

FABIANO AUGUSTO DE PAULA CRISAFULI

CARACTERIZAÇÃO DAS INTERAÇÕES DO DNA COM AS
MOLÉCULAS ACTINOMICINA D E GELRED

Tese apresentada à Universidade Federal
de Viçosa, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em Física,
para obtenção do título de *Doctor Scien-
tiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2016

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

T

C928c
2016

Crisafuli, Fabiano Augusto de Paula, 1984-
Caracterização das interações do DNA com as moléculas
Actinomicina D e GelRed / Fabiano Augusto de Paula Crisafuli.
– Viçosa, MG, 2016.
xiv,116f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndice.

Orientador: Márcio Santos Rocha.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.104-116.

1. Biofísica. 2. Pinça óptica. 3. Actinomicina D. 4. Corantes
flourescentes. 5. Ácidos nucleicos. I. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Física. Programa de Pós-graduação em
Física. II. Título.

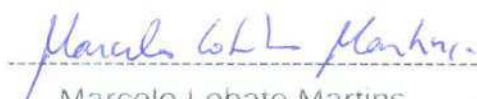
CDD 22. ed. 541.4

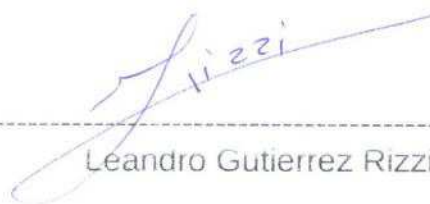
FABIANO AUGUSTO DE PAULA CRISAFULI

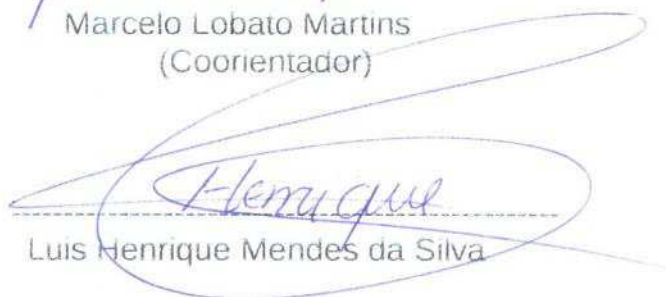
**CARACTERIZAÇÃO DAS INTERAÇÕES DO DNA COM AS MOLÉCULAS
ACTINOMICINA D E GEL RED**

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

APROVADA: 21 de março de 2016.


Marcelo Lobato Martins
(Coorientador)


Leandro Gutierrez Rizzi


Luis Henrique Mendes da Silva


Gerald Weber


Márcio Santos Rocha
(Orientador)

Aos meus pais (*in memoriam*), Carmelo
e Maria Luiza e à minha amada, Cibely.

”Deixem que o futuro diga a verdade e avalie cada um de acordo com o seu trabalho e realizações. O presente pertence a eles, mas o futuro pelo qual eu sempre trabalhei, pertence a mim.”

Nikola Tesla (1856-1943)

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela capacidade intelectual e pelo amparo necessário para concluir esta importante etapa acadêmica.

Aos meus amados pais, Carmelo e Maria Luiza, que, apesar do breve tempo de convivência, me ensinaram a “trilhar” os caminhos da honestidade e do amor ao próximo.

À todos os meus familiares, especialmente aos meus amados tios(as), que foram (e ainda são) meus alicerces, sem os quais eu não teria chegado até aqui. Um agradecimento especial ao tio Carlos, pela troca de saberes, ao tio Antônio Carlos, pelas viagens inesquecíveis, à tia Julieta, por todos os telefonemas, à tia Leonor, pelo acolhimento, à tia Beatriz, pela boa vontade, à tia Edith, pelo exemplo de superação e ao tio Luis Felipe (*in memoriam*), pelos grandes ensinamentos e por me mostrar o verdadeiro significado da palavra resignação.

À minha noiva, Cibely, pelo amor e pela dedicação desde os tempos de graduação. Aos seus familiares: Nelson, Tânia e Renato, pelo imenso carinho com o qual me acolheram.

Ao meu grande amigo, Tiago Rocha, pela amizade desde os tempos de infância e por todos os telefonemas ao longo desses anos.

Aos grandes amigos da Física: Bruno Carvalho, Carlos, Felipe, Saimon, Maurício, André, Júlio, Bruno Valetim, José Antônio, Samuel e Davidson, pela amizade e pelos momentos de descontração.

Aos professores, Márcio Santos Rocha e José Ésio Bessa Ramos Júnior, pelos artigos publicados.

Ao professor, Luis Henrique Mendes da Silva, pela parceria científica e pelos excelentes conselhos que, certamente, nortearão as minhas escolhas profissionais.

À Cooperativa Educacional de Viçosa (COEDUCAR), pela oportunidade de ensinar e, ao mesmo tempo, aprender.

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

Por fim, um agradecimento especial à todas as pessoas que fazem a educação e a ciência progredirem em nosso país.

SUMÁRIO

Agradecimentos	iv
LISTA DE FIGURAS	xii
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
1 Introdução	1
2 As técnicas de caracterização das interações DNA-ligantes	5
2.1 Pinça óptica	5
2.1.1 Montagem experimental	11
2.1.2 Calibração da pinça óptica	13
2.2 Espalhamento dinâmico de luz	17
2.3 Calorimetria isotérmica de titulação	22
3 A interação DNA-Actinomicina D	27
3.1 A Actinomicina D	27
3.2 Construção do porta amostras e preparação da solução DNA-microesferas	29
3.2.1 Preparação das amostras	29
3.2.2 Construção do porta amostras	29
3.2.3 Preparação da solução DNA-microesferas	30
3.3 Procedimento experimental para a realização dos estiramentos	31
3.3.1 Encontrando um bom conjunto DNA-microesferas	31

3.3.2	Realização do estiramento da molécula de DNA	33
3.3.3	Adição do fármaco na amostra	36
3.4	Caracterização da interação DNA-Actinomicina D	37
3.4.1	O modelo de Hill	37
3.4.2	O modelo estatístico de dois sítios	40
3.4.3	Resultados obtidos para a interação DNA-Actinomicina D . . .	43
4	A interação DNA-GelRed	50
4.1	O GelRed	50
4.2	O procedimento experimental	52
4.2.1	Pinça óptica	52
4.2.2	Espalhamento de Luz	52
4.3	Resultados obtidos para a interação DNA-GelRed	53
4.3.1	Resultados obtidos com a pinça óptica	53
4.3.2	Resultados obtidos com o espalhamento de luz	61
5	A interação DNA-intercalantes em soluções contendo Poli(etileno glicol) 8000	65
5.1	O Poli(etileno glicol)	65
5.2	O procedimento experimental	66
5.2.1	Pinça óptica	66
5.2.2	Calorimetria isotérmica de titulação	67
5.3	Resultados obtidos para a interação DNA-intercalantes em soluções contendo Poli(etileno glicol) 8000	68
5.3.1	Resultados obtidos com a pinça óptica	68
5.3.2	Resultados obtidos com a calorimetria isotérmica de titulação .	75
6	Conclusões e Perspectivas	79
	Apêndice: Artigos publicados	81
	Revista <i>Physical Chemistry Chemical Physics</i>	81
	Revista <i>European Biophysics Journal</i>	90
	Revista <i>Biopolymers</i>	97

LISTA DE FIGURAS

2.1	Pressão de radiação. A força resultante, nesse caso, empurra a microesfera no sentido de incidência do feixe.	8
2.2	Efeito da refração. A microesfera está situada na região abaixo do foco e, nesse caso, a força resultante empurra a microesfera para o foco do feixe. . .	9
2.3	Efeito da refração. A microesfera está situada na região acima do foco e, mais uma vez, a força resultante empurra a microesfera para o foco do feixe. . . .	10
2.4	Montagem experimental utilizada para as medidas com a pinça óptica. . . .	12
2.5	(a) Microesfera presa na posição de equilíbrio no poço de potencial gerado pela pinça óptica. (b) Após acionarmos o piezo, a microesfera é empurrada pelo fluido e fica em equilíbrio em uma nova posição no poço de potencial gerado pela pinça óptica. Nessa posição, a força de Stokes, $\vec{F}_S$, é igual, em módulo, à força óptica, $\vec{F}_{OP}$	13
2.6	Gráfico do Δx_P em função de v , obtido no processo de calibração da pinça óptica, via método de Stokes. Círculos vermelhos: dados experimentais; Linha sólida: ajuste feito utilizando-se a equação (2.11).	16
2.7	Representação esquemática de um experimento típico de espalhamento de luz.	17
2.8	Gráfico de uma típica curva lorentziana, onde $x_0 = 0$ e $\Gamma = 4$	19
2.9	Intensidade da luz espalhada, $I(t)$, em função do tempo, para partículas maiores (esquerda) e para partículas menores (direita).	20
2.10	Curvas de correlação temporal típicas para partículas que executam movimento browniano. Círculos vermelhos: partículas menores; quadrados azuis: partículas maiores.	21

