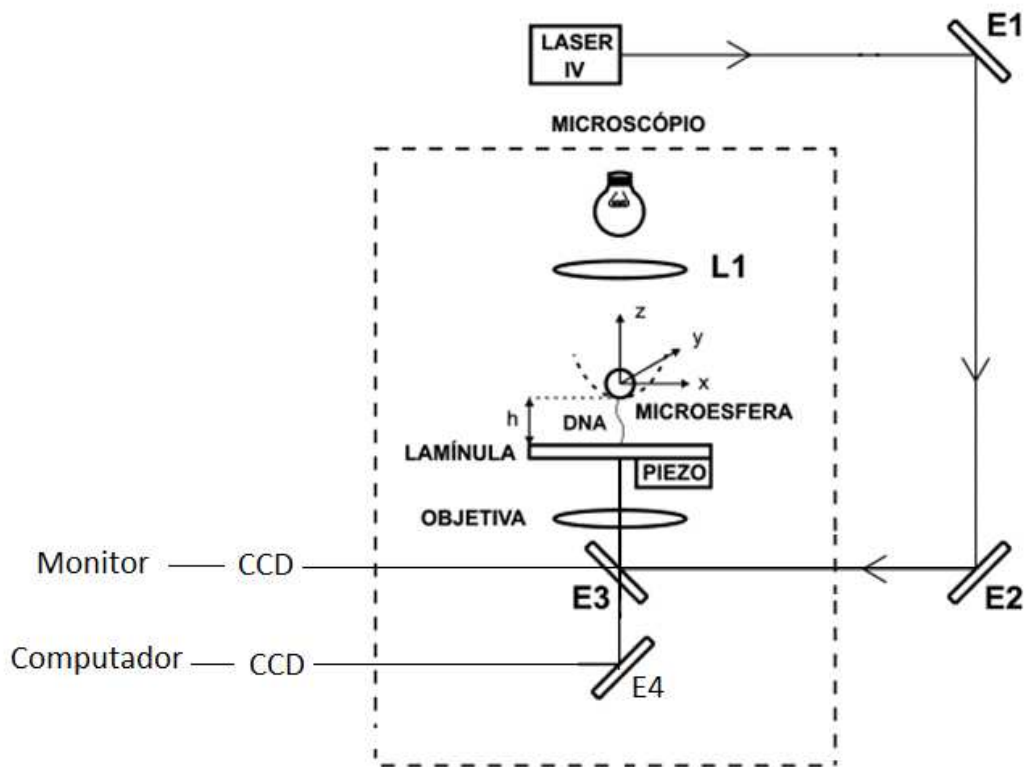


Figura 4.2: Montagem experimental utilizada.

Para nossos experimentos usamos um laser infravermelho, modelo IPG Photonics YLR-5-1064-LP, que emite um feixe gaussiano com um comprimento de onda $\lambda = 1064nm$, com potência máxima de 6,0W, que opera no modo TEM_{00}

O feixe de laser percorre seu caminho sendo refletido pelos espelhos E_1 e E_2 , que permitem um alinhamento micrométrico do feixe de laser ao entrar no microscópio.

Usamos um microscópio invertido, *Nikon Ti-S*. Quando o laser entra no microscópio ele se depara com dois espelhos, E_3 é um espelho dicróico que possui uma alta transmitância

para a luz visível e uma alta reflectância para a luz no infravermelho e E_4 . O espelho E_4 reflete a luz vinda do microscópio, representada por L_1 , para uma câmera CCD, modelo *Jai BM-500GE*, que envia a imagem para o computador, que permite a coleta de dados. Já o espelho E_3 reflete a luz do laser para a objetiva do microscópio com óptica corrigida no infinito, aumento de $100\times$ e abertura numérica $NA = 1,4$, ela é responsável por focalizar o feixe de laser, isto é, a própria pinça óptica, e deixa passar a luz do microscópio. Esse espelho também reflete a luz para uma outra câmera CCD, modelo *Jai CV-A50IR*, que envia a imagem para o monitor de visualização do experimento.

O computador também faz o controle do estágio piezoelétrico, que é o responsável por deslocar o porta amostra, lamínula, com precisão nanométrica. No porta-amostra está a solução de DNA e microesferas, vemos no esquema que a microesfera aprisionada pelo poço de potencial da pinça óptica encontra-se a uma altura h da lamínula, que representa a distância do centro de massa da microesfera em relação a lamínula.

4.3 Preparação de Amostras

Nossa amostra consiste em uma solução tampão com moléculas de λ -DNA (DNA do bacteriófago λ) marcadas com biotina e microesferas de poliestireno. As moléculas de DNA são marcadas com biotina nas duas extremidades. Para realizarmos a biotinizacão do DNA, utilizamos o protocolo disponível na referência [24]. As microesferas usadas possuem um diâmetro de $3\mu m$ e são revestidas com estreptavidina. A solução tampão é uma solução salina de PBS (Phosphater Buffer Saline) com um pH no valor de 7.4. Em nossos experimentos utilizamos essa solução tampão em duas concentrações de $[NaCl]$ diferentes, a fim de estudarmos o papel da força iônica na interação do complexo DNA-DAPI. A composição dos dois tampões são:

- (i) PBS 174mM: 4,375mM de Na_2HPO_4 ; 1,25mM de NaH_2PO_4 e 140mM de $NaCl$, com uma força iônica total de 174mM;
- (ii) PBS 34mM: 4,375mM de Na_2HPO_4 ; 1,25mM de NaH_2PO_4 e sem $NaCl$, com uma força iônica total de 34mM.

As pontas da molécula DNA são ligadas, uma ponta na microesfera e a outra ponta é ligada à lamínula que esta recoberta com estreptavidina. A biotina é uma vitamina do complexo B, também conhecida como vitamina H, vitamina B7 ou B8, que funciona como uma coenzima. A estreptavidina é uma proteína, que tem como característica importante sua grande afinidade de ligação com a biotina.

4.3.1 Construção do porta-amostra

Paralelamente à preparação da amostra de DNA preparamos o porta-amostra da seguinte forma: em uma lamínula com espessura de aproximadamente 0,15mm colamos um

o-ring de borracha com diâmetro de aproximadamente 0,7 cm . Recobrimos essa região do o-ring primeiramente com $20\mu\text{l}$ de BSA (1,8 mg/ml em um tampão contendo magnésio, ao qual chamamos de tampão A), esperamos cerca de 30 minutos e lavamos com $50\mu\text{l}$ de tampão A. Depois colocamos $20\mu\text{l}$ de STP (estreptavidina, 0,2mg/ml em tampão PBS), esperamos cerca 30 minutos, lavamos com PBS e colocamos essa lamínula no microscópio para que a solução de estreptavidina seque com a luz do microscópio. A BSA que usamos esta marcada com biotina, fazemos esse procedimento de depositar primeiro a BSA sobre a lamínula, porque ela se liga melhor com o vidro. Usamos magnésio como mediador da ligação eletrostática entre a BSA e o vidro da lamínula. Depositamos a estreptavidina que vai se ligar com a biotina presente na BSA depositada na lamínula e também com a presente no DNA. Por fim colocamos a amostra de DNA-microesfera no porta amostra, e com isso conseguimos prender a outra ponta do DNA na lamínula.

4.3.2 Preparação da amostra de DNA

Na preparação do DNA-microesferas, colocamos $2\mu\text{l}$ da solução de microesferas de poliestireno com diâmetro de $3,0\mu\text{m}$, $6\mu\text{l}$ da solução de λ -DNA biotinilado e $20\mu\text{l}$ do tampão PBS 7.4 (Phosphate Buffer Saline - 174mM) em um microtubo. Deixamos o microtubo com a amostra de DNA e microesfera em banho térmico à temperatura de 37°C durante aproximadamente uma hora. Esse procedimento faz com que uma ponta do DNA se ligue a microesfera, pois a biotina que esta na ponta do DNA tem afinidade com a estreptavidina que esta recobrimo a microesfera de poliestireno. Depois desse tempo de incubação, completamos a solução com PBS 174mM até atingirmos um volume de $\sim 100\mu\text{l}$ e voltamos o microtubo para o banho térmico e esperamos cerca de mais 20 minutos. Depois desse tempo a amostra é colocada no porta-amostra e está pronta para ir para o microscópio.

4.4 Procedimento Experimental

Após colocarmos o porta-amostra, com nossa amostra de DNA no microscópio, passamos para a escolha da molécula de DNA. Nesse processo encontramos em nossa amostra algumas configurações possíveis para o DNA. A figura 4.3 ilustra essas possíveis configurações. Nela é possível encontrar: microesferas completamente livres em solução ou grudadas na lamínula, microesferas presas a um ou mais DNA que se encontram livres ou grudadas umas às outras, podemos também encontrar moléculas de DNA livres em solução ou presas ao fundo da lamínula. Nenhuma dessas configurações é de nosso interesse, procuramos um DNA que esteja com uma das pontas grudadas em uma microesfera e outra na lamínula, para encontrarmos a configuração de interesse (microesfera + DNA + lamínula).

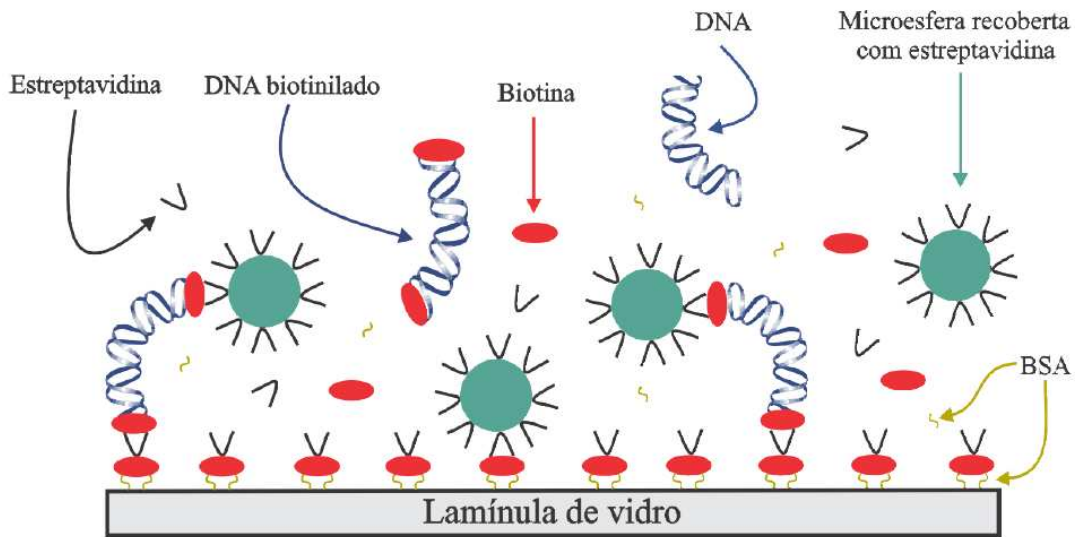


Figura 4.3: Possíveis configurações para o DNA e as microesferas na amostra. [25]

Para encontrarmos a configuração desejada, prendemos as microesferas na pinça óptica e movemos a lamínula com o piezo elétrico. Quando encontramos essa configuração de interesse, o DNA agirá como uma mola e a microesfera, que estava presa com a pinça óptica, escapará da pinça, pois existe um ponto em que a força com que a pinça “segura” a microesfera torna-se menor do que a força do DNA. Assim, a microesfera se solta do poço de potencial criado pela pinça óptica e volta ao seu estado de equilíbrio. Isso pode ser ilustrado na figura 4.4. Mas não basta apenas que essa configuração seja encontrada. A molécula de DNA deve atender as condições padrões para os parâmetros mecânicos que utilizamos, ou seja, uma molécula de DNA com comprimento de contorno de aproximadamente $16,5\mu\text{m}$ e com comprimento de persistência de aproximadamente 50 nm [11,25,26].

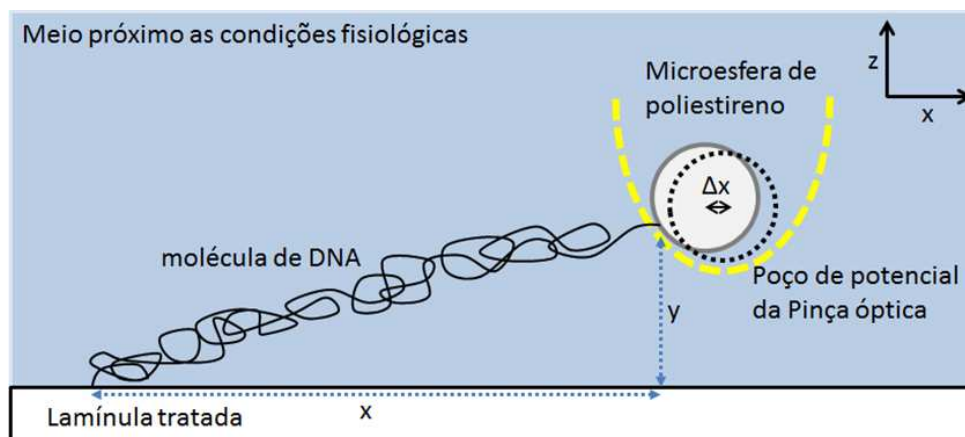


Figura 4.4: Esquema do estiramento de uma molécula de DNA em pinça óptica [9].

Para determinar esses parâmetros contamos com o auxílio do software, ImageJ, que calcula a posição do centro de massa da microesfera e fornece sua posição (x,y) no fundo do poço. Além desse utilizamos o KaleidaGraph, que permite construir um gráfico de

força por extensão da molécula de DNA, que é uma curva típica obtida em nossos experimentos, como mostrado na figura 4.5, e obter nossas variáveis de interesse através do ajuste feito com o modelo WLC (Worm – Like Chain) [13]. Esse modelo descreve de maneira satisfatória o comportamento elástico do DNA no regime entrópico, que é um regime de forças baixas, menores que 5pN. Nele a força da pinça não destrói o DNA, ou seja, suas ligações químicas não são rompidas. Para o DNA, o regime entrópico vai até 10pN.