2.11	Ilustração de um calorímetro típico utilizado nos experimentos de ITC. . . .	23
2.12	Ilustração de um termograma típico obtido em um experimento de ITC para uma reação exotérmica.	24
3.1	Estrutura molecular da Actinomicina D, $C_{62}H_{86}N_{12}O_{16}$, cuja massa molar é $M = 1255,42$ g/mol.	28
3.2	Possíveis configurações para o DNA, as microesferas de poliestireno e do con- junto DNA-microesferas em nossa amostra.	32
3.3	Esquema da realização dos estiramentos da molécula de DNA em um regime quase-estático. São mostradas duas posições da microesfera em instantes de tempo distintos, evidenciando o seu deslocamento dentro do poço de potencial gerado pela pinça óptica.	34
3.4	Curva típica da componente x da força $\times$ extensão do DNA. O ajuste é feito utilizando-se a equação 3.4.	35
3.5	Ilustração do procedimento usado para a troca das alíquotas contendo a Ac- tinomicina D.	37
3.6	Gráfico de r em função de C_f , para vários valores de n . Nesse gráfico, $r_{max} = 1$ e $K_i = 10^5$ M $^{-1}$, para todas as curvas.	40
3.7	Distribuição de probabilidades de ocupação, segundo o modelo estatístico de dois sítios, em um fragmento da molécula de DNA, onde $x = r/r_{max}$	42
3.8	Comprimento de persistência, A , em função da razão de concentrações, C_T/C_{bp} , para os complexos DNA-Actinomicina D.	44
3.9	Molécula de DNA com uma bolha de desnaturação, devido à aplicação da força pela pinça óptica.	45
3.10	Círculos: inverso do comprimento de persistência, $1/A$, em função da razão de concentrações, C_T/C_{bp} , obtido a partir dos dados experimentais da Figura 3.8. Linha: ajuste feito usando o modelo estatístico de dois sítios, através da equação (3.14).	46
3.11	Círculos: aumento relativo do comprimento de contorno, $\Delta L/L_0$, em função da razão de concentrações, C_T/C_{bp} . Linha: ajuste feito usando a equação (3.17). .	48

4.1	Estrutura não oficial do GelRed, mostrando que o composto é o resultado da união entre duas moléculas de EtBr. A estrutura pode ser encontrada no site http://en.wikipedia.org/wiki/GelRed	51
4.2	Comprimento de persistência, A , em função da concentração, C_T , de GelRed (círculos vermelhos) e EtBr (quadrados azuis).	53
4.3	Comprimento de contorno, L , em função da concentração, C_T , de GelRed (círculos vermelhos) e EtBr (quadrados azuis).	54
4.4	Aumento do comprimento de contorno, devido a intercalação entre os pares de base do DNA. L_0 representa o comprimento de contorno inicial (antes da intercalação) e L representa o comprimento de contorno final (após a intercalação). Δ é a distância entre dois pares de bases adjacentes e ϵ representa o aumento da distância entre os pares de bases adjacentes, devido a intercalação do composto.	56
4.5	Aumento relativo do comprimento de contorno, Θ , em função da concentração de GelRed, C_T . A linha vermelha representa o ajuste feito utilizando-se a equação 4.6.	58
4.6	Estrutura molecular do EtBr. É importante observar que o EtBr é um ligante monocatiônico.	61
4.7	Círculos: Raio hidrodinâmico, R_H , dos complexos DNA-GelRed, obtidos a partir dos experimentos de espalhamento de luz, em função das concentrações de GelRed, C_T . Quadrados: estimativa do raio de giro, R_g , dos complexos DNA-GelRed, obtidos a partir dos experimentos de estiramento, em função das concentrações de GelRed, C_T	62
5.1	Estrutura molecular do PEG, cuja fórmula molecular é $\text{HO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-H}$	66
5.2	Curvas típicas de força $\times$ extensão para a molécula de DNA puro com concentrações crescentes de PEG 8000, realizadas no regime entrópico ($F \leq 2$ pN). É possível observar que as curvas se tornam ligeiramente diferentes, a medida que a concentração de PEG aumenta na solução, mostrando a existência da interação de depleção.	69

5.3	Comprimento de persistência, A , do DNA puro em função da concentração do PEG 8000 na solução.	70
5.4	Comprimento de contorno, L , do DNA puro normalizado pelo valor do comprimento de contorno, L_0 , do DNA puro (sem PEG na solução) em função da concentração do PEG 8000 na solução.	71
5.5	Comprimento de persistência, A , e comprimento de contorno relativo, L/L_0 , para os complexos DNA-EtBr em função da concentração de EtBr. Círculos pretos: solução sem PEG; losangos vermelhos: PEG 1% em massa na solução; triângulos azuis: PEG 5% em massa na solução.	72
5.6	Comprimento de persistência, A , e comprimento de contorno relativo, L/L_0 , para os complexos DNA-GR em função da concentração de GR. Círculos pretos: solução sem PEG; losangos vermelhos: PEG 1% em massa na solução; triângulos azuis: PEG 5% em massa na solução.	73
5.7	Entalpia aparente de interação, ΔH_{ap-int} , para os complexos PEG - EtBr formados na ausência (quadrados, eixo vertical à direita) e na presença (círculos, eixo vertical à esquerda) de DNA cuja concentração é $21,3 \mu\text{M}$	76

RESUMO

CRISAFULI, Fabiano Augusto de Paula, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, Março de 2016. **Caracterização das interações do DNA com as moléculas Actinomicina D e GelRed.** Orientador: Márcio Santos Rocha. Coorientadores: José Êsio Bessa Ramos Júnior e Marcelo Lobato Martins.

Neste trabalho, utilizando três técnicas experimentais (pinça óptica, espalhamento dinâmico de luz e calorimetria isotérmica de titulação), nós investigamos alguns ligantes que, além da intercalação simples, apresentam outro mecanismo de interação com a molécula de DNA. Inicialmente, nós fizemos a caracterização da molécula de DNA com dois ligantes: a Actinomicina D, que é um fármaco largamente utilizado em doenças trofoblásticas gestacionais, tumor de Wilms e rabdomiossarcoma e o GelRed, um marcador de ácidos nucleicos utilizado em experimentos de eletroforese. Utilizando dois modelos teóricos (o modelo estatístico de dois sítios e o modelo de exclusão de vizinhos), foi possível extrair os parâmetros físico-químicos das interações utilizando-se apenas os dados obtidos a partir dos experimentos de estiramento. Por último, nós investigamos a interação do DNA com dois ligantes (Brometo de Etídio e GelRed) em soluções contendo Poli(etileno glicol) 8000, a fim de estudarmos o comportamento do DNA em soluções contendo outras macromoléculas, simulando, de forma bastante simplificada, o meio no qual o DNA se encontra *in vivo*.

ABSTRACT

CRISAFULI, Fabiano Augusto de Paula, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2016. **Characterization of DNA interactions with Actinomycin D and GelRed molecules.** Adviser: Márcio Santos Rocha. Co-advisers: José Ézio Bessa Ramos Júnior and Marcelo Lobato Martins.

In this work, by using three experimental techniques (optical tweezers, dynamic light scattering and isothermal titration calorimetry), we have investigated some ligands that, beside simple intercalation, have an additional mechanism of interaction with the DNA molecule. Firstly, we have performed the characterization of DNA molecule with two ligands: Actinomycin D, which is a drug widely used in gestational trophoblastic disease, Wilm's tumor and rhabdomyosarcoma and GelRed, which is a fluorescent nucleic acid stain, used in electrophoresis technique. By using two theoretical models (quenched disorder statistical model and neighbor exclusion model), it was possible to extract some physicochemical parameters of the interaction from the data obtained by single molecule stretching experiments. Finally, we have investigated the interaction of the DNA molecule with two ligands (Ethidium Bromide and GelRed) in Poly(ethylene-glycol) 8000-rich solutions, in order to study the behavior of the DNA molecules in a crowd environment, mimicking, in a very simple way, the *in vivo* environment.

Capítulo 1

Introdução

Em 1969, Arthur Ashkin e seus colaboradores, trabalhando nos laboratórios Bell, nos Estados Unidos, deram início a uma verdadeira revolução na Física e na Biologia, com a publicação de uma série de artigos relacionados a micromanipulação de partículas dielétricas. Ashkin e seus colaboradores ficaram particularmente fascinados com a grande aceleração que as partículas atingiam ao serem incididas por um laser com poucos watts de potência [1].

Inicialmente, as pinças ópticas foram desenvolvidas para a micromanipulação e aprisionamento de átomos [2], mas foi no campo da Física Biológica que essa poderosa ferramenta experimental encontrou suas maiores aplicações. Na referência [3], Ashkin relata a primeira observação de uma armadilha óptica estável utilizada para o aprisionamento, em três dimensões, de partículas na faixa de ~ 25 nm até ~ 10 μ m, utilizando uma única pinça óptica. Nesse trabalho, Ashkin *et al.* já vislumbravam possíveis aplicações para a recente descoberta, como pode ser visto no fragmento de texto abaixo:

“They also open a new size regime to optical trapping encompassing macromolecules, colloids, small aerosols, and possibly biological particles. The results are of relevance to proposals for the trapping and cooling of atoms by resonance radiation pressure.”

No ano seguinte a essa publicação, Ashkin relata, em um novo trabalho, uma das primeiras aplicações da pinça óptica na Física Biológica: o aprisionamento de vírus

1. Introdução

e bactérias em solução aquosa, utilizando um laser de argônio com uma potência de ~ 120 mW [4]. Desde as descobertas de Ashkin e seus colaboradores, as pinças ópticas foram (e ainda são) empregadas no estudo de uma variedade enorme de sistemas biológicos, dentre os quais podemos citar: manipulação de células individuais [5], estudo de propriedades mecânicas de membranas celulares [6], formação de bolhas (do termo inglês “blebs”) em células [7], na formação de células híbridas [8], dinâmica dos cromossomos durante o processo de mitose [9] e no estudo de proteínas, como a RNA polimerase [10]. Outras importantes aplicações podem ser encontradas nas referências [11–14]. No nosso caso, a pinça óptica é utilizada para realizar estiramentos da molécula de DNA, a fim de estudarmos as alterações nas propriedades mecânicas do polímero ao interagir com fármacos utilizados no tratamento de câncer e com marcadores de ácidos nucleicos utilizados em experimentos de eletroforese.