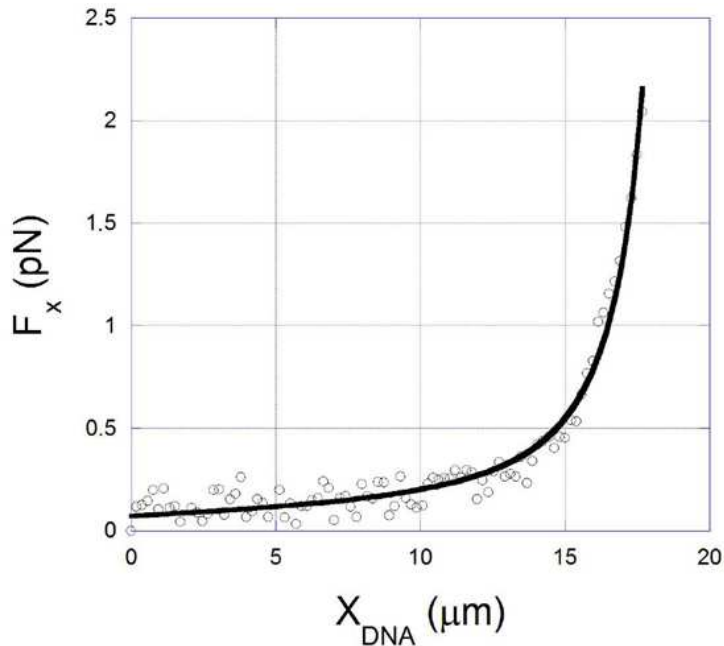


Figura 4.5: Gráfico de Força por Extensão para uma molécula de DNA [11].

Ao observarmos novamente a figura 4.5, vemos que o deslocamento é feito na direção x . Portanto, utilizamos na análise a componente x da equação 2.1, com, $F_x = F \cos\theta = F(\frac{x_{DNA}}{z})$ e $z = \sqrt{x_{DNA}^2 + h^2}$. Que substituído na equação 2.1 nos fornece a expressão final da componente x da força, dada por:

$$F = \frac{k_B T}{A} \left[\frac{\sqrt{x_{DNA}^2 + y^2}}{L} + \frac{1}{4(1 - \frac{\sqrt{x_{DNA}^2 + y^2}}{L})^2} + \frac{1}{4} \right] \frac{x_{DNA}}{\sqrt{x_{DNA}^2 + y^2}} \quad (4.1)$$

onde h , k_B e T são constantes e os parâmetros A e L serão fornecidos pelo ajuste da equação 4.1, como dito anteriormente.

É importante salientar também que nossos experimentos são feitos considerando apenas a força da pinça e do DNA, pois ao fazermos o deslocamento da lamínula usamos uma velocidade muito baixa ($v = 0,1 \mu m/s$), dessa forma garantimos um regime quase-estático, onde a força de Stokes é desprezível.

Quando encontramos uma molécula de DNA que se encaixe nas características padrões, e após uma serie de repetições do estiramento dessa molécula de DNA pura, po-

demos adicionar as diferentes concentrações de ligantes à solução a fim de estudarmos como as propriedades mecânicas são alteradas. Em nosso experimento trabalhamos com o DAPI dissolvido em solução de PBS 7.4 com duas concentrações salinas diferentes, 174mM e 34mM, cada uma dessas soluções possuía a mesma concentração de DAPI cujas concentrações finais da solução variaram de $0,25\mu M$ até $6,0\mu M$. Fizemos primeiro uma caracterização completa, usando o PBS 7.4 com concentração de 140mM de $[NaCl]$ a fim de estudarmos o comportamento do complexo DNA-DAPI sob essa solução salina. Depois fizemos uma caracterização completa, usando o PBS 7.4 sem $[NaCl]$. Após a adição de cada uma dessas concentrações à solução de DNA, esperávamos cerca de 20 minutos para garantir que a solução atingisse o equilíbrio químico e repetíamos o estiramento da molécula de DNA cerca de seis vezes, para garantir uma melhor média e uma menor barra de erros.

Capítulo 5

Resultados e Discussões

Neste capítulo discutiremos os resultados obtidos com o complexo DNA-DAPI, submetidos a forças iônicas diferentes. Faremos também a conexão entre os parâmetros mecânicos e os parâmetros físico-químicos do complexo.

5.1 Propriedades mecânicas em função da concentração de DAPI

Na figura 5.1 mostramos o gráfico do comprimento de persistência do DNA em função da concentração de DAPI.

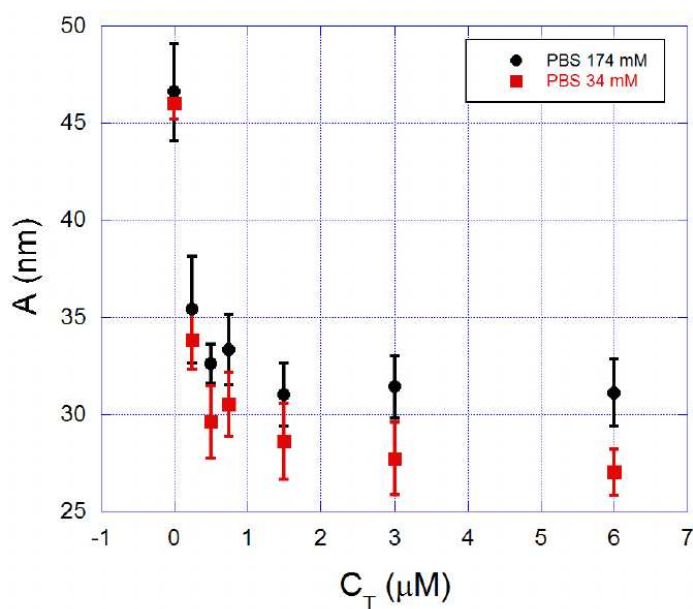


Figura 5.1: Gráfico do comprimento de persistência em função da concentração total de DAPI, para a força iônica de 174 mM (círculos pretos) e para a força iônica de 34 mM (quadrados vermelhos).

No gráfico podemos ver um decaimento monotônico do comprimento de persistência

à medida que aumentamos a concentração de DAPI na solução, tanto para a força iônica de 174mM (círculos pretos) quanto para a de 34mM (quadrados vermelhos). Esse decaimento sugere fortemente que a ligação de fenda menor é o principal modo de interação do complexo DNA-DAPI, como já foi sugerido por outros autores utilizando outras técnicas experimentais [27–30].

Como sabemos o DAPI é um íon divalente (2+) [27], isso faz com que, ela ao se ligar ao DNA, neutralize as cargas negativas que existem ao longo da cadeia de fosfatos. Quando as cargas negativas são blindadas a repulsão eletromagnética, devido as próprias cargas negativas do DNA, diminui, em consequência disso o número médio de dobras do DNA aumenta, tornando assim o DNA mais maleável, diminuindo o comprimento de persistência.

Podemos observar pela figura 5.1 que a força iônica tem um papel significativo na mudança do comprimento de persistência do DNA, uma vez que, a diminuição da força iônica levou a uma diminuição do comprimento de persistência, já que, a saturação para uma força iônica de 174mM ocorre em 31nm e para uma força iônica de 34mM ocorre em 27nm . Vemos então que para baixas forças iônicas a característica eletrostática da interação do complexo DNA-DAPI é evidenciada [31, 32].

Pela figura 5.2 observamos melhor a influencia da força iônica no complexo DNA-DAPI. Na figura vemos algumas curvas de força por extensão, para diferentes concentrações de DAPI, que foram obtidas em nossos experimentos. No item *a)* temos o complexo DNA-DAPI em PBS 174mM e no item *b)* em PBS 34mM. O ajuste feito pela equação de Marko e Siggia [13] nos retorna os comprimentos de contorno e persistência com muito boa precisão. Podemos ver que as corvas no item *b)* estão mais afastadas do que no item *a)*. [31]

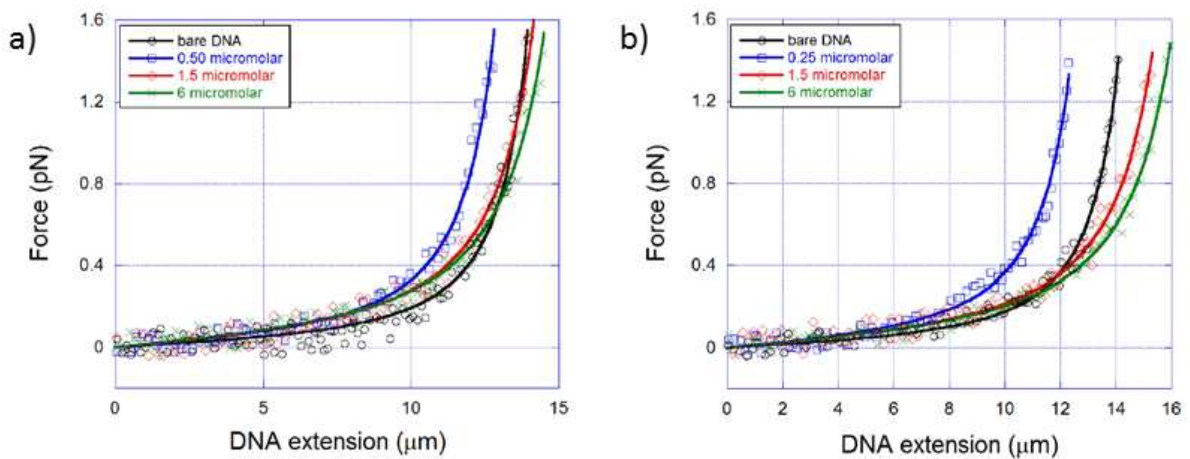


Figura 5.2: Curvas de força por extensão, para diferentes concentrações de DAPI. No item *a)* temos o complexo DNA-DAPI em PBS 174mM e no item *b)* em PBS 34mM. O ajuste feito pela equação de Marko e Siggia [13].

Ainda na discussão referente a alteração dos parâmetros mecânicos devido à força iônica, no gráfico mostrado na figura 5.3 vemos o comportamento do comprimento de persistência obtido na saturação, A_{sat} , normalizado pelo comprimento de persistência do DNA puro, A_0 , como função do comprimento de Debye.

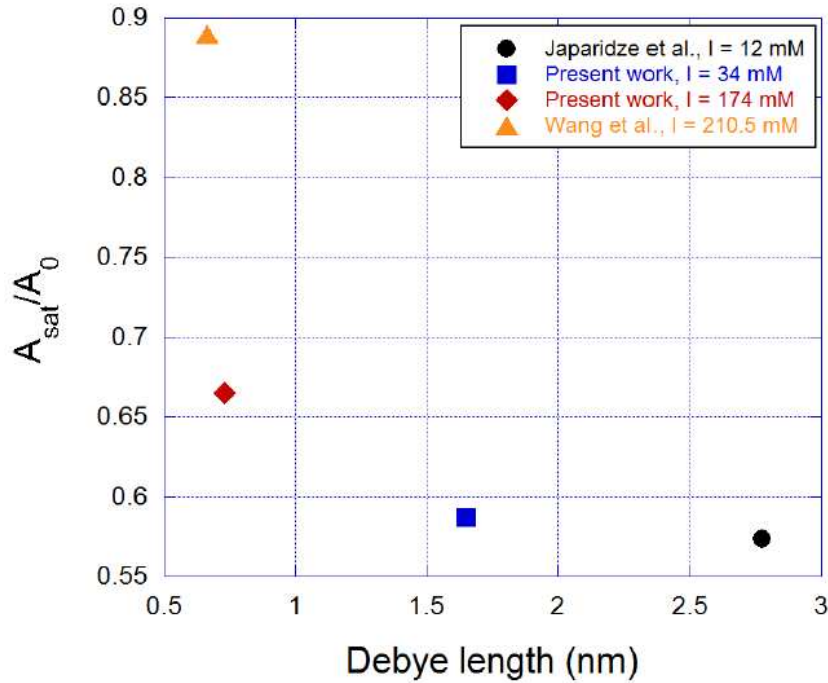


Figura 5.3: comprimento de persistência obtido na saturação, A_{sat} , normalizado pelo comprimento de persistência do DNA puro, A_0 , como função do comprimento de Debye.

O comprimento de Debye é o comprimento característico em uma solução eletrolítica que mede o quanto os efeitos eletrostáticos persistem. Esse parâmetro pode ser estimado diretamente da força iônica de uma solução eletrolítica pela equação aproximada $0,304/\sqrt{I}$, que nos fornece o comprimento de Debye em nm , desde que, a força iônica seja dada em molar, M . No gráfico 5.3 podemos ver os dados obtidos por outros grupos de pesquisa, Japaridze *et al.* [27] e Wang *et al.* [30], onde foram usados diferentes valores de força iônica das usadas em nossos experimentos. Nele podemos observar que o valor do comprimento de persistência obtido na saturação diminui em função do comprimento de Debye. Quando há um aumento na força iônica do tampão ocorre uma diminuição no comprimento de Debye e o comprimento de persistência apresenta pequenas mudanças em relação ao valor do DNA puro.

Na figura 5.4 mostramos o gráfico do comprimento de contorno normalizado pelo comprimento de contorno do DNA puro em função da concentração de DAPI.

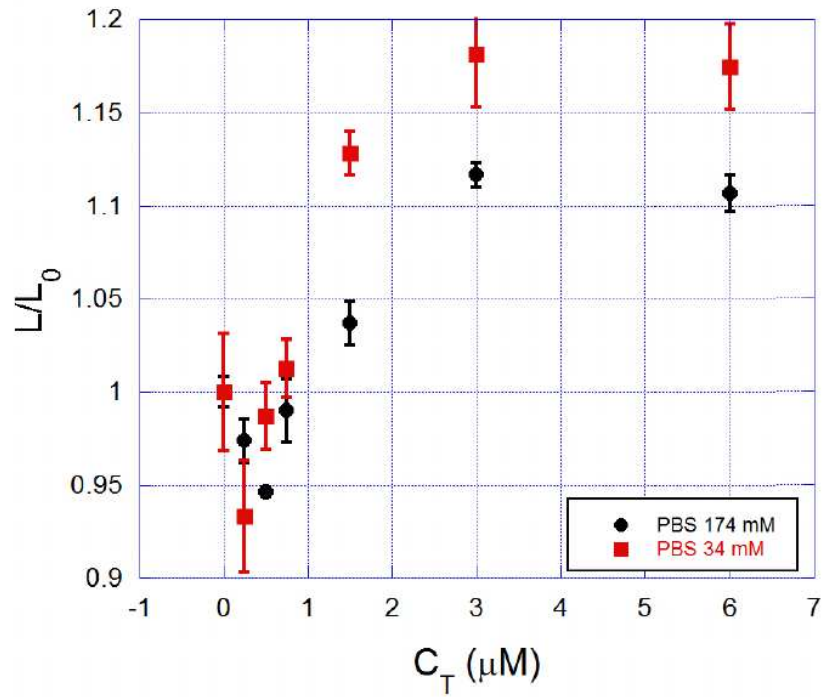


Figura 5.4: Gráfico do comprimento de contorno em função da concentração total de DAPI, para a força iônica de 174 mM (círculos pretos) e para a força iônica de 34 mM (quadrados vermelhos).

No gráfico podemos 5.4 ver um comportamento não-monotônico do comprimento de contorno. Para baixas concentrações de DAPI ($C_T \lesssim 0,50\mu\text{M}$) existe uma queda no comprimento de contorno e logo após um aumento para altas concentrações ($C_T \gtrsim 0,50\mu\text{M}$), isso ocorre tanto para a força iônica de 174mM (círculos pretos) quanto para a de 34mM (quadrados vermelhos).

Esse comportamento indica dois modos de ligação diferentes ocorrendo na interação do complexo DNA-DAPI, um para baixas concentrações e outro para altas concentrações. O primeiro modo de ligação é dominante para baixas concentrações do DAPI, ele é o responsável pelo decaimento do comprimento de contorno, já o segundo modo de ligação começa a ser relevante em altas concentrações, ele é responsável pelo aumento do comprimento de contorno.

Para explicar esse comportamento não-monotônico do complexo DNA-DAPI, propomos que o primeiro modo de ligação, observado para baixas concentrações, é a ligação de fenda menor em regiões ricas em AT [3, 5, 33], o que condiz com o decaimento do comprimento de contorno nessa faixa de concentração. Isto está relacionado ao fato de que ao blindar as cargas negativas ao longo da cadeia de fosfato da dupla hélice e, portanto, aumentar o número médio de dobras do DNA. Dessa forma o DAPI induz um decaimento aparente no comprimento de contorno. Já o segundo modo de ligação, observado para altas concentrações, é a intercalação, que está intimamente relacionado ao aumento do comprimento de contorno. Esse modo de ligação é relatado em alguns trabalhos quando

o DAPI interage com o DNA ricos em regiões CG [3, 5, 28, 33]. Vemos novamente que a interação é evidenciada para baixas forças iônicas, já que as variações no contorno são maiores na solução em PBS 34mM.

Podemos resumir as discussões feitas nos parágrafos anteriores analisando de forma qualitativa os dados obtidos, para os parâmetros mecânicos, em nossos experimentos. A análise sugere que o primeiro e principal modo de ligação é a ligação por fenda menor, que ocorre para baixas concentrações ($C_T \lesssim 0,50\mu M$), onde ele provavelmente também chega à saturação. Esse modo de ligação induz uma diminuição tanto no comprimento de persistência quanto no comprimento de contorno. Já o segundo modo de ligação é a intercalação, que ocorre para altas concentrações ($C_T \gtrsim 0,50\mu M$). Esse modo de ligação induz um aumento no comprimento de contorno da molécula de DNA, mas sem causar nenhuma modificação no comprimento de persistência. Isso ocorre devido ao fato de que, provavelmente, o primeiro modo de ligação é quem determina a flexibilidade do complexo DNA-DAPI. Observamos também que a força iônica ao qual o complexo está submetido influencia significativamente o comportamento das propriedades mecânica, já que, a saturação do comprimento de persistência diminui cerca de 33,5% em PBS 174mM e cerca de 41,3% em PBS 34mM e o comprimento de contorno aumenta em cerca de 11% em PBS 174 mM e cerca de 18% em PBS 34mM.

5.2 Parâmetros físico-químicos da interação

Nesta seção estamos interessados em conectar as propriedades mecânicas do complexo DNA-DAPI, extraídas em nosso experimento com a pinça óptica, com a físico-química da interação e podermos extrair, assim, os parâmetros físico-químicos da interação, com o uso dos dois diferentes tampões. Além disso, iremos desacoplar os dois modos de ligação que ocorrem no complexo DNA-DAPI que foi discutido na seção anterior.

Com os dados do comprimento de persistência podemos determinar os parâmetros de ligação do complexo DNA-DAPI modelando o decaimento monotônico pela equação abaixo [34]

$$\frac{1}{A} = \frac{1 - Nr}{A_0} + \frac{Nr}{A_1} \quad (5.1)$$

onde A_0 é o comprimento de persistência do DNA puro e A_1 é o comprimento de persistência local, devido à ligação de uma única molécula de ligante, ou devido à ligação de um aglomerado de moléculas de ligante.

Podemos ligar a equação 5.1 com uma isoterma de ligação por meio do parâmetro r . Para nossa análise utilizamos a isoterma de McGhee-von Hippel [2], o clássico modelo de exclusão de vizinhos que é dada pela equação 2.6. Mas como nossos dados experimentais são expressos em função da concentração total de ligante em solução, C_T , devemos então reescrever a isoterma de ligação para que ela fique em função de C_T e não de C_f . Para isso recorremos a relação

$$C_f = C_T - C_b = C_T - rC_{pb} \quad (5.2)$$

O gráfico mostrado na figura 5.5 representa os nossos dados do comprimento de persistência ajustados com essa isoterma de ligação.

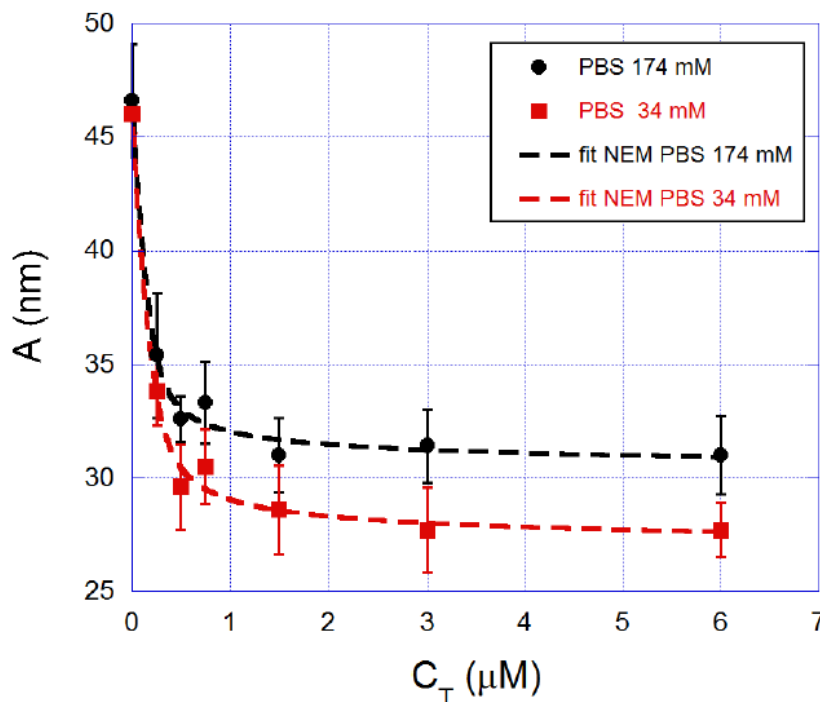


Figura 5.5: Gráfico do comprimento de persistência em função da concentração de DAPI, ajustado pela isoterma de McGhee-von Hippel (linha pontilhada), para a força iônica de 174 mM (círculos pretos) e para a força iônica de 34 mM (quadrados vermelhos)

Com esse ajuste teórico aos nossos dados experimentais conseguimos extrair os valores de K , N e A_1 , para os diferentes valores de força iônica utilizados em nossos experimentos. Para o PBS 174 mM encontramos $K = (10,5 \pm 3,0) \times 10^6 M^{-1}$, $N = 4,4 \pm 0,7$ e $A_1 = 29,7 \text{ nm}$. Já para o PBS 34 mM encontramos $K = (8,5 \pm 2,1) \times 10^6 M^{-1}$, $N = 3,8 \pm 0,5$ e $A_1 = 26,3 \text{ nm}$. Vale ressaltar que, para nosso ajuste teórico a isoterma de ligação do modelo de exclusão de vizinhos é usada em sua forma não cooperativa, que se ajusta muito bem aos nossos dados, ou seja, o DAPI se liga ao DNA de forma não cooperativa. Vemos também que os valores encontrados para a constante de ligação no equilíbrio e para o parâmetro de exclusão, em ambas as forças iônicas, são compatíveis com os reportados na literatura para a ligação de fenda menor [3, 33, 35, 36].

Para desacoplar o modo de ligação da intercalação usamos o mesmo modelo de exclusão de vizinhos de McGhee-von Hippel, por se tratar de um modelo comumente usado para ajustar dados de intercalantes típicos. Vimos na seção anterior que os efeitos da intercalação começam a surgir apenas para as concentrações maiores que $0,50 \mu\text{M}$. Usamos então os dados coletados nessa faixa de concentração.

Para intercalantes típicos podemos relacionar o comprimento de contorno com a iso-

terma de ligação 2.6 por meio da relação [34]:

$$\Theta = \frac{L - L_0}{L_0} = \gamma r \quad (5.3)$$

onde L_0 é o valor inicial do comprimento de contorno L , γ é a razão entre o aumento na largura do par de base ocasionado pela molécula intercalada e a largura natural do par de base e fazendo $r = \Theta/\gamma$, obtemos:

$$C_T = \frac{\Theta C_{bp}}{\gamma} + \frac{\Theta}{\gamma K \left(1 - \frac{N\Theta}{\gamma}\right)} \left[\frac{1 - N\frac{\Theta}{\gamma}}{1 - (N-1)\frac{\Theta}{\gamma}} \right]^{1-N} \quad (5.4)$$

A equação 5.4 é escrita em termos das variáveis experimentais que temos fácil acesso, C_T e Θ , que pode ser calculado através do comprimento de contorno em cada concentração. Com esse ajuste teórico, podemos extrair os parâmetros de ligação de interesse para o caso da intercalação que são K , N e γ .

Na figura 5.6 vemos o gráfico do comprimento de contorno em função da concentração total de DAPI.

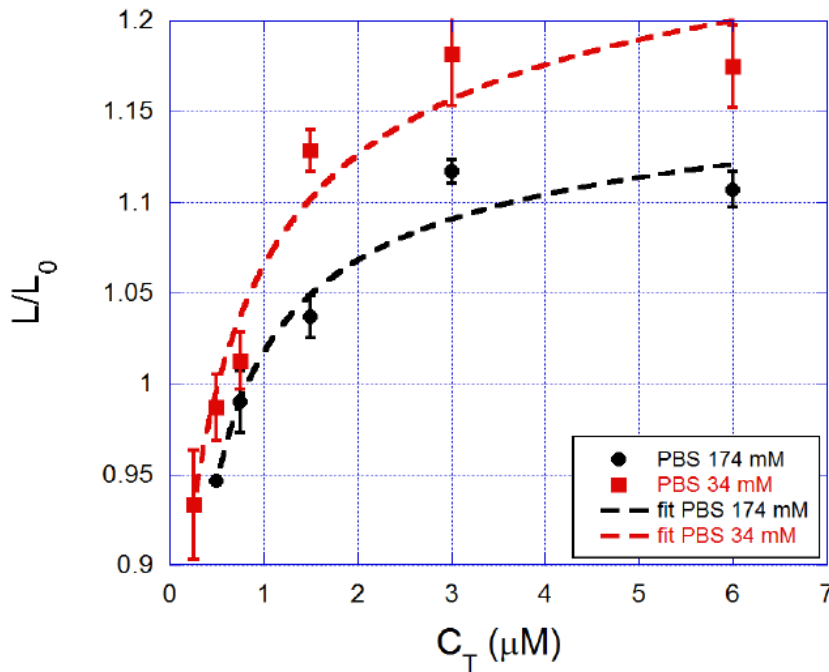


Figura 5.6: Gráfico do comprimento de contorno em função da concentração total de DAPI, ajustado pela isoterma de McGhee-von Hippel (linha pontilhada), para a força iônica de 174 mM (círculos pretos) e para a força iônica de 34 mM (quadrados vermelhos).

Podemos ver o ajuste feito pela equação 5.4 em nossos dados experimentais. Esse ajuste foi feito apenas para a faixa de concentração onde ocorre o aumento do comprimento de contorno. Nesse caso L_0 é o valor mínimo obtido do comprimento de contorno fornecido pelo gráfico da figura 5.4.

Com esse ajuste teórico, podemos extrair os parâmetros de ligação de interesse para o caso da intercalação que são K , N e γ para os dois valores de forças iônicas utilizados em nossos experimentos. Para PBS 174 mM encontramos $K = (2,8 \pm 0,6) \times 10^5 M^{-1}$, $N = 3,3 \pm 0,4$ e $\gamma = 0,9 \pm 0,1$. Já para o PBS 34mM encontramos $K = (3,5 \pm 0,7) \times 10^5 M^{-1}$, $N = 2,5 \pm 0,5$ e $\gamma = 1,0 \pm 0,1$. Os resultados obtidos são da mesma ordem de magnitude dos encontrados para intercalantes típicos e o fato de encontrarmos $\gamma \sim 1$ em ambos os experimentos é uma forte indicação de que o aumento do comprimento de contorno é devida a intercalação [37–41], pois outros tipos de ligação que produzem um aumento no comprimento de contorno geralmente apresentam $\gamma \ll 1$ [32, 41].

Por último, observamos que os valores encontrados para a constante de ligação química para os dois valores de força iônica trabalhados é, aproximadamente, duas ordens de grandeza menor que os resultados da constante de ligação química encontrado para a ligação de fenda menor. Isto nos mostra que o DAPI tem uma maior afinidade em se ligar com a fenda menor do que em se ligar através da intercalação. Essa discussão nos permite concluir que a ligação de fenda menor é o principal modo de interação entre o DNA e o DAPI, pois tem uma afinidade de ligação maior que a intercalação, devido a isso, essa ligação satura em concentrações muito mais baixas de corante. Já a intercalação começa a ter papel significativo na interação apenas depois da saturação da ligação de fenda menor e com uma afinidade de ligação menor.

Capítulo 6

Conclusões e Perspectivas

Neste trabalho utilizamos a técnica de pinça óptica para investigar a interação entre o DNA e o corante fluorescente DAPI. A investigação desse complexo foi feita em duas soluções salinas com forças iônicas diferentes, a fim de observarmos o que ocorre com a esse complexo em alta e baixa força iônica.