Existem várias maneiras pelas quais um ligante pode interagir com a molécula de DNA. Os ligantes de fenda, por exemplo, interagem com a molécula de DNA através de ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas [15]; outros ligantes, como é o caso da Antramicina, interagem com a molécula de DNA através de ligações covalentes [16] e, por último, existem os ligantes que interagem com a molécula de DNA através da intercalação simples, quando uma molécula do ligante intercala entre os pares de base adjacentes da molécula de DNA [17]. Além disso, existem alguns ligantes que interagem com o DNA de maneira mais complexa, por exemplo, quando partes da mesma molécula do ligante interagem de maneiras distintas, ou ainda, quando duas moléculas do ligante, unidas por um conector, conseguem intercalar entre pares de base subsequentes do DNA [18].

Na primeira parte desse trabalho, nós utilizamos o fármaco Actinomicina D, largamente utilizado em doenças trofoblásticas gestacionais* [19], tumor de Wilms† [20] e rabdomiossarcoma‡ [21], além dos marcadores de ácidos nucleicos utilizados em

*É o termo usado para nomear os tumores do epitélio trofoblástico placentário, com formas clínicas benignas e malignas.

†O tumor de Wilms, também denominado nefroblastoma, é o tumor renal maligno mais comum durante a infância.

‡O rabdomiossarcoma é um tipo de câncer que acomete células mesenquimais que se diferenciariam em células musculares esqueléticas.

1. Introdução

experimentos de eletroforese, o Brometo de Etídio (EtBr) [22] e o GelRed (GR) [23].

Embora o estudo da interação DNA-ligantes seja um ramo extremamente importante da ciência, uma vez que ele significa um primeiro passo no sentido de melhorar o tratamento de várias doenças humanas[§], a maioria dos trabalhos disponíveis na literatura são realizados com a molécula de DNA dispersa em uma solução tampão, que é uma situação bastante diferente da encontrada *in vivo*, na qual a molécula de DNA se encontra, na maioria do tempo, altamente condensada dentro do núcleo celular. Além disso, no citosol, que é o fluido que preenche o citoplasma, existem várias macromoléculas, tais como: proteínas, açúcares, íons, entre outras [24], que atuam regulando o volume celular e o balanço dos fluidos entre o meio interno e externo. Portanto, uma questão bastante relevante surge desse contexto: como os osmólitos, presentes na solução, podem interferir no processo de interação DNA-ligantes? A segunda parte deste trabalho teve como objetivo principal investigar essa questão. Para isso, nós utilizamos um “polímero neutro”, o Poli(etileno glicol) 8000 (PEG 8000), como osmólito e os intercalantes Brometo de Etídio (EtBr) e GelRed (GR) como ligantes.

De uma maneira geral, as pinças ópticas são ferramentas experimentais bastante simples, sendo compostas basicamente por um laser fortemente focalizado por uma objetiva de grande abertura numérica. Veremos detalhadamente no Capítulo 2 quais são as condições para que ocorra o pinçamento óptico.

Utilizando um protocolo que permite funcionalizar a molécula de DNA [25], uma ponta da molécula de DNA é fixada em uma lamínula de microscópio e a outra ponta é fixada a uma microesfera de poliestireno. Utilizando a pinça óptica para capturar a microesfera é possível então esticar a molécula de DNA. Uma vez conhecida a constante de força[¶] da pinça óptica, é possível obter todos os parâmetros mecânicos de interesse utilizando-se a expressão derivada por Marko e Siggia [26]. Todo o procedimento será discutido detalhadamente no Capítulo 3.

[§]O exemplo mais comum é a quimioterapia, no qual um fármaco que é administrado ao paciente, irá interagir com o DNA, a fim de inibir a replicação das células cancerosas e, conseqüentemente, inibir o crescimento dos tumores.

[¶]A constante de força κ é um parâmetro que mostra o quão forte é a pinça óptica. Para uma microesfera de raio fixo, a pinça óptica gera uma força do tipo $F = -\kappa x$, ou seja, o potencial gerado pela pinça óptica é harmônico para pequenos deslocamentos x .

1. Introdução

Nosso trabalho consiste, basicamente, em determinar as curvas de força $\times$ extensão para a molécula de DNA e os complexos DNA-ligantes. Utilizando o modelo Worm-Like Chain (WLC) deduzido por Marko e Siggia [26], nós ajustamos as curvas obtidas e extraímos dois parâmetros mecânicos importantes para as nossas análises: o comprimento de persistência^{||}, A , e o comprimento de contorno^{**}, L . Na tentativa de elucidar as interações da molécula de DNA com os fármacos/compostos utilizados, nós monitoramos as mudanças nas propriedades mecânicas do DNA, para concentrações específicas dos fármacos. Além disso, nós utilizamos dois modelos^{††} diferentes para a extração de parâmetros físico-químicos das interações, que serão detalhadamente discutidos nos Capítulos 3 e 4, respectivamente.

Em resumo, no Capítulo 2, discutimos os aspectos gerais de uma pinça óptica e seu princípio de funcionamento.

No Capítulo 3, discutimos brevemente sobre a Actinomicina D, apresentamos todo o procedimento experimental para a caracterização da interação DNA-Actinomicina D, discutimos o modelo estatístico de dois sítios, além dos resultados experimentais obtidos para a interação DNA-Actinomicina D.

No Capítulo 4, discutimos brevemente sobre o GelRed, apresentamos todo o procedimento experimental para a caracterização da interação DNA-GelRed, além dos resultados experimentais obtidos utilizando a espectroscopia de força e o espalhamento de luz.

No Capítulo 5, apresentamos os resultados experimentais obtidos para a interação entre a molécula de DNA e os compostos intercalantes em soluções contendo Poli(etileno glicol) 8000, obtidos utilizando a espectroscopia de força e a calorimetria isotérmica de titulação.

Finalmente, no Capítulo 6, apresentamos as conclusões e perspectivas deste trabalho.

^{||}O comprimento de persistência fornece informação sobre a rigidez da molécula de DNA.

^{**}O comprimento de contorno é a distância ponta à ponta do polímero quando este se apresenta totalmente esticado.

^{††}O modelo estatístico de dois sítios, formulado em parceria com o grupo de Física Biológica da UFMG e o modelo de exclusão de vizinhos.

Capítulo 2

As técnicas de caracterização das interações DNA-ligantes

Neste capítulo discutiremos alguns aspectos teóricos relacionados ao fenômeno do pinçamento óptico. Serão apresentados também todos os procedimentos para a caracterização da pinça óptica e a montagem experimental utilizada nesta técnica. Além disso, discutiremos alguns aspectos teóricos importantes relacionados às outras técnicas experimentais utilizadas nesse trabalho: o espalhamento dinâmico de luz e a calorimetria isotérmica de titulação.

2.1 Pinça óptica

Com o advento da teoria eletromagnética no século XIX, foi possível demonstrar que a luz é capaz de exercer força em um objeto ao transferir momento para ele. É exatamente esse fato que dá origem ao pinçamento óptico, quando a luz do laser transfere momento para uma microesfera ou um outro objeto, exercendo assim força.

Para termos ideia da ordem de grandeza das forças envolvidas no pinçamento óptico, imagine um laser com alguns mW* de potência, incidindo radialmente sobre uma microesfera absorvedora. Cada fóton absorvido possui um momento dado por

$$\vec{p} = \hbar \vec{k}, \quad (2.1)$$

*Potência típica usada nesse tipo de experimento.

2. As técnicas de caracterização das interações DNA-ligantes

onde $\vec{k}$ é o seu vetor de onda e $\hbar$ é a constante de Planck dividida por 2π . Em módulo, podemos escrever que

$$p = \hbar k = \hbar \frac{\omega}{c} = \frac{E}{c}, \quad (2.2)$$

onde c é a velocidade da luz, ω é a frequência angular da luz incidente e $E = \hbar\omega$ é a energia de cada fóton. Para N fótons, teremos que $E_{tot} = N\hbar\omega = NE$.

A força total exercida por um feixe com N fótons por segundo incidindo sobre a microesfera pode ser obtida a partir da equação (2.2). Usando a 2ª Lei de Newton, teremos

$$F = \frac{dp}{dt} = \frac{d}{dt} \left(\frac{E_{tot}}{c} \right) = \frac{P_{tot}}{c}, \quad (2.3)$$

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

Deste modo, podemos estimar o valor da força na equação (2.3), como sendo

$$F_{tot} \approx \frac{1 \times 10^{-3} \text{ W}}{3 \times 10^8 \text{ m/s}} \approx 10^{-11} \text{ N} = 10 \text{ pN}. \quad (2.4)$$

De fato, em experimentos com pinças ópticas, as forças estão na escala de pico-Newton.

Para entendermos qualitativamente o funcionamento da pinça óptica, devemos analisar as forças que atuam na microesfera. A primeira força, chamada pressão de radiação, surge sempre que a luz é refletida ou absorvida ao incidir numa interface entre dois meios. A expressão para a força de radiação, devido a um raio, pode ser escrita como

$$F \propto \frac{P_{raio}}{v}, \quad (2.5)$$

com

$$v = \frac{c}{n_m}, \quad (2.6)$$

onde P_{raio} é a potência do raio e n_m é o índice de refração do meio de incidência.

Além da pressão de radiação, a luz é capaz de exercer um segundo tipo de força sobre um objeto, ao ser refratada por este. Esta força surge devido ao fato do momento linear total do sistema raio-objeto ter que ser conservado[†]. O raio de luz, ao refratar em um objeto, em geral é desviado de sua trajetória original se os

[†]Esse fato é devido ao teorema de conservação do momento linear.

2. As técnicas de caracterização das interações DNA-ligantes

índices de refração do meio de incidência e do objeto forem diferentes. Com isso, o raio refratado terá um momento linear em uma direção diferente do raio incidente. Então, pela 2ª Lei de Newton, o objeto sofrerá uma variação de momento de mesmo módulo e sentido contrário à variação de momento do raio. Imaginemos que esse objeto seja um microesfera. Uma vez que a microesfera possui massa, então consequentemente, surgirá uma força sobre ela para fazer variar seu momento.