Para o ajuste dos parâmetros mecânicos fui utilizado o modelo WLC de polímeros semi-flexíveis elaborado por Marko e Siggia. Através dos parâmetros mecânicos pudemos observar um decaimento monotônico do comprimento de persistência em ambos os valores de força iônica. O comprimento de contorno apresentou um comportamento não monotônico, apresentando uma queda para baixas concentrações de corante e um aumento para altas concentrações. Ambos os comportamentos foram observados para os diferentes valores de força iônica. Tanto o comprimento de persistência quanto o comprimento de contorno tiveram seus comportamentos evidenciados para a solução com força iônica baixa. O comportamento não monotônico do comprimento de contorno nos sugere, então, que dois modos diferentes de ligação ocorrem no complexo DNA-DAPI.

Para fazermos a conexão entre os parâmetros mecânicos e propriedades físico-químicas do complexo DNA-DAPI, ajustamos nossos dados com a isoterma de McGhee-von Hippel, para o caso sem cooperatividade, que nos permitiu além de obtermos os parâmetros físico-químicos de interesse para a ligação, desacoplar os dois modos de ligação observados em nossos dados: a ligação de fenda menor, que é o principal modo de ligação, pois ocorre e satura em baixas concentrações de DAPI, e a intercalação, que passa a ter papel relevante apenas depois da saturação da primeira.

Em nosso experimentos vimos que a baixa força iônica tende a evidenciar o caráter eletrostático da ligação. Como perspectivas futuras, temos interesse em continuar os estudos de interação em complexos DNA-ligantes variando a força iônica da solução a fim de avaliarmos o comportamento dessas ligações.

Apêndice A

Mecânica de Polímeros

Varetas Flexíveis

Começaremos nossa análise matemática pelo exemplo mais simples, uma vareta flexível. Vemos na figura 1 uma vareta rígida de comprimento L que sofre uma deformação e toma a forma de um semicírculo de raio R .



Figura 1: Vareta rígida de comprimento L que ao ser deformada toma a forma de um semicírculo de raio R

O cálculo da energia gasta para realizar essa deformação é um problema clássico dos livros de mecânica do contínuo e é dada por:

$$E_{curva} = \frac{\kappa_f L}{2R^2} \quad (1)$$

onde κ_f é a rigidez flexural da vareta, que é dada por

$$\kappa_f = YI \quad (2)$$

onde Y é o módulo de Young da vareta e I é o momento geométrico de segunda ordem da seção reta.

Modelo de Kratky – Porod

Ao generalizarmos a expressão para a energia de curvatura, equação 1, de uma vareta rígida, obtemos a expressão conhecida como modelo de Kratky-Porod para a energia de curvatura de um polímero. Para tanto, vemos que $\frac{1}{R}$ é a curvatura de um semicírculo,

então, para uma curva arbitrária qualquer podemos substituir o termo $\frac{1}{R^2}$ por C^2 , onde C é a curvatura. Para escrevermos a curvatura C observamos a figura 2

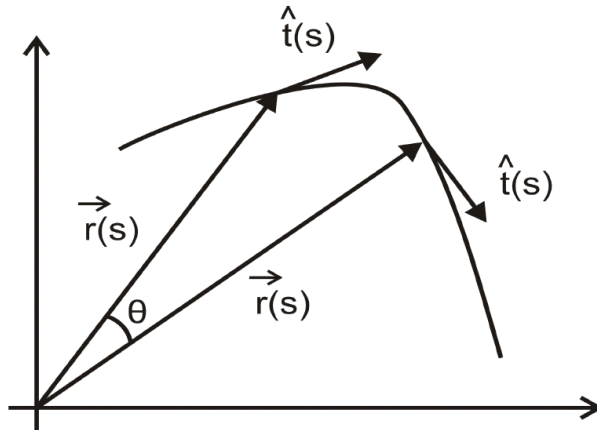


Figura 2: Curva arbitrária [12].

Na figura, $\vec{r}(s)$ é o vetor posição que localiza um ponto arbitrário da curva. Este vetor está parametrizando a curva pelo comprimento de arco s ao longo da curva. $\hat{t}(s)$ é o vetor unitário tangente à curva em cada ponto, também parametrizado por s . Do cálculo elementar temos a relação

$$\hat{t}(s) = \frac{\partial \vec{r}}{\partial s} \quad (3)$$

e a curvatura é dada por

$$C = \left| \frac{\partial^2 \vec{r}}{\partial s^2} \right| = \left| \frac{\partial \hat{t}}{\partial s} \right| \quad (4)$$

Substituindo a expressão 4, para uma curvatura arbitrária C , generalizamos a expressão 1 para a energia de curvatura de uma vareta rígida. Ao integrarmos a energia por unidade de comprimento ao longo do comprimento de um polímero de forma arbitrária. O resultado dessas considerações nos dão a expressão

$$E_{KP} = \frac{1}{2} k_f \int_0^L \left| \frac{\partial \hat{t}}{\partial s} \right|^2 ds \quad (5)$$

que é o modelo de Kratky-Porod.

Elasticidade entrópica e o comprimento de persistência

Quando colocamos um polímero flexível em uma solução aquosa, os choques sofridos com o meio faz com que ele se dobre até atingir um estado de equilíbrio termodinâmico. Estes choques sofridos com o meio podem fazer com que suas duas extremidades se aproximem ou se afastem, dependendo da forma inicial em que o sistema se encontra, ou seja,

dependerá da própria rigidez flexional do polímero e da temperatura em que o meio se encontra.

Devido aos choques sofridos com o meio, e ao fato de a cadeia polimérica poder assumir muitas configurações, podemos contar o número de configurações possíveis para essa cadeia, ao fazermos isso estamos na verdade medindo sua entropia. Quando a entropia tende à zero a curvatura da cadeia tem raio infinito, isto é, quando temos uma haste rígida. Nesta forma o número de configurações possíveis é mínimo e a entropia do sistema também é mínima. A medida em que os choques com o meio aumentam, o polímero tende a possuir cada vez mais dobras, aumentando assim o número de configurações possíveis e aumentando conseqüentemente a entropia, já que esta é proporcional ao logaritmo do número de configurações possíveis para o sistema,

$$S = k_B \ln \Omega \quad (6)$$

onde Ω é o número de estados possíveis e k_B é a constante de Boltzmann.

Ao observarmos novamente a figura 2, vemos que $\hat{t}(0)$ é o valor de $\hat{t}(s)$ na origem do polímero, definimos como θ o ângulo entre $\hat{t}(0)$ e $\hat{t}(s)$ para uma posição arbitrária s . Para um círculo de raio R , θ é o ângulo subtendido pelo arco de comprimento s ($s = R\theta$). Dessa forma:

$$E_{arc} = \frac{k_f s}{2R^2} = \frac{k_f \theta^2}{2s} \quad (7)$$

Para avaliarmos as flutuações dessa curva, avaliamos o valor de $\langle \theta^2 \rangle$, que é definido por:

$$\langle \theta^2 \rangle = \frac{\int \theta^2 e^{-\beta E} d\Omega}{\int e^{-\beta E} d\Omega} \quad (8)$$

onde $d\Omega = \sin \theta d\theta d\phi$ é o elemento de ângulo sólido e $\beta = \frac{1}{k_B T}$ e T a temperatura absoluta.

Para resolvermos a equação 8 tomamos o limite de pequenas curvaturas, fazendo $\sin \theta \sim \theta$ e $E \sim E_{arc}$, e uma mudança de variáveis simples ($x^2 = \beta E_{arc}$), transformamos o numerador e o denominador em integrais do tipo gaussianas, que são bem conhecidas. O resultado dessas integrais nos dá:

$$\langle \theta^2 \rangle = \frac{2s}{\beta k_f} \quad (9)$$

dessa equação definimos o comprimento de persistência A , que é dado por:

$$A = \beta k_f \quad (10)$$

Como falado anteriormente A dá uma ideia imediata da rigidez da molécula, já que, A é diretamente proporcional à rigidez flexural, k_f , e inversamente proporcional à temperatura T , isto indica que, quanto maior A , mais rígido é o polímero, apresentando poucas dobras, quanto menor o valor de A , mais flexível é o polímero, apresentando muitas dobras.

Para obtermos a interpretação geométrica do comprimento de persistência calculamos o valor médio do produto escalar entre os vetores $\hat{t}(0)$ e $\hat{t}(s)$.

$$\langle \hat{t}(0) \cdot \hat{t}(s) \rangle \quad (11)$$

que possui valor máximo unitário.

Analizamos novamente no limite de pequenas curvas, onde θ é pequeno. Fazendo a aproximação $\cos \theta \sim 1 - \frac{\theta^2}{2}$. Teremos então:

$$\langle \hat{t}(0) \cdot \hat{t}(s) \rangle \cong 1 - \frac{\langle \theta^2 \rangle}{2} = 1 - \frac{s}{A} \quad (12)$$

Onde o último termo é a expansão em primeira ordem da função exponencial, dessa forma temos:

$$\langle \hat{t}(0) \cdot \hat{t}(s) \rangle = e^{-\frac{s}{A}} \quad (13)$$

dessa equação, vemos que o comprimento de persistência é o comprimento de correlação da cadeia polimérica, isto é, uma medida do alcance das perturbações locais na conformação da molécula.

Da análise geométrica vemos que, em uma vareta completamente rígida, os vetores $\hat{t}(0)$ e $\hat{t}(s)$ são paralelos, e assim $\langle \hat{t}(0) \cdot \hat{t}(s) \rangle$ assume o valor máximo. De acordo com a equação 13 devemos ter $A \rightarrow \infty$. Ou seja, o comprimento de persistência mede a distância ao longo do polímero sobre o qual a orientação da curva fica não-correlacionada.

O modelo WLC

O modelo WLC tem sido usado como padrão para a análise dos experimentos de estiramento de DNA nos últimos anos. Ele descreve de maneira satisfatória o comportamento elástico de polímeros semi-flexíveis, dentro do regime entrópico ($\sim 5pN$), tanto para pequenos estiramentos (perto da conformação de equilíbrio) quanto para longos estiramentos (perto da conformação retilínea). Trataremos esses dois limites separadamente, e no final encontraremos uma expressão válida para estiramentos arbitrários.

Antes de tratarmos desses limites faremos o cálculo da extensão z do polímero, que pode ser escrita como a distância quadrática média entre as duas extremidades do DNA, $\langle r_{ee}^2 \rangle$.

Cálculo do $\langle r_{ee}^2 \rangle$

Considere uma curva qualquer s , definimos o vetor $\vec{r}(0)$ como o vetor posição que localiza uma extremidade do polímero situada em $s = 0$ e $\vec{r}(L)$ como sendo a outra extremidade do polímero situada em $s = L$, o comprimento de contorno do polímero.

A distância entre as duas extremidades do polímero é dada pelo módulo do vetor:

$$\vec{r}_{ee} = \vec{r}(L) - \vec{r}(0) \quad (14)$$

e assim,

$$\langle \vec{r}_{ee} \rangle = \langle [\vec{r}(L) - \vec{r}(0)]^2 \rangle \quad (15)$$

Sabemos que

$$\hat{t}(s) = \frac{\partial \vec{r}}{\partial s} \quad (16)$$

portanto

$$\int_0^s d\vec{r} = \int_0^s \hat{t}(s') ds', \quad (17)$$

que fornece

$$\vec{r}(s) = \vec{r}(0) + \int_0^s \hat{t}(s') ds' \quad (18)$$

Dessa forma, utilizando a equação 15, temos:

$$\begin{aligned} \langle \vec{r}_{ee}^2 \rangle &= \left\langle \left[\int_0^{L_0} \hat{t}(s') ds' \right] \cdot \left[\int_0^{L_0} \hat{t}(s'') ds'' \right] \right\rangle = \\ &= \int_0^{L_0} ds'' \int_0^{L_0} ds' \langle \hat{t}(s') \cdot \hat{t}(s'') \rangle \end{aligned} \quad (19)$$

Mas, sabemos que

$$\langle \hat{t}(s') \cdot \hat{t}(s'') \rangle = \exp\left(\frac{-s}{A}\right), \quad (20)$$

fazendo apenas uma mudança na origem do sistema, temos

$$\langle \hat{t}(s') \cdot \hat{t}(s'') \rangle = \exp\left(\frac{-|s' - s''|}{A}\right) \quad (21)$$

Substituindo 21 em 19, conseguimos dividir a integral em duas partes igual, de modo que

$$\langle \vec{r}_{ee}^2 \rangle = 2 \int_0^L \exp\left(\frac{-s''}{A}\right) ds'' \int_0^{s''} \exp\left(\frac{-s'}{A}\right) ds' \quad (22)$$

Resolvendo essa integral obtemos o seguinte resultado:

$$\langle \vec{r}_{ee}^2 \rangle = 2AL - 2A^2 \left[1 - \exp\left(-\frac{L}{A}\right) \right] \quad (23)$$

Podemos agora estudar as duas conformações extremas para o polímero, o limite flexível e o limite rígido.

(i) Limite flexível ($L \gg A$)

$$\langle \vec{r}_{ee}^2 \rangle \cong 2AL \quad (24)$$

(ii) Limite rígido ($L \ll A$)

$$\langle \vec{r}_{ee}^2 \rangle \cong L^2 \quad (25)$$

Vemos, então, que no limite flexível a distância entre as extremidades do polímero depende do comprimento de persistência da molécula, já no limite rígido esta distância so depende do comprimento de contorno, o que era de se esperar, pois nesse limite o polímero se assemelha a uma vareta rígida.

Estiramentos próximos da conformação de equilíbrio

Para pequenos estiramentos a força pode ser aproximada pela Lei de Hooke,

$$F = -kz \quad (26)$$

onde k é a constante elástica da mola z é o estiramento da molécula.

A extensão z do polímero pode ser escrita como a distância quadrática média entre as duas extremidades do DNA, $\langle r_{ee}^2 \rangle$, definida no apêndice ??.

$$z = \sqrt{\langle r_{ee}^2 \rangle} \quad (27)$$

Mas, para o limite flexível ($L \gg A$), temos

$$z \cong \sqrt{2AL} \quad (28)$$

Usando o princípio da equipartição de energia para a energia potencial elástica do DNA, temos

$$\frac{1}{2}kz^2 = \frac{3}{2}k_B T \quad (29)$$

usando a equação 28 , determinamos a constante elástica:

$$k = \frac{3}{2} \frac{k_B T}{AL} \quad (30)$$

Finalmente, podemos escrever a força aproximada para este regime:

$$F = -\frac{3}{2} \frac{k_B T}{AL} z \quad (31)$$

Estiramentos longe da conformação de equilíbrio

Neste caso, a molécula de DNA está muito esticada. Podemos escrever a energia aproximada como a energia do modelo de Kratky-Porod, excluindo o trabalho necessário, exercido pela força, para manter a molécula nesta configuração

$$E_{WLC} = \frac{k_f}{2} \int_0^L \left| \frac{\partial \hat{t}}{\partial s} \right|^2 ds - Fz \quad (32)$$

onde a força F aqui é um multiplicador de Lagrange para manter z constante.