Toda nossa análise acima foi feita para um único raio. Agora, imaginemos que vários raios atinjam a microesfera, de forma que cada raio incidente dá origem a um raio refletido e um raio refratado. Os raios refletidos darão origem a pressão de radiação, enquanto que os raios refratados darão origem à forças semelhantes às citadas no parágrafo anterior. Se o índice de refração da microesfera for maior que o índice de refração do meio no qual ela está inserida e se o laser for fortemente focalizado, então os raios refratados darão origem à forças de gradiente, que tenderão a levar a microesfera para o foco do feixe. A competição entre as duas forças, pressão de radiação e força de gradiente, é que dá origem ao pinçamento óptico.

Para visualizar melhor este efeito, vamos começar fazendo uma análise usando o regime da óptica geométrica. Nesse regime, o raio da microesfera é muito maior que o comprimento de onda da luz ($a \gg \lambda$).

A Figura 2.1 mostra uma situação onde a microesfera se encontra longe da região focal da objetiva. Nesse caso, as forças $\vec{F}_1$ e $\vec{F}_2$, oriundas de dois raios de extremidades opostas, fornecem uma força resultante que tende a empurrar a microesfera no sentido de incidência do feixe de laser.

Para finalizar nossa análise no limite da óptica geométrica, vamos discutir os efeitos da refração. A Figura 2.2 mostra uma situação na qual a microesfera está situada em uma região próxima da região focal da objetiva, mas abaixo do foco. Nessa região, as forças de gradiente $\vec{F}_1$ e $\vec{F}_2$, fornecem uma força resultante que tende a empurrar a microesfera para cima, de forma que a microesfera fique sempre presa na região focal. Isso acontece pois o raio (1), responsável por gerar a força $\vec{F}_1$, sofre um desvio ao passar pela microesfera, variando seu momento linear. Considerando o sistema raio-microesfera como sendo isolado, consequentemente o momento linear total

2. As técnicas de caracterização das interações DNA-ligantes

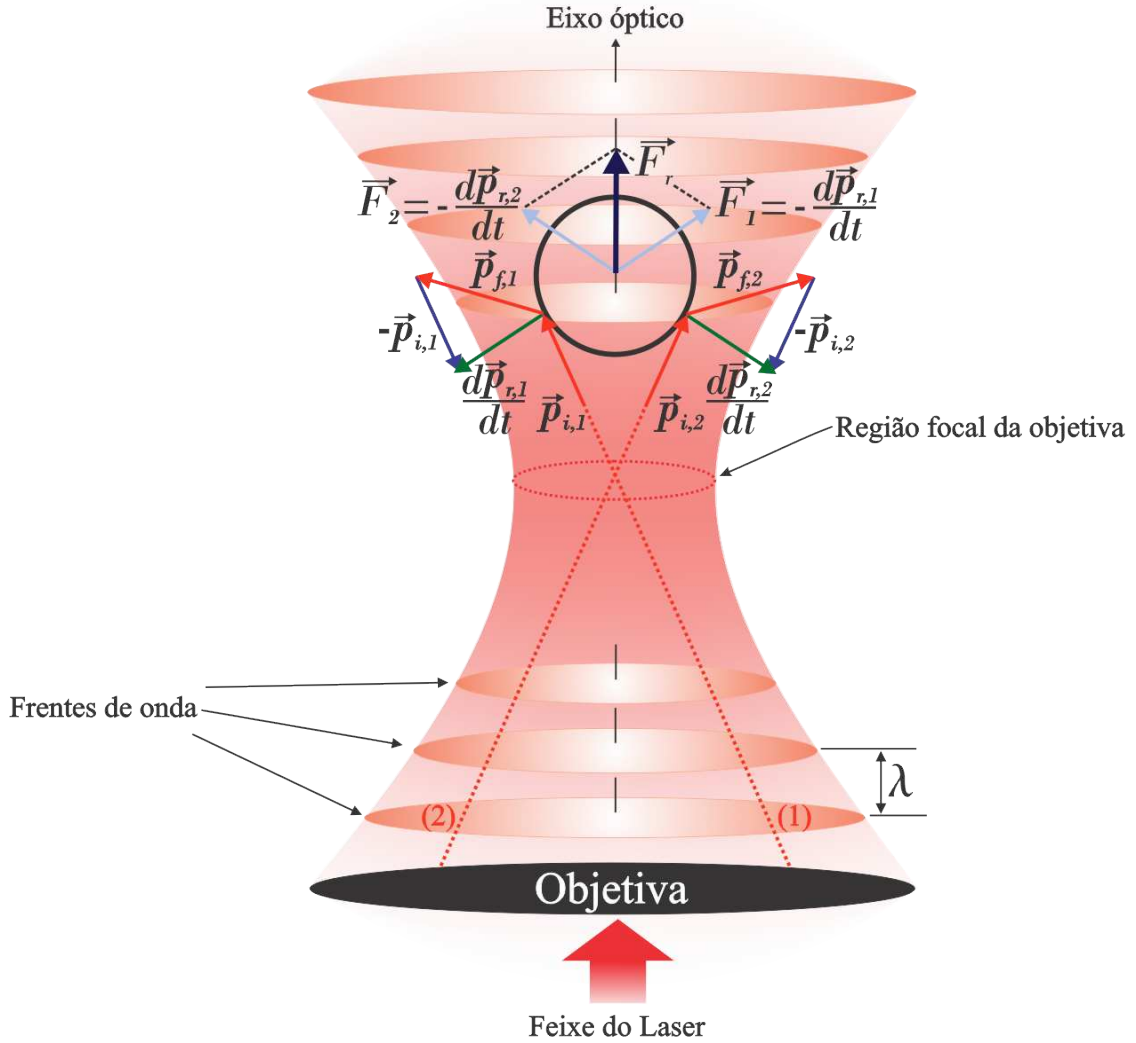


Figura 2.1: Pressão de radiação. A força resultante, nesse caso, empurra a microesfera no sentido de incidência do feixe.

do sistema tem que ser conservado, de forma que a microesfera sofrerá uma variação no seu momento linear de mesma intensidade e sentido contrário à variação de momento linear do raio (1). A mesma situação ocorre com o raio (2), situado na extremidade oposta do feixe e responsável por gerar a força $\vec{F}_2$. A resultante de $\vec{F}_1$ e $\vec{F}_2$ aponta, nesse caso, para cima, no sentido do foco.

A Figura 2.3 mostra uma situação na qual a microesfera está situada em uma região próxima da região focal da objetiva, mas acima do foco. Analogamente ao que acontece na situação na qual a esfera está situada em uma região abaixo do foco,

2. As técnicas de caracterização das interações DNA-ligantes

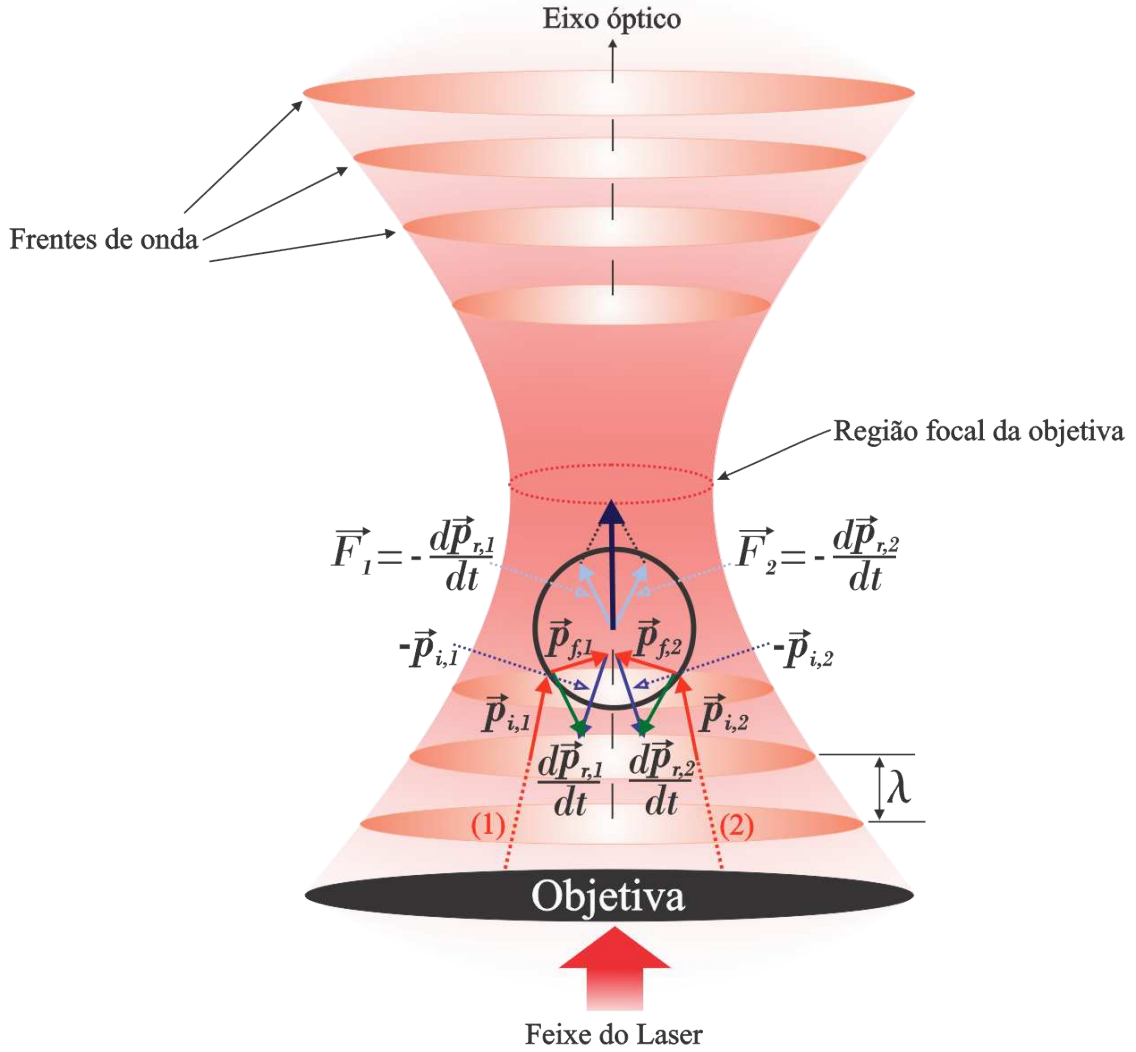


Figura 2.2: Efeito da refração. A microesfera está situada na região abaixo do foco e, nesse caso, a força resultante empurra a microesfera para o foco do feixe.

surgirão forças na microesfera de forma a conservar o momento linear total do sistema raio-microesfera. Agora, no caso onde a microesfera está situada em uma região acima do foco, a força resultante na microesfera apontará para baixo, de forma a empurrar novamente a microesfera na direção do foco do feixe.

Devemos salientar, entretanto, que toda a discussão acima foi feita no limite da óptica geométrica, quando o raio da microesfera é muito maior que o comprimento de onda da luz incidente ($a \gg \lambda$).

Observe nas Figuras 2.2 e 2.3 que consideramos o índice de refração da microes-

2. As técnicas de caracterização das interações DNA-ligantes

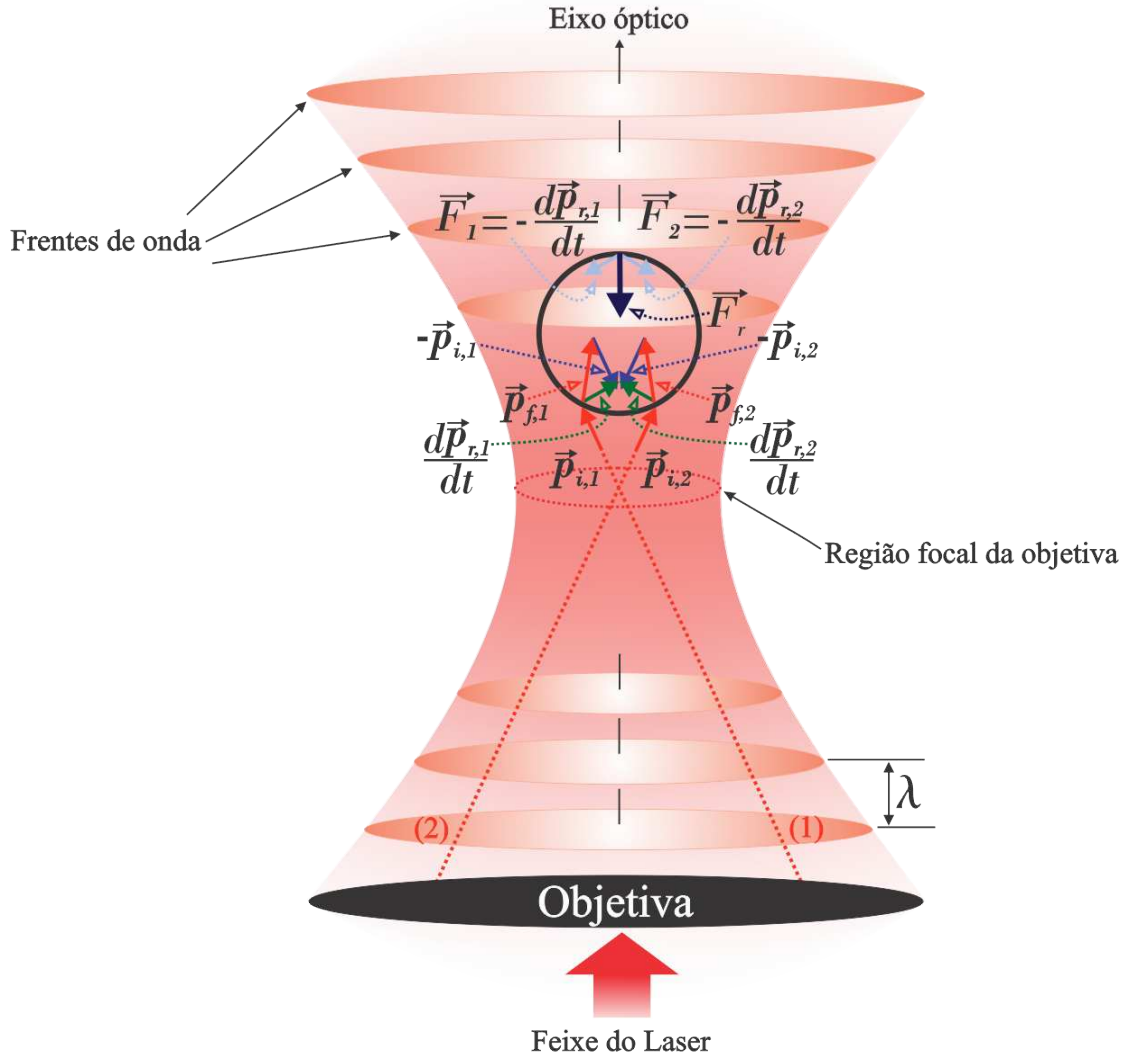


Figura 2.3: Efeito da refração. A microesfera está situada na região acima do foco e, mais uma vez, a força resultante empurra a microesfera para o foco do feixe.

fera maior que o índice de refração do meio. De fato, essa é uma condição fundamental para que ocorra o pinçamento.

Quando o raio da microesfera é muito menor que o comprimento de onda da luz incidente, estamos no chamado limite Rayleigh. Nesse caso, a esfera se comporta como um dipolo elétrico induzido em um campo elétrico. A força que atua na microesfera é proporcional ao gradiente da intensidade do campo elétrico da radiação incidente. Essa força faz com que a microesfera se mova para a direção de maior intensidade do campo, ou seja, o foco. Mais uma vez, a microesfera ficará presa na região focal [27,28].

2. As técnicas de caracterização das interações DNA-ligantes

Podemos perceber, então, que as pinças ópticas são ferramentas experimentais importantes na manipulação de pequenas partículas dielétricas. Sua aplicação pode ser encontrada em diversas áreas, principalmente na Física Biológica, como discutido no Capítulo 1.

Recentemente, os pesquisadores R. S. Dutra, N. B. Viana, P. A. Maia Neto e H. M. Nussenzweig, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, propuseram uma extensão da teoria MDSA (do termo em inglês “Mie Debye Spherical Aberration”) [29,30], que é capaz de prever, quantitativamente, a força do laser sobre uma microesfera dielétrica de raio e índice de refração arbitrário. A nova teoria, cujo nome os autores sugerem, MDSA + inclui os efeitos de uma aberração óptica, o astigmatismo [31,32]. A teoria MDSA + é a mais geral, atualmente, sobre pinças ópticas.

2.1.1 Montagem experimental

A Figura 2.4 mostra um esquema detalhado da montagem experimental utilizada em nossas medidas com a pinça óptica.

A região entre as linhas pontilhadas representa o microscópio Nikon Eclipse Ti-S, com óptica corrigida no infinito, objetiva de 100X e abertura numérica[‡] $NA = 1,4$. Essa objetiva, de alta abertura numérica, é a responsável por focalizar o feixe de laser infravermelho e prender as microesferas na região focal.

A radiação é emitida por um laser infravermelho (IV), modelo IPG Photonics YLR-5-1064-LP, com potência máxima de 6,0 W, $\lambda = 1064$ nm e operando no modo TEM_{00} .

E_1 , E_2 , E_3 e E_4 são espelhos, onde E_1 e E_2 permitem uma precisão maior no alinhamento da pinça óptica, E_3 é um espelho dicróico e E_4 permite que o laser chegue até a outra saída do microscópio. F_1 representa uma associação de filtros que permite controlar o valor da constante de força, κ , da pinça óptica e, conseqüentemente, o módulo da força óptica aplicada.

O motor piezoelétrico, representado na Figura 2.4, é o responsável por deslocar

[‡]A abertura numérica é um parâmetro fornecido pelo fabricante da lente e, quanto maior o seu valor, maior será a abertura do cone de luz focalizado e, conseqüentemente, mais forte será a força de gradiente, responsável pelo pinçamento óptico.