Neste caso temos $z \sim L$, e o vetor \hat{t} é praticamente paralelo à curva $\vec{r}(s)$, que descreve a conformação da molécula. Dessa forma, a componente t_z é muito maior que t_x e t_y .

Temos:

$$\hat{t} = t_x \hat{i} + t_y \hat{j} + t_z \hat{k} \quad (33)$$

e

$$|\hat{t}|^2 = |t_x|^2 + |t_y|^2 + |t_z|^2 = |t_z|^2 + |t_\perp|^2 = 1 \quad (34)$$

Como $|t_z| = \sqrt{1 - |t_\perp|^2}$ e $|t_\perp|^2 \ll 1$, podemos fazer uma aproximação em primeira ordem,

$$|t_z| \cong 1 - \frac{|t_\perp|^2}{2} \quad (35)$$

Como consequência da mesma aproximação, é possível escrever ainda que $z = \int |t_z| ds$. Substituindo estas relações na equação 32, obtemos

$$E_{WLC} = \frac{1}{2} k_B T A \int_0^L \left| \frac{\partial t_\perp}{\partial s} \right|^2 ds - F \int_0^L \left(1 - \frac{|t_\perp|^2}{2} \right) ds \quad (36)$$

$$= \frac{k_B T}{2} \int_0^L \left[A \left| \frac{\partial t_\perp}{\partial s} \right|^2 + \frac{F}{k_B T} |t_\perp|^2 \right] ds - FL \quad (37)$$

onde fizemos a aproximação $\partial t / \partial s \cong \partial t_\perp / \partial s$ uma vez que t_z é praticamente constante ao longo do polímero.

Utilizando a transformada de Fourier para fazer a decomposição da energia em modos normais, temos

$$\tilde{t}_\perp(q) = \int t_\perp(s) e^{iqs} ds, \quad (38)$$

onde obtemos como resultado

$$E_{WLC} = \frac{1}{2} k_B T \int \frac{dq}{2\pi} \left[A q^2 + \frac{F}{k_B T} \right] |\tilde{t}_\perp(q)|^2 - FL \quad (39)$$

Este resultado nos permite calcular o valor quadrático médio de t_\perp que nos levará à expressão que estamos procurando para a força no regime de estiramentos longos. No entanto os procedimentos deste cálculo não nos é de interesse para ser demonstrado aqui e pode ser acompanhado na referencia [11]. O resultado deste cálculo é:

$$\langle t_\perp^2 \rangle = \sqrt{\frac{k_B T}{FA}} \quad (40)$$

Utilizando a aproximação $z/L \cong |t_z| \cong 1 - \frac{|t_\perp|^2}{2}$, teremos

$$\frac{z}{L} \cong 1 - \frac{1}{2} \sqrt{\frac{k_B T}{FA}} \quad (41)$$

que ao isolar F , obtemos a expressão para a força no regime de estiramentos longos,

$$F = \frac{1}{4} \frac{k_B T}{A} \left[\frac{1}{\left(1 - \frac{z}{L}\right)^2} \right] \quad (42)$$

Estiramentos arbitrários

Se a equação 42 fosse válida também para pequenos estiramentos ($z \sim 0$), deveríamos recuperar a equação da força para baixos estiramentos, equação 31 ,fazendo a sua expansão em primeira ordem. Mas a expansão em primeira ordem nos dá:

$$F^{(1)} \cong \frac{k_B T}{A} \left(\frac{1}{4} + \frac{z}{2L} \right) \quad (43)$$

Para contornar este problema, Marko e Siggia fizeram uma interpolação, acrescentando dois termos de correção na expressão 42 que são insignificantes quando $z \sim L$, mas dão a forma correta da força para pequenos estiramentos quando fazemos a expansão em primeira ordem. A correção consiste em somar o termo $(z/L) - (1/4)$ dentro do colchete da equação 42 . Com isso, obtemos finalmente a famosa expressão de Marko e Siggia [13] para a força entrópica da molécula de DNA em função da extensão,

$$F = \frac{k_B T}{A} \left[\frac{z}{L} + \frac{1}{4 \left(1 - \frac{z}{L}\right)^2} - \frac{1}{4} \right] \quad (44)$$

Apêndice B

McGhee - von Hippel, Modelo de Exclusão de Vizinhos

Para formular sua conhecida expressão para o modelo de exclusão de vizinhos, equação 2.6, McGhee e von Hippel utilizaram o procedimento descrito abaixo:

- (i) A molécula de DNA pura, livre de ligantes, é considerada como uma rede unidimensional, em geral muito extensa para que os efeitos de borda sejam desprezados, com muitos sítios livres ligáveis.
- (ii) Considere a constante química intrínseca, K , independente do número prévio de ligantes já ligados a molécula de DNA, isto é, não existe cooperatividade [2].
- (iii) Uma lacuna (*gap*) na rede, com g sítios livres, está localizada entre duas moléculas ligadas, o número de sítios ligáveis nessa lacuna é $s = g - N + 1$, para $g \geq N$ ou $s = 0$ para $g < N$, na figura 3 vemos uma situação onde $g = 5$, $N = 3$ e neste caso $s = 3$, onde N é o número de exclusão, isto é, o número de sítios ligáveis ocupados por uma molécula do ligante ligada molécula de DNA.
- (iv) O processo de ligação pode ser escrito pela reação química



onde C_f é o número de moléculas de ligantes livres em solução, \bar{S} é o número médio total de sítios livres da molécula de DNA e C_b é o número de moléculas de ligantes ligadas.

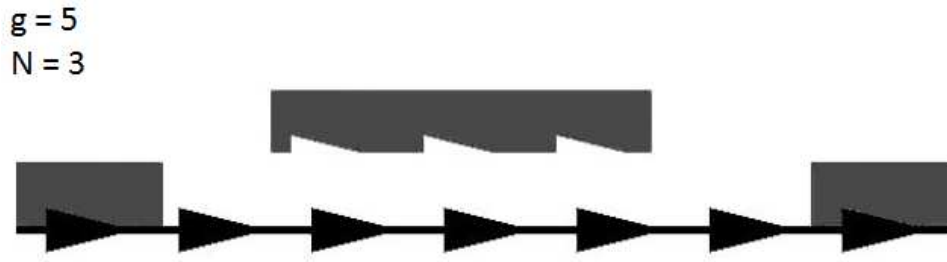


Figura 3: Lacuna (*gap*) com $g = 5$ sítios ligáveis situado entre duas moléculas de ligantes ligadas. [11]

No equilíbrio químico temos,

$$K = \frac{C_b}{C_f \bar{S}} \quad (46)$$

O número médio de sítios ligáveis em uma lacuna pode ser escrito como:

$$\bar{s} = \sum_{g=N}^{g_{max}} (g - N + 1) P_g \quad (47)$$

onde P_g é a probabilidade de uma lacuna particular possuir exatamente g sítios e g_{max} é o valor máximo de g , que corresponde a uma lacuna do tamanho da própria rede.

Observe que, devido à geometria da rede, quando colocarmos C_b moléculas ligadas, teremos $C_b + 1$ lacunas. Desta forma, podemos escrever,

$$\bar{S} = (C_b + 1) \bar{s} \quad (48)$$

e desse modo, substituindo as equações 46 e 47 em 48 temos

$$\frac{C_b}{C_f} = K(C_b + 1) \sum_{g=N}^{g_{max}} (g - N + 1) P_g \quad (49)$$

O principal problema é encontrar uma expressão para a probabilidade P_g . Para isso, adotamos a seguinte relação:

- f é um sítio livre, ligável, da rede.
- b_1, b_2, \dots, b_n são o primeiro, o segundo, ... e o últimos sítio ligado por uma única molécula. A figura 4 esquematiza esta notação para $N = 3$. Observe que chamamos de b_1 a extremidade direita desta molécula.

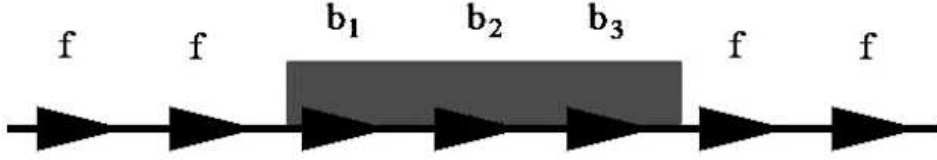


Figura 4: Notação usada para calcular a probabilidade P_g . f é um sítio livre (ligável) da rede e b_i são os sítios ligados [11].

Utilizando esta notação, definimos as probabilidades condicionais:

- $P\{f|f\}$ é a probabilidade de encontrarmos um sítio livre qualquer, se o sítio imediatamente anterior a este for livre também.
- $P\{f|b_1\}$ é a probabilidade de encontrarmos um sítio qualquer ligado, se o sítio imediatamente anterior a este for livre.

De acordo com esta notação, devemos ter sempre $P\{b_1|b_2\} = P\{b_2|b_3\} = \dots = P\{b_{N-1}|b_N\} = 1$ para uma molécula com o número de exclusão N . Além disso, devemos ter $P\{f|b_2\} = \dots = P\{f|b_N\} = 0$, pois um sítio livre só pode ser um vizinho (situado à esquerda) de outro sítio livre ou do primeiro sítio ligado (b_1) de uma molécula ligada.

Utilizando esta notação, podemos escrever a probabilidade P_g como

$$P_g = P\{b_N|f\} \times [P\{f|f\}]^{g-1} \times P\{f|b_1\} \quad (50)$$

O número total de sítios ligados da rede é $C_b N$, e a fração de sítios ligados por número total de sítios da rede é:

$$\frac{C_b N}{C_{pb}} = Nr, \quad (51)$$

onde $r = C_b/C_{pb}$ e C_{pb} é o número de pares de base (sítios da rede).

Como a fração de sítios livres é $1 - Nr$, então, a probabilidade de encontrar um sítio livre de forma aleatória é $1 - Nr$. O sítio anterior, situado imediatamente à esquerda deste, pode estar livre, com probabilidade $1 - Nr$, ou ocupado, com probabilidade $Nr/N = r$. Podemos escrever então

$$1 - Nr = (1 - Nr)P\{f|f\} + rP\{b_N|f\} \quad (52)$$

Observe que devemos ter agora $P\{f|f\} = P\{b_N|f\}$, pois não existe qualquer preferência para um sítio de estar livre ou ocupado. Assim, usando a 52, escrevemos

$$P\{f|f\} = P\{b_N|f\} = \frac{1 - Nr}{1 - (N - 1)r} \quad (53)$$

e

$$P\{f|b_1\} = P\{b_N|1\} = 1 - P\{f|f\} = \frac{r}{1 - (N - 1)r} \quad (54)$$

Substituindo as equações 53 e 54 na equação 50, obtemos

$$P_g = \left[\frac{1 - Nr}{1 - (N - 1)r} \right]^g \left[\frac{r}{1 - (N - 1)r} \right] \quad (55)$$

Com esta expressão para a probabilidade P_g , podemos calcular o somatório da equação 47 fazendo $g_{max} \rightarrow \infty$ (assumindo assim uma rede muito extensa). Fazendo $x = \frac{(1-Nr)}{[1-(N-1)r]}$ e $a = \frac{r}{[1-(N-1)r]}$, temos

$$\begin{aligned} \bar{s} &= \sum_{g=N}^{\infty} (g - N + 1)P_g \\ &= \sum_{g=N}^{\infty} (g - N + 1)ax^g \\ &= ax \frac{\partial}{\partial x} \sum_{g=N}^{\infty} x^g + a(1 - N) \sum_{g=N}^{\infty} x^g \\ &= ax \frac{\partial}{\partial x} \left(\frac{x^N}{1 - x} \right) + a(1 - N) \left(\frac{x^N}{1 - x} \right) \\ &= \left(\frac{1 - Nr}{r} \right) \left[\frac{1 - Nr}{1 - (n - 1)r} \right]^{N-1} \end{aligned} \quad (56)$$

Finalmente, usamos a equação 49 para obter a famosa expressão de McGhee e von Hippel, como a rede é muito extensa, é razoável fazer a aproximação $C_b + 1 \sim C_b$ e obtermos

$$\frac{r}{C_f} = K_i(1 - Nr) \left[\frac{1 - Nr}{1 - (N - 1)r} \right]^{N-1} \quad (57)$$

que é a equação 2.6.

De acordo com a figura 4, deveríamos esperar sempre um valor inteiro para N. Entretanto, a maioria dos resultados encontrados na literatura são de valores não inteiros [38,40]. Isso ocorre devido ao fato dessa expressão ser uma aproximação.

Apêndice C

Artigo Publicado

Neste apêndice apresentamos o artigo “*DNA interaction with DAPI fluorescent dye: Force spectroscopy decouples two different binding modes*” aceito para publicação na revista Biopolymers em 18/01/2017.

DNA interaction with DAPI fluorescent dye: Force spectroscopy decouples two different binding modes

L. A. Reis | M. S. Rocha 

Laboratório de Física Biológica,
Departamento de Física, Universidade
Federal de Viçosa, Minas Gerais,
Brazil

Correspondence

M. S. Rocha Laboratório de Física
Biológica, Departamento de Física,
Universidade Federal de Viçosa,
Viçosa, Minas Gerais, Brazil.
Email: marcos.rocha@ufv.br

Abstract

In this work, we use force spectroscopy to investigate the interaction between the DAPI fluorescent dye and the λ -DNA molecule under high (174 mM) and low (34 mM) ionic strengths. Firstly, we have measured the changes on the mechanical properties (persistence and contour lengths) of the DNA-DAPI complexes as a function of the dye concentration in the sample. Then, we use recently developed models in order to connect the behavior of both mechanical properties to the physical chemistry of the interaction. Such analysis has allowed us to identify and to decouple two main binding modes, determining the relevant physicochemical (binding) parameters for each of these modes: minor groove binding, which saturates at very low DAPI concentrations ($C_T \sim 0.50 \mu\text{M}$) and presents equilibrium binding constants of the order of $\sim 10^7 \text{ M}^{-1}$ for the two ionic strengths studied; and intercalation, which starts to play a significant role only after the saturation of the first mode, presenting much smaller equilibrium binding constants ($\sim 10^5 \text{ M}^{-1}$).