2. As técnicas de caracterização das interações DNA-ligantes

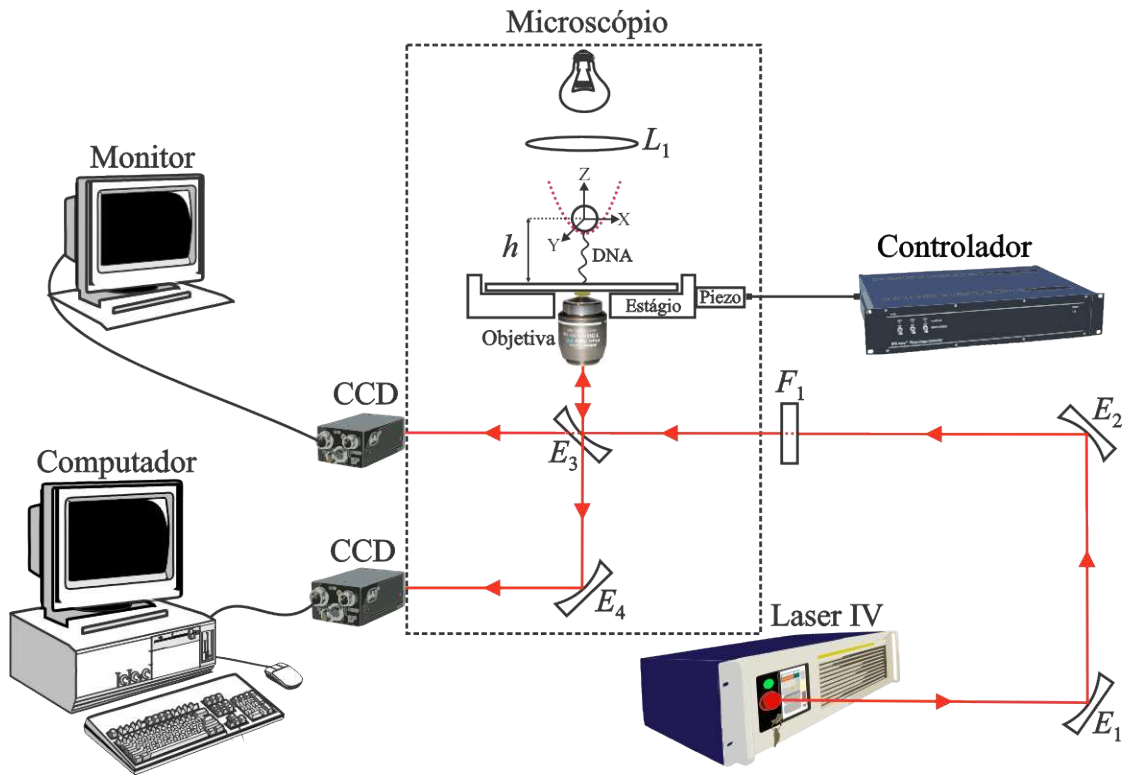


Figura 2.4: Montagem experimental utilizada para as medidas com a pinça óptica.

o estágio do microscópio e, conseqüentemente, a lamínula com precisão nanométrica.

A lente L_1 , representa o condensador do sistema de iluminação do microscópio. Abaixo da lente L_1 está representado o poço de potencial gerado pela pinça óptica, o sistema de referência utilizado e a nossa solução de DNA e microesferas. Note que estamos representando a situação na qual uma das pontas da molécula de DNA se encontra adsorvida na microesfera e a outra ponta adsorvida na lamínula, que é o nosso porta amostras. A altura h representa a distância do centro de massa da microesfera pinçada em relação à lamínula.

Finalmente, nas duas saídas do microscópio são conectadas duas câmeras CCD, modelos Jai BM-500GE e Jai CV-A50IR, que enviam as imagens até o monitor e ao computador, permitindo assim que todo o experimento seja visualizado e filmado.

2.1.2 Calibração da pinça óptica

Como explicado em linhas gerais no Capítulo 1, a constante de força, κ , é o parâmetro que define o quão forte é a pinça óptica. Para fazer a calibração da pinça óptica, nós utilizamos o método de Stokes, que consiste em deslocar a lamínula do microscópio com velocidade $\vec{v}$ constante e medir a nova posição de equilíbrio da microesfera.

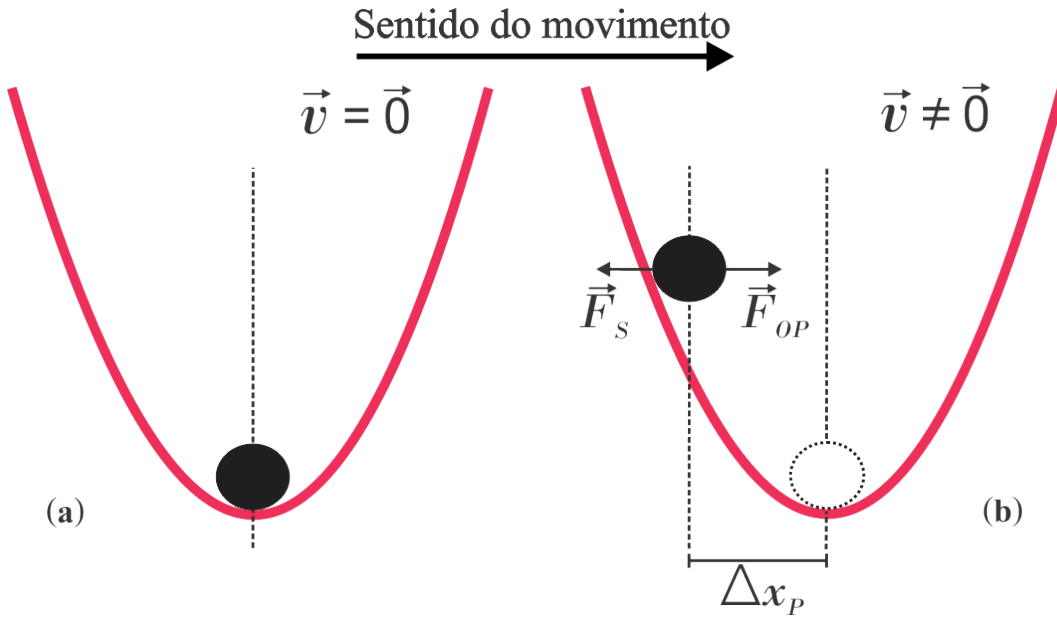


Figura 2.5: (a) Microesfera presa na posição de equilíbrio no poço de potencial gerado pela pinça óptica. (b) Após acionarmos o piezo, a microesfera é empurrada pelo fluido e fica em equilíbrio em uma nova posição no poço de potencial gerado pela pinça óptica. Nessa posição, a força de Stokes, $\vec{F}_S$, é igual, em módulo, à força óptica, $\vec{F}_{OP}$.

A Figura 2.5 (a) mostra a situação na qual a microesfera se encontra em repouso no fundo no poço de potencial. Nesse caso, como o piezo que movimenta a lamínula está parado, então a velocidade média, $\bar{v}$, da microesfera é nula e, consequentemente, a força de Stokes também é nula. A microesfera presa no poço de potencial da pinça óptica, que é aproximadamente harmônico, é um oscilador harmônico browniano, estando sujeito à força óptica restauradora e a força aleatória devido à interação com o fluido. A Figura 2.5 (b), mostra a situação na qual a lamínula se movimento com uma velocidade constante $\vec{v}$, movimentando o fluido no qual as microesferas estão imersas.

2. As técnicas de caracterização das interações DNA-ligantes

Esse movimento do fluido dá origem a uma força de atrito, chamada de força de Stokes, que faz com que a microesfera atinja uma nova posição de equilíbrio dentro do poço de potencial. Nessa nova posição de equilíbrio a força de Stokes é igual, em módulo, à força óptica gerada pelo laser.

A força de Stokes pode ser escrita como,

$$\vec{F}_S = -\gamma \vec{v}, \quad (2.7)$$

onde γ é o coeficiente de atrito viscoso e $\vec{v}$ é a velocidade.

O coeficiente de atrito viscoso sobre uma microesfera em solução aquosa é dada pela expressão aproximada [33],

$$\gamma = 6\pi\eta_a a \left[1 - \frac{9}{16} \left(\frac{a}{h} \right) + \frac{1}{8} \left(\frac{a}{h} \right)^3 - \frac{45}{256} \left(\frac{a}{h} \right)^4 - \frac{1}{16} \left(\frac{a}{h} \right)^5 \right]^{-1}, \quad (2.8)$$

onde η_a é a viscosidade da água, solução na qual as microesferas estão imersas, a é o raio da microesfera e h é a distância do centro da microesfera à lamínula.

A viscosidade da água como função da temperatura é dada pela expressão empírica [34],

$$\eta_a = 10^{-3} \left[0,26 + 1,51 \exp \left(\frac{-t_c}{29} \right) \right], \quad (2.9)$$

onde t_c é a temperatura em graus Celsius e η_a está em unidades SI.

Na nova posição de equilíbrio, mostrada na Figura 2.5 (b), podemos escrever que, em módulo, $F_{OP} = F_S$, ou seja,

$$\kappa \Delta x_P = \gamma v. \quad (2.10)$$

Isolando Δx_P , temos que

$$\Delta x_P = \frac{\gamma}{\kappa} v. \quad (2.11)$$

Uma vez conhecida a temperatura, a equação (2.9) é usada para encontrar o valor da viscosidade. O raio a das microesferas é determinado pelo fabricante e, no nosso caso, o valor é $1,5 \mu m$. A altura h é encontrada movimentando-se o foco do microscópio onde, inicialmente, focalizamos o fundo da lamínula e, na sequência,

2. As técnicas de caracterização das interações DNA-ligantes

ajustamos o foco do microscópio até a altura h desejada. Por último, essa altura h é multiplicada pelo índice de refração relativo da água e do vidro, o que fornece o valor real da altura do centro da microesfera em relação à lamínula. Para descobrir o valor de Δx_P , todo o experimento é filmado utilizando-se o programa *StreamPix*, que faz a captura das imagens formando um vídeo. O procedimento é basicamente composto por duas etapas, descritas a seguir:

(i) Iniciamos o vídeo com a microesfera parada[§] dentro do poço de potencial da pinça, a fim de encontrar a posição do centro de massa da microesfera quando ela se encontra como mostrado na Figura 2.5 (a).

(ii) Após ~ 5 segundos, o piezo que movimenta a lamínula é acionado com uma determinada velocidade e a microesfera atinge a nova posição de equilíbrio, como mostrado na Figura 2.5 (b). Utilizando o programa *ImageJ*, que fornece os valores do centróide da microesfera em função do tempo, é possível determinar o valor de Δx_P . Todo esse procedimento é repetido para diferentes valores da velocidade do piezo que desloca a lamínula.

A Figura 2.6 mostra o gráfico obtido para o Δx_P em função da velocidade v do piezo, conforme o procedimento descrito acima.

A equação (2.11) foi, então, utilizada para ajustar os pontos experimentais da Figura 2.6. Como a equação (2.11) é de 1º grau, o ajuste é linear e o coeficiente angular obtido é γ/κ , onde γ é calculado através da equação (2.8).

Em nossos experimentos, a constante de força obtida foi de $(3,5 \pm 0,4)$ pN/ μ m, que faz com que a faixa de forças aplicadas ao DNA, durante todo o estiramento da molécula, esteja dentro do regime entrópico[¶]. De fato, essa faixa de forças gera grandes vantagens no nosso caso, entre as quais podemos citar:

(i) O modelo WLC, de Marko e Siggia, utilizado para ajustar os gráficos de força $\times$ extensão, só pode ser utilizado no regime de baixas forças (< 5 pN), chamado

[§]Estritamente falando a microesfera não fica parada dentro do poço de potencial da pinça, pelo contrário, ela executa movimento browniano. Diante disso, a microesfera é filmada durante aproximadamente 5 segundos e posteriormente fazemos a média dos valores do centróide em função do tempo, usando-se dois programas: o *ImageJ* que fornece a posição do centróide da microesfera em função do tempo e o *Kaleida Graph*, que importa os dados e calcula as médias.

[¶]Chamamos de regime entrópico, o intervalo de intensidades de forças no qual não há danos à molécula de DNA, ou seja, as ligações de hidrogênio entre os pares de bases não são rompidas.

2. As técnicas de caracterização das interações DNA-ligantes

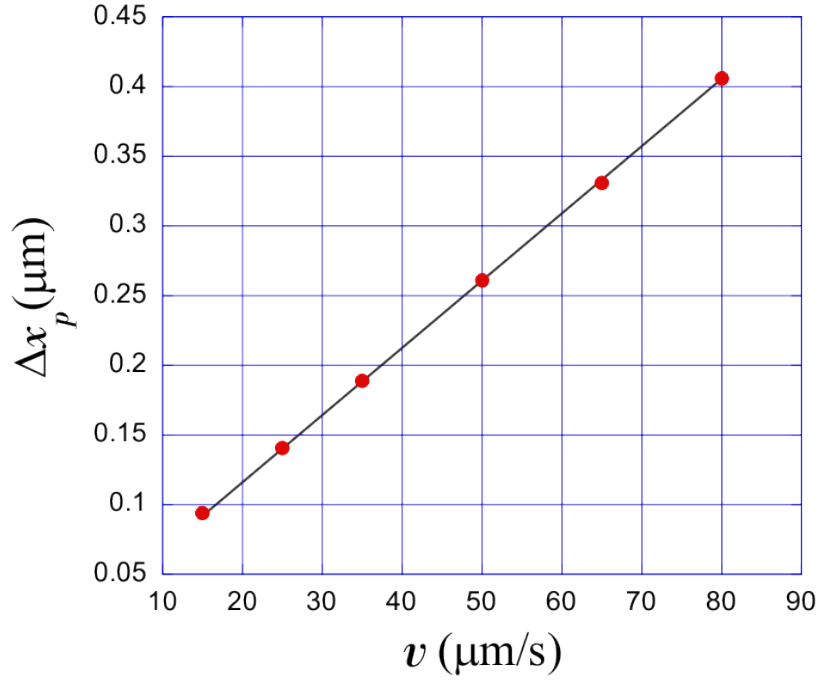


Figura 2.6: Gráfico do Δx_P em função de v , obtido no processo de calibração da pinça óptica, via método de Stokes. Círculos vermelhos: dados experimentais; Linha sólida: ajuste feito utilizando-se a equação (2.11).

regime entrópico, portanto, é esperado que tal equação descreva melhor os experimentos realizados no limite de baixas forças.

(ii) O equilíbrio químico entre a molécula de DNA e os compostos não é significativamente alterado nesse regime de forças [35]. É bem estabelecido, hoje em dia, que altas forças podem alterar o equilíbrio químico entre a molécula de DNA e os fármacos/compostos em solução. De fato, recentemente Vladescu *et al.* mostraram que importantes parâmetros de interação dependem fortemente das forças aplicadas aos complexos DNA - fármacos [35] e, portanto, é esperado que algumas propriedades mecânicas desses complexos, como por exemplo, o comprimento de persistência, A , e de contorno, L , sejam também dependentes do regime de forças empregado, uma vez que elas dependem da quantidade de fármaco/composto “ligado” ao DNA.

2.2 Espalhamento dinâmico de luz

O espalhamento dinâmico de luz (do termo inglês “Dynamic Light Scattering” ou DLS) é uma técnica experimental que têm sido amplamente utilizada, desde o seu desenvolvimento na década de 60, em medidas de distribuição do tamanho de partículas [36]. O DLS permite medir a distribuição do tamanho de partículas na faixa de 10 nm até $\sim 1 \mu\text{m}$. Outras importantes aplicações dessa técnica podem ser encontradas na referência [37].

Em um experimento típico de DLS, um feixe de laser, cuja direção de propagação é descrita por um vetor de onda, $\vec{K}_i$, de módulo $K_i = n\omega_i/c$, onde n é o índice de refração do meio, ω_i é a frequência angular inicial e c é a velocidade de luz no vácuo, incide nas partículas dispersas na amostra. A radiação espalhada, sob um ângulo θ , em relação a direção da propagação inicial, é caracterizada por um vetor de onda, $\vec{K}_s$, na mesma direção do feixe espalhado. A radiação espalhada sob o ângulo θ é, então, coletada por um detector, geralmente um fotomultiplicador. A Figura 2.7 ilustra, de maneira simplificada, um experimento típico de espalhamento de luz.

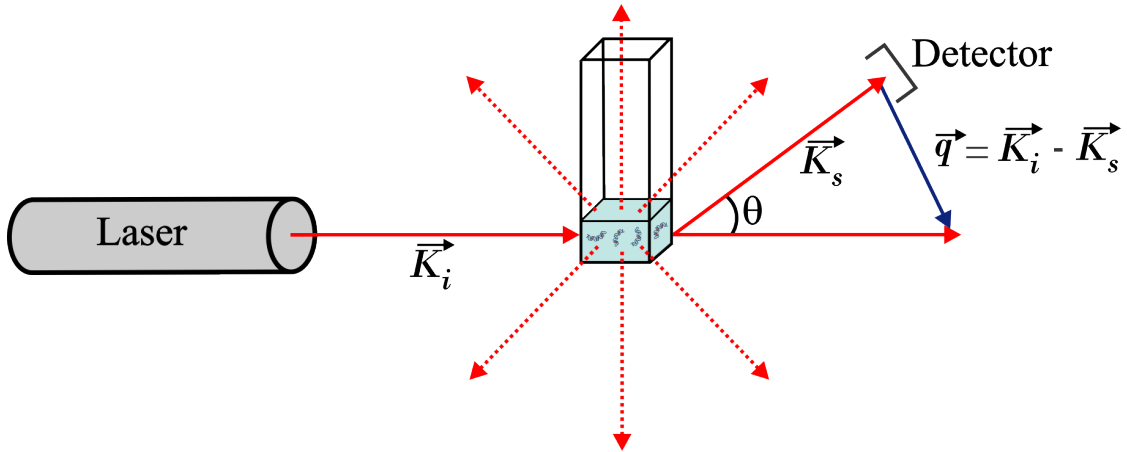


Figura 2.7: Representação esquemática de um experimento típico de espalhamento de luz.

Um grandeza particularmente importante na caracterização da luz espalhada é o vetor de espalhamento, $\vec{q}$, definido pela geometria do experimento [38], como pode

2. As técnicas de caracterização das interações DNA-ligantes

ser visto na Figura 2.7. O vetor de espalhamento é dado por

$$\vec{q} = \vec{K}_i - \vec{K}_s . \quad (2.12)$$

Nos experimentos de espalhamento de luz, o comprimento de onda do feixe espalhado é muito próximo do comprimento de onda do feixe incidente, de modo que $|\vec{K}_i| \simeq |\vec{K}_s|$ e, dessa forma, o módulo do vetor espalhamento é dado por [38]

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda_i} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) , \quad (2.13)$$

onde n é o índice de refração do meio, λ_i é o comprimento de onda do feixe incidente e θ é o ângulo de espalhamento, como pode ser visto na Figura 2.7.

Para obtermos informações a respeito da dinâmica das partículas que compõem a amostra, inicialmente é necessário estudar o espectro de frequência, $S(\omega)$, da intensidade da luz espalhada. Para partículas de tamanhos variados, cujas velocidades sejam independentes das demais partículas presentes na amostra, o espectro de frequência, $S(\omega)$, terá a forma de uma curva do tipo lorentziana*, cuja largura do pico, Γ , depende do coeficiente de difusão, D , e do ângulo de espalhamento θ , cuja relação é dada por [40]

$$S(w) = \frac{1}{\pi} \frac{\Gamma(\theta)/2}{(\omega - \omega_0)^2 + (\Gamma(\theta)/2)^2} , \quad (2.14)$$

onde

$$\omega = 2\pi f , \quad (2.15)$$

e

$$\Gamma(\theta) = 2D \left[\frac{4\pi n}{\lambda_i} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \right]^2 . \quad (2.16)$$

A Figura 2.8 mostra o gráfico de uma típica curva lorentziana, onde $x_0 = 0$ e $\Gamma = 4$.

As partículas que compõem as amostras utilizadas nos experimentos de espalhamento de luz executam um movimento contínuo, devido às colisões com as outras

*A lorentziana é uma função que possui um único pico e pode ser descrita por $L(x) = \frac{1}{\pi} \frac{\Gamma/2}{(x-x_0)^2 + (\Gamma/2)^2}$, onde x_0 é o centro e Γ é o parâmetro que define a largura do pico [39].