KEYWORDS

DAPI, DNA, binding isotherm, optical tweezers

1 | INTRODUCTION

DNA fluorescent dyes are molecules that bind along the biopolymer allowing its visualization in experimental techniques such as fluorescence microscopy and gel electrophoresis. Important examples are the compounds from the Hoechst family, YO, YOYO, ethidium bromide, and DAPI. These molecules present a variety of different binding modes when interacting to DNA. Ethidium bromide, for example, is a classic intercalator.^[1,2] The Hoechst compounds are mostly known as minor groove binders,^[3,4] although intercalation can also occur at low dye concentrations.^[5] YO and YOYO, however, present both major groove binding and intercalation.^[6–8] Although the general aspects of the interactions between these compounds and the DNA molecule are well understood, many peculiarities remain unknown and are subject of recent research.^[2,5,8,9] Characterizing in detail the physical chemistry of such interactions, as well as the dye effects on the DNA mechanics is a fundamental issue for optimizing the use of these compounds in various types of experiments. In addition, such understanding can also provide key insights to the development of more efficient dyes.

DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole; Figure 1) is a synthetic dye much used to visualize living cells as well as single DNA molecules in fluorescence microscopy. Previous works have found that the molecule binds preferentially to the DNA minor groove in AT-rich regions, but can exhibit different binding modes depending on the DNA sequence and/or on the buffer conditions, including intercalation at CG-rich regions.^[10–15] Nevertheless, some important questions remain unknown, for example: (a) Are the different binding modes coupled or independent? (b) How the ionic strength of the surrounding buffer affects the binding mechanism(s) and the physicochemical (binding) parameters of the interaction? (c) How the mechanical properties of the DNA-DAPI complexes vary as a function of the dye concentration and how the ionic strength affects such properties?

In this work, we use force spectroscopy in order to investigate the interaction between the DAPI dye and the λ -DNA molecule under high (174 mM) and low (34 mM) ionic strengths, to characterize in detail the binding mechanisms and to answer the above questions. Firstly, we have measured

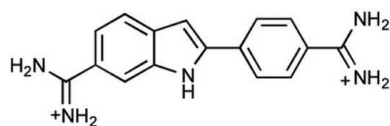


FIGURE 1 Chemical structure of the DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) dye

the changes on the persistence and contour lengths of the DNA-DAPI complexes as the dye concentration in the sample increases. Then, we use recently developed models in order to connect the behavior of both mechanical properties to the physical chemistry of the interaction.^[16,17] Such analysis has allowed us to identify and to decouple two main binding modes, determining the relevant binding parameters for each of these modes in each ionic strength and thus, answering the above questions.

2 | MATERIALS AND METHODS

Our samples consist of λ -DNA molecules (New England Biolabs) end-labeled with biotin in a Phosphate Buffered Saline (PBS) solution. The measurements were performed in two different ionic strengths ($I_1 = 174$ mM and $I_2 = 34$ mM), to investigate the role of this parameter on the DAPI interaction with λ -DNA. The composition of the two PBS buffers are the following. (1) PBS 174 mM: 4.375 mM of Na_2HPO_4 , 1.25 mM of NaH_2PO_4 and 140 mM of NaCl; total ionic strength $I_1 = 174$ mM. (2) PBS 34 mM: 4.375 mM of Na_2HPO_4 and 1.25 mM of NaH_2PO_4 (no NaCl); total ionic strength $I_2 = 34$ mM. The sample chamber consists of an o-ring glued in the surface of a glass coverslip, where the working solution is deposited. One end of the DNA molecules is attached to the coverslip surface, which is coated with streptavidin,^[18] while the other end is attached to a streptavidin-coated polystyrene bead with a diameter of 3 μm (Bangs Labs). DAPI was purchased from Sigma-Aldrich (Cat. D9542) and used without further purification.

Our optical tweezers consist of a 1064 nm ytterbium-doped fiber laser (IPG Photonics) operating in the TEM₀₀ mode, mounted on a Nikon Ti-S inverted microscope with a 100 \times NA 1.4 objective. The tweezers is previously calibrated by using the Stokes force calibration procedure before the experiments. Once calibrated, the apparatus is used to trap the polystyrene bead attached to a DNA molecule. By moving the microscope stage using a piezoelectric actuator, we stretch the DNA while monitoring the changes of the bead position in the tweezers' potential well, using videomicroscopy. To guarantee that the chemical equilibrium of the complexes will not be much disturbed by the molecule

manipulation, we limit the maximum stretching forces to ~ 2 pN, working therefore within the entropic regime. The Marko-Siggia worm-like chain (WLC)^[19] expression for the entropic force is then used to fit the experimental data and to extract the basic mechanical parameters: the persistence length A and the contour length L .

Before adding the dye, the particular bare DNA molecule chosen to perform the experiments is carefully tested by performing at least 6 repeated stretching measurements in order to obtain the average values and the error bars (standard error of the mean) of the mechanical properties. The results obtained are $A_0 = (46.6 \pm 2.5)$ nm and $L_0 = (16.7 \pm 0.4)$ μm in PBS 174 mM; and $A_0 = (46.0 \pm 0.9)$ nm and $L_0 = (16.5 \pm 0.3)$ μm in PBS 34 mM. DAPI is then introduced in the sample chamber by using micropipettes, maintaining the same DNA molecule tethered by the tweezers. We wait ~ 30 min before performing the subsequent measurements. We have found that this time interval is sufficient for the DNA-DAPI complexes to achieve the chemical equilibrium, verifying that both mechanical properties stabilize at their equilibrium values after such time. Thus, we determine the average mechanical properties and the error bars of this particular λ -DNA-DAPI complex at the chosen dye concentration, by performing six repeated stretching experiments. Then, the series of stretching experiments were repeated scanning various DAPI concentrations. Finally, to evaluate the variability of the results over different DNA molecules, we use different samples to repeat the entire experiment (scanning all the chosen concentrations) for six different DNA molecules. The results and error bars reported below in Figures 4 and 6 for the mechanical properties are averages over these six different DNA molecules. All experiments

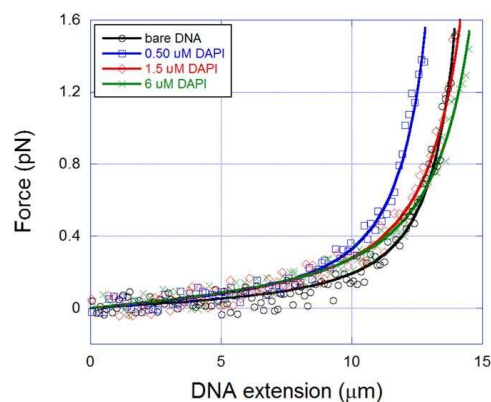


FIGURE 2 Representative force-extension curves obtained with our methodology in the PBS 174 mM buffer, for different DAPI concentrations. The WLC fittings are also shown (solid lines)

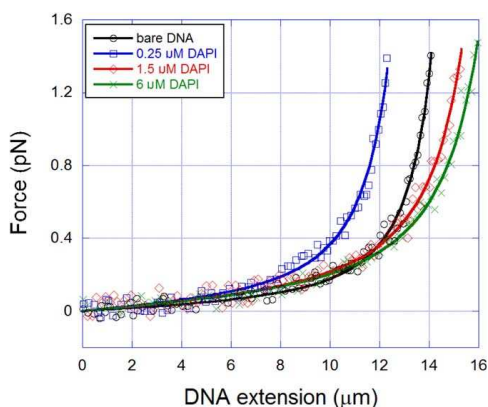


FIGURE 3 Representative force-extension curves obtained with our methodology in the PBS 34 mM buffer, for different DAPI concentrations. The WLC fittings are also shown (solid lines)

were carried out at room temperature (23°C). More details about the experimental methods and procedures can be found in ref. [20].

3 | RESULTS AND DISCUSSION

3.1 | A force-extension data

In Figure 2, we show representative force-extension curves obtained with our methodology in the PBS 174 mM buffer, for various DAPI concentrations. The WLC fittings are also shown (solid lines). Observe that the data dispersion due to the Brownian fluctuations of the tethered bead is small, and the WLC fittings are accurate, returning the mechanical parameters (persistence and contour lengths) with a very good precision. In Figure 3, we show similar data obtained in the PBS 34 mM buffer.

Complete details on the procedure used to obtain the force-extension curves and the WLC fittings can be found in our ref. [20].

3.2 | The persistence length presents a simple monotonic decrease as DAPI binds to DNA

In Figure 4, we show the persistence length (A) of the DNA-DAPI complexes as a function of the DAPI total concentration in the sample (C_T), obtained in the PBS 174 mM (black circles) as well as in the PBS 34 mM buffer (red squares). Observe that in both cases the persistence length presents a simple monotonic decrease as a function of the DAPI concentration. A similar behavior was previously reported by other authors in experiments, which use other types of DNA

and different experimental techniques such as atomic force microscopy and fluorescence microscopy.^[19,15,21,22] Such result strongly suggests that groove binding is the main mode of interaction between DAPI and λ -DNA, a conclusion also achieved by these cited works. In fact, recently we have shown that intercalation in general increases the DNA persistence length when measured in the force regime < 2 pN.^[2,20] Such result was also obtained by authors that use non-stretching (zero force) techniques,^[21,23–28] although experiments performed in a higher force regime can lead to different results.^[29,30]

DAPI is a divalent cationic (2+) molecule^[9] (see Figure 1), and therefore neutralizes significantly the negative phosphate backbone of the double-helix. The decrease observed here for the persistence length is surely related to the screening of the negative charges, which reduces the segment-segment repulsion along the contour of the DNA molecule. Therefore, there is an increase on the average number of bending fluctuations, corresponding to a decrease on the WLC persistence length. In fact, by using atomic force microscopy, Japaridze et al. have visualized an increase in the average number of effective bendings of a 1.4 kbp DNA as the DAPI concentration increases in the sample. Recently, Wang et al. have also reported a decrease on the persistence length of λ -DNA fragments as the DAPI concentration increases in the sample.^[22]

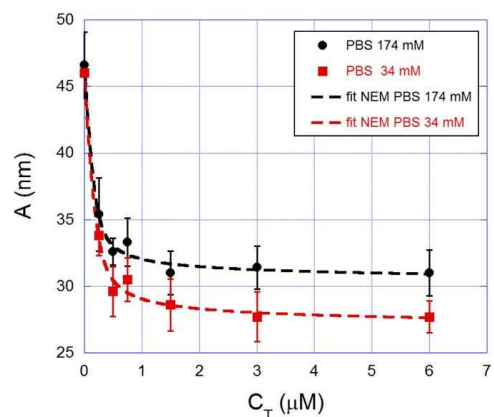


FIGURE 4 Persistence length (A) of the DNA-DAPI complexes as a function of the DAPI total concentration in the sample (C_T), obtained in the PBS 174 mM (black circles) as well as in the PBS 34 mM buffer (red squares). Observe that the persistence length presents a simple monotonic decrease as a function of the DAPI concentration. Fittings to the model discussed in Section “The physical chemistry of the DNA-DAPI interaction can be deduced from the mechanical measurements” are also shown (dashed lines)

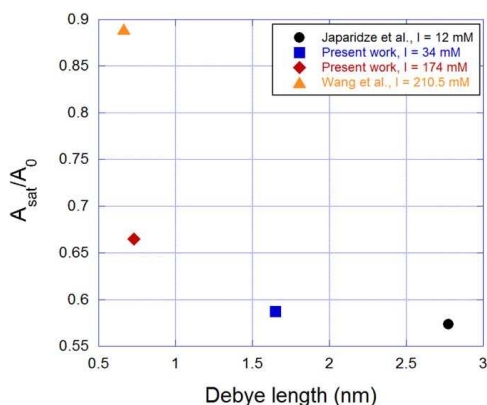


FIGURE 5 Persistence length obtained at saturation (A_{sat}) normalized by the bare DNA persistence length (A_0) as a function of the Debye length. The strong decrease of A_{sat} evidences the important role of the electrostatic effects in the DNA-DAPI interaction

The ionic strength has a significant effect on the persistence length behavior, as expected due to the cationic nature of the DAPI dye. Observe in fact that both curves shown in Figure 4 start from very close values ($A_0 \sim 46$ nm) obtained for the bare DNA molecule in these buffers, and saturate at ~ 31 nm in PBS 174 mM and at ~ 27 nm in PBS 34 mM. These results show that: (a) the difference in the two ionic strengths used here do not affect the bare DNA persistence length, a result also verified by other authors^[31]; and (b) when DAPI binds to DNA, the electrostatic character of the interaction is evidenced for lower ionic strengths, which is accompanied by higher changes on the mechanical properties of the DNA-dye complexes.^[20,32]

To advance in the above discussion, in Figure 5 we show the behavior of the persistence length obtained at saturation (A_{sat}) normalized by the bare DNA persistence length (A_0) as a function of the Debye length, the characteristic length in an electrolyte solution that measures how far the net electrostatic effects persist. Such parameter can be estimated directly from the ionic strength I of the electrolyte solution by the approximate formula $0.304/\sqrt{I}$, which gives the Debye length in nanometers if the ionic strength is expressed in molar units. We have also included in the figure the results obtained from the data of Japaridze et al.^[9] and Wang et al.,^[22] which have used ionic strengths different from the two ones used in this work.

Observe that the persistence length obtained at saturation decreases strongly as a function of the Debye length, evidencing the important role of the electrostatic effects in the DNA-DAPI interaction. Basically, when one increases the ionic strength of the buffer, the Debye length decreases and

the persistence length presents small changes relative to the bare DNA value. In other words, Figure 5 explicitly shows that electrostatic modulates the persistence length behavior, as anticipated two paragraphs above. This result explains the different values of the persistence length measured in the three works compared in Figure 5.

3.3 | The contour length presents an unusual nonmonotonic behavior

In Figure 6, we show the contour length of the same DNA-DAPI complexes, normalized by the value obtained for the bare DNA (L/L_0), as a function of C_T . Observe that this mechanical property presents an unusual nonmonotonic behavior: firstly, it presents a slight decrease for very small DAPI concentrations, then increasing for higher concentrations. Such behavior suggests that two different binding modes occur in the interaction between DAPI and λ -DNA under our experimental conditions. This first binding mode is dominant for low DAPI concentrations ($C_T \leq 0.50$ μM) and is responsible for the slight decrease of the contour length verified in this concentration range. The second binding mode, otherwise, starts to play a role for $C_T \geq 0.50$ μM and is responsible for the increase of the contour length verified for this concentration range.

Many works have concluded that DAPI binds preferentially to the DNA minor groove in AT-rich regions.^[10,11,14] Therefore, we propose that the first binding mode observed here for $C_T \leq 0.50$ μM is minor groove binding at the AT-rich regions of the λ -DNA molecule. The slight decrease of the contour length observed at this concentration range is

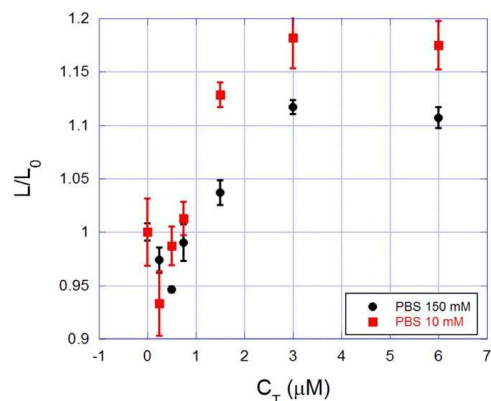


FIGURE 6 Contour length of the same DNA-DAPI complexes, normalized by the value obtained for the bare DNA (L/L_0), as a function of C_T . Observe that this mechanical property presents an unusual nonmonotonic behavior: firstly, it presents a slight decrease for very low DAPI concentrations, then increasing for higher concentrations

related to the charge of DAPI molecule. In fact, although divalent cationic molecules are not capable to induce DNA condensation, sometimes they can induce a decrease on the apparent contour length by increasing the number of effective bendings along the double-helix structure.^[17,33]

However, the increase of the contour length observed for $C_T \geq 0.50 \mu\text{M}$ is probably related to intercalative binding. Such binding mode was reported in the literature when DAPI is interacting with CG-rich DNAs,^[10,11] or when the dye concentration is high.^[14,15] Observe that the increase of the contour length is higher in the PBS 34 mM buffer, evidencing again the role of the ionic strength on the DNA-DAPI interaction.

Japaridze et al. have also found a non-monotonic behavior for the contour length of their DNA-DAPI complexes, although the changes are much smaller (<5%) than those reported here and are within the error bars reported by the authors.^[9] Such difference may be related mainly to two facts: (a) the authors use a different type of DNA with only 1.4 kbp, and it is well established that the DNA-DAPI interaction depends on the base-pair sequence^[10,11,13,14]; and (b) the authors' buffer has divalent cations (Mg^{2+}), which certainly influences the DNA-DAPI interaction due to the relevant electrostatic component of the interaction, as discussed previously. Wang *et al.*,^[22] however, have found a constant contour length as DAPI binds to their λ -DNA fragments. Here, the discrepancy from our results may be mainly due to the fact that they use higher ionic strengths, which weakens the DNA-DAPI interaction, as discussed. The fact that these authors have found a very small change on the persistence length (see Figure 5) supports such conclusion.

Returning to our data, a qualitative analysis of the two mechanical properties suggests the following scenario for the interaction of DAPI with λ -DNA. The main binding mode is minor groove binding, which occurs and probably saturates for very low dye concentrations ($C_T \sim 0.50 \mu\text{M}$). Such binding mode induces a decrease on both the persistence and contour lengths, an effect related to the screening of the phosphate backbone as well as to the intrinsic changes on the DNA conformation to accommodate the bound dye molecules at the minor groove sites. A second binding mode (intercalation) starts to play a significant role for $C_T \geq 0.50 \mu\text{M}$, increasing the DNA contour length. Such mode does not cause any significant change on the persistence length in this case, probably because the first mode (minor groove binding) is dominant to determine the flexibility of the complexes formed. The ionic strength of the surrounding buffer significantly affects the behavior of the mechanical properties. In fact, at saturation the persistence length decreases $\sim 33.5\%$ in PBS 174 mM and $\sim 41.3\%$ in PBS 34 mM. The contour length, otherwise, saturates increasing $\sim 11\%$ in PBS 174 mM and $\sim 18\%$ in PBS 34 mM.

3.4 | The physical chemistry of the DNA-DAPI interaction can be deduced from the mechanical measurements

To advance beyond the qualitative discussion drawn above, here we use recently developed models in order to connect the behavior of the mechanical properties to the physical chemistry of the interaction. As we will show in the following sections, such approach applied here to the DNA-DAPI interaction has allowed us to: (a) extract the physicochemical (binding) parameters of the interaction in both buffers; (b) determine the changes of these parameters due to the variation of the ionic strength; and (c) decouple the two different binding modes.

3.5 | Persistence length data can be used to extract the effective global binding parameters

The persistence length data shown in Figure 4 can be used to deduce the effective global binding parameters of the DNA-DAPI interaction. In fact, it was recently shown that a monotonic decrease of such mechanical parameter can be modeled with the equation^[17]

$$\frac{1}{A} = \frac{1-Nr}{A_0} + \frac{Nr}{A_1}, \quad (1)$$

where A_0 is the bare DNA persistence length, A_1 is the local persistence length due to the binding of a single ligand molecule (or a single bound cluster of molecules if they form aggregates), r is the bound site fraction (fraction of bound DNA base-pairs), and N is the exclusion parameter, the average number of DNA base-pairs in which one finds a single bound ligand molecule. The exclusion parameter N is related to the saturation value of the bound site fraction (r_{max}) by $N = 1/r_{\text{max}}$.^[17]

Equation 1 can be linked to a binding isotherm via the parameter r . A very useful isotherm to study DNA interactions with small ligands is the classic McGhee-von Hippel neighbor exclusion model (NEM),^[17,34] which reads

$$\frac{r}{C_f} = K(1-Nr) \left[\frac{1-Nr}{1-(N-1)r} \right]^{N-1}, \quad (2)$$

where K is the equilibrium binding association constant, and C_f is the free ligand concentration in solution, which is related to the total ligand concentration C_T by $C_f = C_T - C_b$, where C_b is the bound ligand concentration. Note that $r = C_b/C_{\text{bp}}$, where C_{bp} is the DNA base-pair concentration in solution.

Here, we have used the NEM binding isotherm plugged into Equation 1 to fit the persistence length data (dashed lines in Figure 4). Observe that we use a single binding isotherm, with a single set of binding parameters, to perform the fitting. This approach has allowed us to the extract the effective

TABLE 1 Persistence length fitting parameters

PBS	K (M^{-1})	N	A_1 (nm)
174 mM	$(10.5 \pm 3.0) \times 10^6$	4.4 ± 0.7	29.7
34 mM	$(8.3 \pm 2.1) \times 10^6$	3.8 ± 0.5	26.3

global binding parameters of the interaction, that is, the parameters considering a single effective binding mode, with a single binding constant. At first sight, this is not the most realistic scenario for the present interaction, since minor groove binding and intercalation are both probably present here. Nevertheless, the persistence length data shown in Figure 4 cannot be used to decouple different binding modes, because a model containing two sets of binding parameters will have an excess of adjustable parameters to fit a very simple curve (monotonic decay). Such a fitting returns results with very high error bars, invalidating any conclusion. Thus, the only suitable option here is to try to find the effective global binding parameters of the interaction.^[17] The technical details of our fitting procedure were previously described.^[17]

The parameters obtained from the fittings are shown in Table 1. The parameters A_0 (the persistence length of bare DNA) and A_1 (the saturation value) were maintained fixed in the fitting since they were easily determined from the experimental data of Figure 4, thus reducing the number of adjustable parameters.

These results allow us to draw some important conclusions. Firstly, the fact that the classic McGhee-von Hippel isotherm (Equation 2) has fitted the experimental data shows that the DNA-DAPI interaction is non-cooperative, at least under our experimental conditions. In fact, Equation 2 works well only for noncooperative DNA-ligand binding reactions, and a more intricate version of the model is needed to take cooperative effects into account.^[34] This result was also checked by fitting our experimental data with the Hill binding isotherm (data not shown), the simplest binding model which takes cooperativity into account.^[17] From these fittings we have found Hill exponents very close to 1 for both ionic strengths, showing that this interaction is really noncooperative.^[17]

Secondly, the values found for the equilibrium binding constant ($\sim 10^7 M^{-1}$) and for the exclusion parameter (~ 4) in both ionic strengths are compatible with a minor groove binding mechanism.^[10,11,13,35] In fact, the equilibrium binding constants determined here are in agreement with other investigations that have measured a minor groove binding of DAPI to the DNA molecule.^[10,13,35] The result $N \sim 4$ is also in very good agreement with x-ray diffraction measurements that have elucidated the structure of DAPI bound to the DNA minor groove.^[36,37] Intercalative binding, on the other hand, usually have smaller values for these parameters, with binding constants typically on the order of $\sim 10^5 M^{-1}$ and exclusion parameters between 2 and 3.^[13,38,39]

3.6 | Contour length data can be used to decouple the intercalative binding mode

As mentioned in Section “The contour length presents an unusual nonmonotonic behavior,” intercalation starts to play a significant role for $C_T \geq 0.50 \mu M$, increasing the DNA contour length. We can then fit the data of Figure 6 for this concentration range to the McGhee-von Hippel NEM.

For typical intercalators, the contour length L can be straightforwardly connected to the binding isotherm with the relation^[17]

$$\frac{L-L_0}{L_0} = \gamma r, \quad (3)$$

where L_0 is the initial value of the contour length and γ is the ratio between the extension elongated per bound ligand and the distance between two consecutive base-pairs (~ 0.34 nm). For typical intercalators, $\gamma = 1$.^[1,40]

In Figure 7, we show the fitting of the model (Equation 2 plugged into Equation 3) to our experimental data corresponding to the concentration range where the contour length increases. Here L_0 is the minimum value of the contour length obtained from the data of Figure 6, and not the bare DNA contour length, because this mechanical parameter starts to increase only at $C_T = 0.50 \mu M$. Observe that the model explains well the experimental data, and from the fitting, we can extract the binding parameters corresponding to the intercalative binding mode, which are shown in Table 2.

The values obtained for the binding parameters K and N are on the same order of magnitude of the results found for typical intercalators.^[1,20,38,41–43] In addition, the fact that we

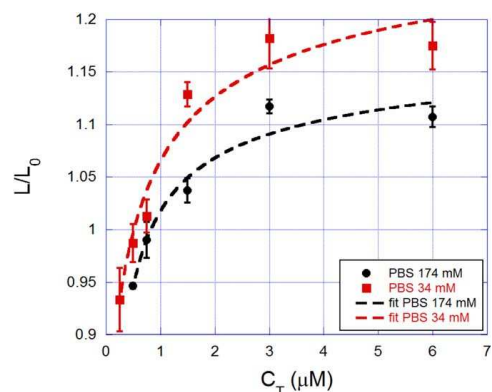


FIGURE 7 Fittings of the contour length data of Figure 6, corresponding to the concentration range where the contour length increases, to the model (Equation 2 plugged into Equation 3). Observe that the model explains well the experimental data, and from the fitting, we can extract the binding parameters corresponding to the intercalative binding mode

TABLE 2 Contour length fitting parameters-intercalative binding

PBS	K (M^{-1})	N	γ
174 mM	$(2.8 \pm 0.6) \times 10^5$	3.3 ± 0.4	0.9 ± 0.1
34 mM	$(3.5 \pm 0.7) \times 10^5$	2.5 ± 0.5	1.0 ± 0.1

have found $\gamma=1$ for both data is a strong indication that the binding mode responsible for the increase of the contour length here is really intercalation. In fact, groove binders and other types of ligands that increase the contour length by changing the DNA tertiary structure usually present $\gamma \ll 1$.^[32,44] Thus, the increase on this mechanical property measured here is due to DAPI intercalation into the DNA double-helix.

Finally, observe that the values found for the equilibrium binding constants in the two ionic strengths are approximately two orders of magnitude smaller than the results found in Section “The physical chemistry of the DNA-DAPI interaction can be deduced from the mechanical measurements” for the effective (resulting) binding. Such result shows that DAPI has a much higher binding affinity for the minor groove than for intercalating in λ -DNA. In addition, as discussed before, the behavior of the persistence length shown in Figure 4 is determined by the minor groove binding. Thus, as a first approach, it is reasonable to consider the minor groove binding parameters as the ones determined by the persistence length fittings in Section “The physical chemistry of the DNA-DAPI interaction can be deduced from the mechanical measurements.” Such discussion allows one to conclude that minor groove binding is the main mode of interaction between DAPI and λ -DNA, having a binding affinity approximately two orders of magnitude higher than the intercalative binding mode. For this reason, groove binding saturates at very low DAPI concentrations ($C_T = 0.50 \mu M$). Intercalation, otherwise, starts to play a significant role only after the saturation of groove binding, at DAPI concentrations $C_T \geq 0.50 \mu M$, but with a much smaller binding affinity.

4 | CONCLUSION

We have used single molecule force spectroscopy in order to investigate the interaction between the DAPI dye and the λ -DNA molecule under high (174 mM) and low (34 mM) ionic strengths. Such measurements allowed us to show that the persistence length of the complexes formed presents a simple monotonic decay associated with a minor groove binding mode, which is the main binding mechanism for this system. Such mode saturates for very low DAPI concentrations ($C_T = 0.50 \mu M$) and presents equilibrium binding con-

stants of the order of $\sim 10^7 M^{-1}$. The second binding mode detected here, intercalation, starts to play a significant role only after the saturation of the first mode, that is, for $C_T \geq 0.50 \mu M$, and presents much smaller equilibrium binding constants ($\sim 10^5 M^{-1}$). No significant cooperativity has been detected here in any situation, indicating that DAPI molecules bind individually along the double-helix. Finally, the role of the ionic strength on the DNA-DAPI interaction was also investigated, including experimental data from other groups. We have shown that the ionic strength of the buffer solution determines the quantitative behavior of the mechanical properties of the DNA-DAPI complexes, explaining the different results found in the literature.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Brazilian agencies: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

REFERENCES

- [1] A. Sischka, K. Tönsing, R. Eckel, S. D. Wilking, N. Sewald, R. Rios, D. Anselmetti, *Biophys. J.* **2005**, *88*, 404.
- [2] R. F. Bazoni, C. H. M. Lima, E. B. Ramos, M. S. Rocha, *Soft Matt.* **2015**, *11*, 4306.
- [3] M. Saito, M. Kobayashi, S. Iwabuchi, Y. Morita, Y. Takamura, E. Tamiya, *J. Biochem.* **2004**, *136*, 813.
- [4] C. Bailly, P. Colson, J. Henichart, C. Houssier, *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 3705.
- [5] E. F. Silva, E. B. Ramos, M. S. Rocha, *J. Phys. Chem.* **2013**, *B117*, 7292.
- [6] R. Eckel, R. Ros, A. Ros, S. D. Wilking, N. Sewald, D. Anselmetti, *Biophys. J.* **2003**, *85*, 1968.
- [7] P. L. Hamilton, D. P. Arya, *Prod. Rep.* **2012**, *29*, 134.
- [8] K. Günther, M. Mertig, R. Seidel, *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 6526.
- [9] A. Japaridze, A. Benke, S. Renevey, C. Benadiba, G. Dietler, *Macromolecules* **2015**, *48*, 1860.
- [10] D. Banerjee, S. K. Pal, *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 1016.
- [11] W. D. Wilson, F. A. Tanius, H. J. Barton, R. L. Jones, L. Strekowskit, D. W. Boykin, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 5008.
- [12] W. D. Wilson, F. A. Tanius, H. J. Barton, R. L. Jones, K. Fox, R. L. Wydra, L. Strekowskit, *Biochemistry* **1990**, *29*, 8452.
- [13] G. Manzini, L. Xodo, M. L. Barcellona, F. Quadrifoglio, *Proc. Int. Symp. Biomol. Struct. Interactions* **1985**, *8*, 699.

- [14] S. Eriksson, S. K. Kim, M. Kubista, B. Nordén, *Biochemistry* **1993**, *32*, 2987.
- [15] A. Larsson, B. Akerman, M. Jonsson, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 3252.
- [16] L. Siman, I. S. S. Carrasco, J. K. L. da Silva, M. C. Oliveira, M. S. Rocha, O. N. Mesquita, *Phys. Rev. Lett.* **2012**, *109*, 248103.
- [17] M. S. Rocha, *Integr. Biol.* **2015**, *7*, 967.
- [18] I. Amitani, B. Liu, C. C. Dombrowski, R. J. Baskin, S. C. Kowalczykowski, *Methods Enzymol.* **2010**, *472*, 261.
- [19] J. F. Marko, E. D. Siggia, *Macromolecules* **1995**, *28*, 8759.
- [20] E. F. Silva, R. F. Bazoni, E. B. Ramos, M. S. Rocha, *Biopolymers* **2017**, *107*, e22998.
- [21] K. Yoshikawa, Y. Matsuzawa, K. Minagawa, M. Doi, M. Matsumoto, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1992**, *188*, 1274.
- [22] Y. Wang, A. Sischka, V. Walhorn, K. Tönsing, D. Anselmetti, *Biophys. J.* **2016**, *111*, 1604.
- [23] K. E. Reinert, *Nucleic Acids. Res.* **1983**, *11*, 3411.
- [24] S. R. Quake, H. Babcock, S. Chu, *Nature* **1997**, *388*, 151.
- [25] Y. Matsuzawa, K. Yoshikawa, *Nucleos. Nucleot.* **1994**, *13*, 1415.
- [26] Y. Matsuzawa, K. Minagawa, K. Yoshikawa, M. Matsumoto, M. Doi, *Nucleic Acids Symp. Ser.* **1991**, *25*, 131.
- [27] G. J. Atwell, W. A. Denny, G. R. Clark, C. J. O'Connor, Y. Matsuzawa, K. Yoshikawa, *J. Phys. Org. Chem.* **1995**, *8*, 597.
- [28] T. Berge, N. S. Jenkins, R. B. Hopkirk, M. J. Waring, J. M. Edwardson, R. M. Henderson, *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 2980.
- [29] J. Lipfert, S. Klijnhout, N. H. Dekker, *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 7122.
- [30] C. U. Murade, V. Subramaniam, C. Otto, M. L. Bennink, *Biophys. J.* **2009**, *97*, 835.
- [31] C. G. Baumann, S. B. Smith, V. A. Bloomfield, C. Bustamante, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1997**, *94*, 6185.
- [32] W. F. P. Bernal, E. F. Silva, M. S. Rocha, *RSC Adv.* **2016**, *6*, 105631.
- [33] F. A. P. Crisafuli, E. C. Cesconetto, E. B. Ramos, M. S. Rocha, *Integr. Biol.* **2012**, *2012*, 568.
- [34] J. D. McGhee, P. H. von Hippel, *J. Mol. Biol.* **1974**, *86*, 469.
- [35] B. H. Geierstanger, D. E. Wemmer, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1995**, *24*, 463.
- [36] T. A. Larsen, D. S. Goodsell, D. Cascio, K. Grzeskowiak, R. E. Dickerson, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1989**, *7*, 477.
- [37] D. Vlieghe, J. Sponer, L. V. Meervelt, *Biochemistry* **1999**, *38*, 16443.
- [38] M. S. Rocha, M. C. Ferreira, O. N. Mesquita, *J. Chem. Phys.* **2007**, *127*, 105108.
- [39] K. R. Chaurasiya, T. Paramanathan, M. J. McCauley, M. C. Williams, *Phys. Life Rev.* **2010**, *7*, 299.
- [40] H. Fritzsche, H. Triebel, J. B. Chaires, N. Dattagupta, D. M. Crothers, *Biochemistry* **1982**, *21*, 3940.
- [41] J. B. Chaires, N. Dattagupta, D. M. Crothers, *Biochemistry* **1982**, *21*, 3933.
- [42] B. Gaugain, J. Barbet, N. Capelle, B. P. Roques, J. L. Pecq, *Biochemistry* **1978**, *17*, 5078.
- [43] L. A. Reis, E. B. Ramos, M. S. Rocha, *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117*, 14345.
- [44] K. E. Reinert, *J. Mol. Struct. Dyn.* **1999**, *17*, 311.

How to cite this article: Reis LA, Rocha MS. DNA interaction with DAPI fluorescent dye: Force spectroscopy decouples two different binding modes. *Biopolymers*. 2017;107:e23015. <https://doi.org/10.1002/bip.23015>

Referências Bibliográficas

- [1] Arthur Ashkin. “Acceleration and trapping of particles by radiation pressure”. *Physical review letters*, 24(4):156, 1970.
- [2] James D McGhee and Peter H von Hippel. “Theoretical aspects of DNA-protein interactions: co-operative and non-co-operative binding of large ligands to a one-dimensional homogeneous lattice”. *Journal of molecular biology*, 86(2):469–489, 1974.
- [3] Debapriya Banerjee and Samir Kumar Pal. “Dynamics in the DNA recognition by DAPI: exploration of the various binding modes”. *The Journal of Physical Chemistry B*, 112(3):1016–1021, 2008.
- [4] W David Wilson, Fariat A Tanious, Henryk J Barton, Robert L Jones, Keith Fox, Roman L Wydra, and Lucjan Strekowski. “DNA sequence dependent binding modes of 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)”. *Biochemistry*, 29(36):8452–8461, 1990.
- [5] Svante Eriksson, Seog K Kim, Mikael Kubista, and Bengt Norden. “Binding of 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) to AT regions of DNA: evidence for an allosteric conformational change”. *Biochemistry*, 32(12):2987–2998, 1993.
- [6] Ralf Dahm. “friedrich miescher and the discovery of dna”. *Developmental biology*, 278(2):274–288, 2005.
- [7] Anthony J.F. Griffiths, Susan R. Wessler, Richard C. Lewontin, and Sean B. Carroll. “Introdução à genética”. Guanabara Koogan, 2002.
- [8] A. Schrank. “*Biologia Molecular Básica*”. Porto Alegre, Mercado, 2003.
- [9] Raniella Falchetto Bazoni. “Efeitos de Forças Externas nas Propriedades Mecânicas de Complexos DNA-ligantes”. 2016.
- [10] Eduardo Ferreira da Silva. “estudo da interação dna-hoescht (33258) por pinçamento ótico”. 2013.
- [11] Márcio Santos” Rocha. “*Pinças Ópticas: Experimento, Teoria e Aplicação no estudo da interação DNA-fármacos*. PhD thesis, Tese de Doutorado, UFMG, 2008.
- [12] Fabiano Augusto de Paula Crisafuli. “*Caracterização da interação DNA-cisplatina usando pinça óptica e videomicroscopia*”. 2012.

- [13] John F Marko and Eric D Siggia. “*Stretching dna*”. *Macromolecules*, 28(26):8759–8770, 1995.
- [14] EF Silva, EB Ramos, and MS Rocha. “*Dna interaction with hoechst 33258: stretching experiments decouple the different binding modes*”. *The Journal of Physical Chemistry B*, 117(24):7292–7296, 2013.
- [15] Arthur Ashkin and JM Dziedzic. “*Optical levitation by radiation pressure*”. *Applied Physics Letters*, 19(8):283–285, 1971.
- [16] A Ashkin and JM Dziedzic. “*Optical levitation in high vacuum*”. *Applied Physics Letters*, 28(6):333–335, 1976.
- [17] Arthur Ashkin, JM Dziedzic, JE Bjorkholm, and Steven Chu. “*Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles*”. *Optics letters*, 11(5):288–290, 1986.
- [18] Arthur Ashkin. “*Optical trapping and manipulation of neutral particles using lasers*”. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(10):4853–4860, 1997.
- [19] Márcio Santos Rocha. “*Pinças ópticas: experimento e teoria*”. PhD thesis, Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil, 2004.
- [20] A Mazolli, PA Maia Neto, and HM Nussenzveig. “*Theory of trapping forces in optical tweezers*”. In *Proceedings of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, volume 459, pages 3021–3041. The Royal Society, 2003.
- [21] PA Maia Neto and HM Nussenzveig. “*Theory of optical tweezers*”. *EPL (Europhysics Letters)*, 50(5):702, 2000.
- [22] Mikael Kubista, Bjoern Aakerman, and Bengt Norden. “*Characterization of interaction between DNA and 4', 6-diamidino-2-phenylindole by optical spectroscopy*”. *Biochemistry*, 26(14):4545–4553, 1987.
- [23] Jan Kapuscinski. “*DAPI: a DNA-specific fluorescent probe*”. *Biotechnic & Histochemistry*, 2009.
- [24] Steven B Smith, Yujia Cui, and Carlos Bustamante. “*Overstretching B-DNA: the elastic response of individual double-stranded and single-stranded DNA molecules*”. *Science*, 271(5250):795, 1996.
- [25] Fabiano Augusto de Paula Crisafuli et al. “*Caracterização das interações do DNA com as moléculas Actinomicina D e GelRed*”. 2016.
- [26] Michelle D Wang, Hong Yin, Robert Landick, Jeff Gelles, and Steven M Block. “*Stretching DNA with optical tweezers*”. *Biophysical journal*, 72(3):1335, 1997.

- [27] Aleksandre Japaridze, Alexander Benke, Sylvain Renevey, Carine Benadiba, and Giovanni Dietler. “*Influence of DNA Binding Dyes on Bare DNA Structure Studied with Atomic Force Microscopy*”. *Macromolecules*, 48(6):1860–1865, 2015.
- [28] Anette Larsson, Björn Åkerman, and Mats Jonsson. “*DAPI staining of DNA: effect of change in charge, flexibility, and contour length on orientational dynamics and mobility of the DNA during agarose gel electrophoresis*”. *The Journal of Physical Chemistry*, 100(8):3252–3263, 1996.
- [29] Kenichi Yoshikawa, Yukiko Matsuzawa, Keiji Minagawa, Masao Doi, and Mitsuhiro Matsumoto. “*Opposite effect between intercalator and minor groove binding drug on the higher order structure of DNA as is visualized by fluorescence microscopy*”. *Biochemical and biophysical research communications*, 188(3):1274–1279, 1992.
- [30] Ying Wang, Andy Sischka, Volker Walhorn, Katja Tönsing, and Dario Anselmetti. “*Nanomechanics of Fluorescent DNA Dyes on DNA Investigated by Magnetic Tweezers*”. *Biophysical Journal*, 111(8):1604–1611, 2016.
- [31] EF Silva, RF Bazoni, EB Ramos, and MS Rocha. “*DNA-doxorubicin interaction: New insights and peculiarities*”. *Biopolymers*, 107(3), 2017.
- [32] WFP Bernal, EF Silva, and MS Rocha. “*Unraveling the physical chemistry and the mixed binding modes of complex DNA ligands by single molecule stretching experiments*”. *RSC Advances*, 6(107):105631–105637, 2016.
- [33] W David Wilson, Fariat A Tanious, Henryk J Barton, Robert L Jones, Lucjan Strekowski, and David W Boykin. “*Binding of 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) to GC and mixed sequences in DNA: intercalation of a classical groove-binding molecule*”. *Journal of the American Chemical Society*, 111(13):5008–5010, 1989.
- [34] MS Rocha. “*Extracting physical chemistry from mechanics: a new approach to investigate DNA interactions with drugs and proteins in single molecule experiments*”. *Integrative Biology*, 7(9):967–986, 2015.
- [35] G Manzini, L Xodo, ML Barcellona, and F Quadrifoglio. “*Interaction of 4'-6-diamidino-2-phenylindole 2HCl with synthetic and natural deoxy-and ribonucleic acids*”. *Journal of Biosciences*, 8(3-4):699–711, 1985.
- [36] Bernhard H Geierstanger and David E Wemmer. “*Complexes of the minor groove of DNA*”. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, 24(1):463–493, 1995.
- [37] Andy Sischka, Katja Toensing, Rainer Eckel, Sven David Wilking, Norbert Sewald, Robert Ros, and Dario Anselmetti. “*Molecular mechanisms and kinetics between DNA and DNA binding ligands*”. *Biophysical journal*, 88(1):404–411, 2005.

- [38] MS Rocha, MC Ferreira, and ON Mesquita. “*Transition on the entropic elasticity of DNA induced by intercalating molecules*”. *The Journal of chemical physics*, 127(10):105108, 2007.
- [39] Hartmut Fritzsche, Hans Triebel, Jonathan B Chaires, Nanibhushan Dattagupta, and Donald M Crothers. “*Studies on the interaction of anthracycline antibiotics and deoxyribonucleic acid: Geometry of intercalation of iremycin and daunomycin*”. *Biochemistry*, 21(17):3940–3946, 1982.
- [40] LA Reis, EB Ramos, and MS Rocha. “*DNA interaction with diaminobenzidine studied with optical tweezers and dynamic light scattering*”. *The Journal of Physical Chemistry B*, 117(46):14345–14350, 2013.
- [41] Karl-Ernst Reinert. “*DNA multimode interaction with berenil and pentamidine; double helix stiffening, unbending and bending*”. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 17(2):311–331, 1999.