2. As técnicas de caracterização das interações DNA-ligantes

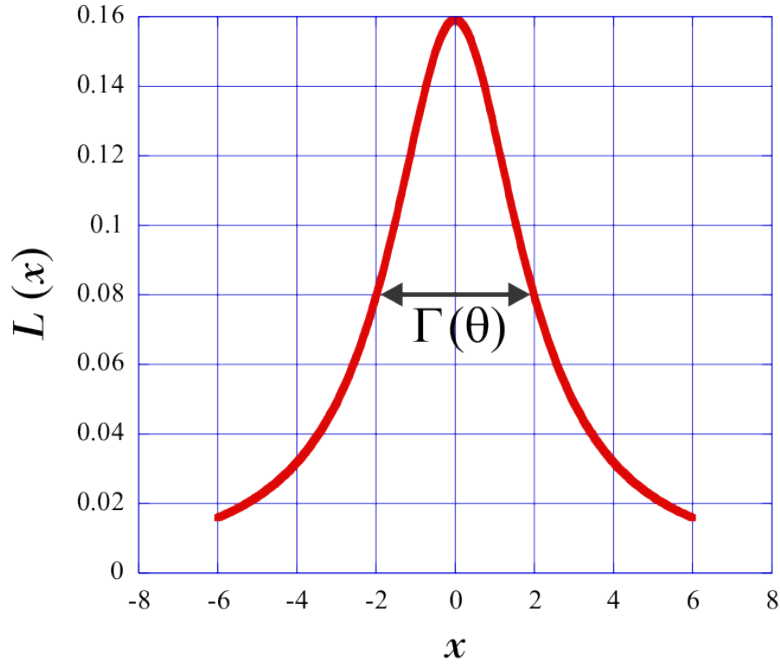


Figura 2.8: Gráfico de uma típica curva lorentziana, onde $x_0 = 0$ e $\Gamma = 4$.

partículas do meio. Esse movimento é conhecido como movimento browniano ou movimento randômico, que faz com que a intensidade da luz espalhada, $I(t)$, varie no tempo. Partículas maiores apresentam uma dinâmica mais lenta, ocasionando em flutuações mais lentas da intensidade da luz espalhada, $I(t)$, em função do tempo. Por outro lado, partículas menores apresentam uma dinâmica mais rápida, ocasionando em flutuações mais rápidas da intensidade da luz espalhada, $I(t)$, em função do tempo. A figura 2.9 ilustra essa situação.

A função que relaciona as variações da intensidade da luz espalhada com a dinâmica das partículas que compõem a amostra é a função de correlação temporal, definida como [38]

$$G(\tau) = \langle I(t)I(t + \tau) \rangle , \quad (2.17)$$

onde $I(t)$ é a intensidade da luz espalhada em um instante arbitrário e $I(t + \tau)$ é a intensidade da luz espalhada em um instante posterior, sendo τ o tempo de correlacionador[†].

[†]Do ponto de vista experimental, τ , assume valores tipicamente na faixa de nanossegundos a microsegundos, dependendo do tipo de correlacionador utilizado.

2. As técnicas de caracterização das interações DNA-ligantes

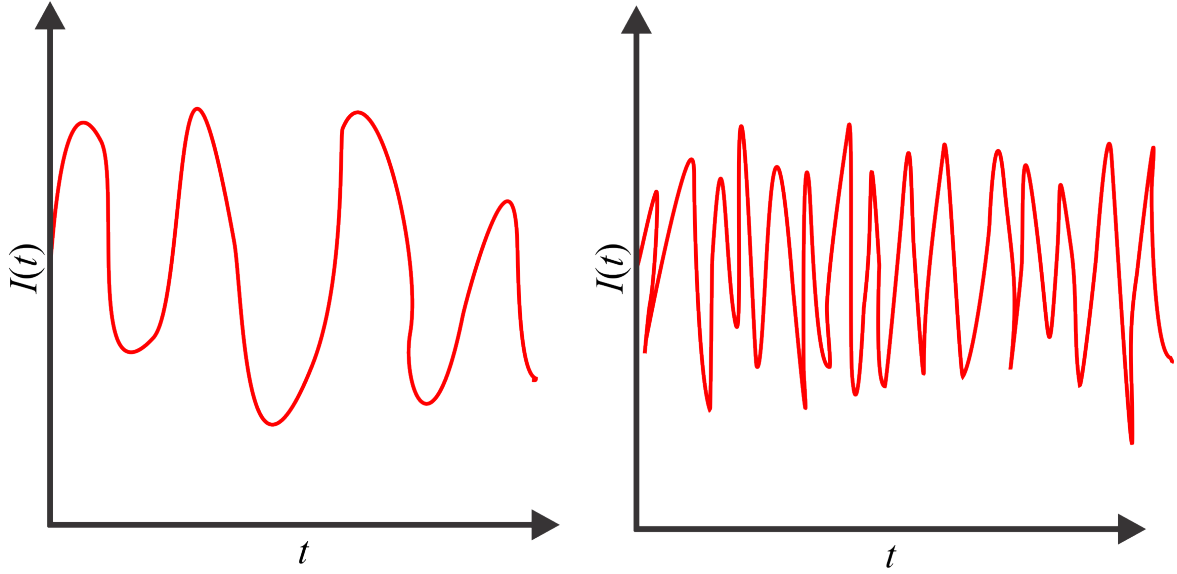


Figura 2.9: Intensidade da luz espalhada, $I(t)$, em função do tempo, para partículas maiores (esquerda) e para partículas menores (direita).

O valor máximo de $G(\tau)$, dado por $\langle I^2 \rangle$, ocorre quando $\tau = 0$ e, por outro lado, seu valor mínimo, dado por $\langle I \rangle^2$, ocorre quando $\tau \rightarrow \infty$, onde, experimentalmente falando, “ ∞ ”, significa um tempo da ordem de dezenas de milisegundos.

A Figura 2.10 mostra um gráfico da função de correlação temporal, $G(\tau)$, em função de τ , para o caso onde há uma distribuição no tamanho das partículas que compõem a amostra.

O comportamento das curvas apresentado na Figura 2.10 está diretamente relacionado ao comportamento das flutuações de $I(t)$, apresentado na Figura 2.9. Flutuações mais lentas da intensidade da luz espalhada, $I(t)$, em função do tempo, que ocorre para partículas maiores, ocasiona em uma lenta perda de correlação, o que faz com que a curva de correlação, $G(\tau)$, atinja o seu valor de saturação para valores maiores de τ . Por outro lado, flutuações mais rápidas da intensidade da luz espalhada, $I(t)$, em função do tempo, que ocorre para partículas menores, ocasiona em uma rápida perda de correlação, o que faz com que a curva de correlação, $G(\tau)$, atinja o seu valor de saturação para valores menores de τ .

O coeficiente de difusão, D , pode ser obtido diretamente da função de correlação temporal, $G(\tau)$. Para sistemas monodispersos onde a interação entre as partículas pode

2. As técnicas de caracterização das interações DNA-ligantes

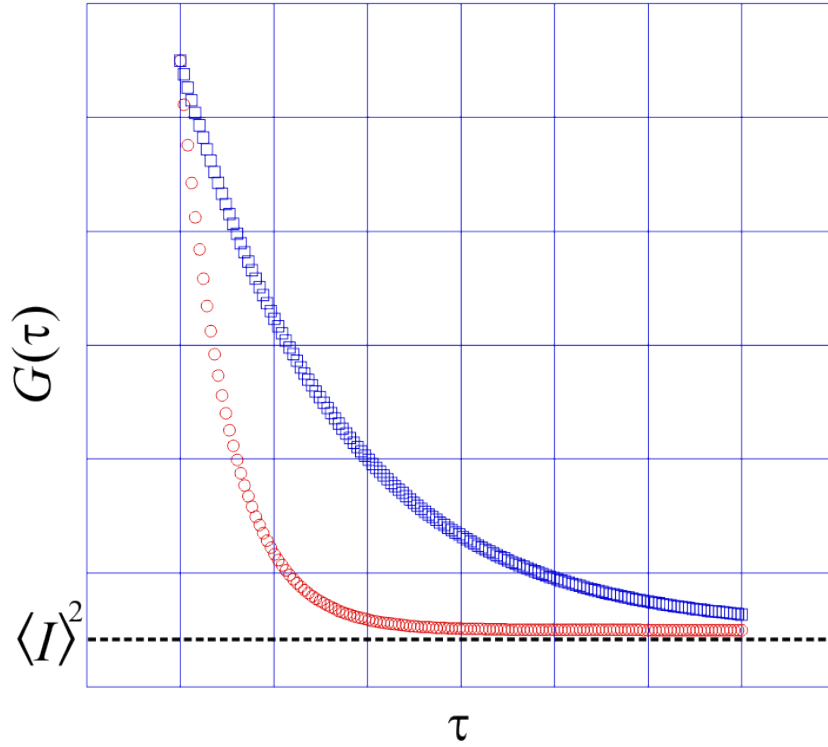


Figura 2.10: Curvas de correlação temporal típicas para partículas que executam movimento browniano. Círculos vermelhos: partículas menores; quadrados azuis: partículas maiores.

ser desprezada, a função de correlação temporal, $G(\tau)$, pode ser escrita como [41]

$$G(\tau) = A + Be^{(-\Gamma\tau)}, \quad (2.18)$$

onde A e B são parâmetros de ajuste da curva e Γ é a largura do pico da lorentziana, mostrada na Figura 2.8. A maioria dos experimentos de espalhamento de luz são realizadas com amostras que apresentam uma distribuição de tamanho, ou seja, há uma polidispersão de partículas na amostra. Nesse caso, a equação (2.18) precisa sofrer uma alteração para que ela possa levar em conta esse efeito. A função de correlação temporal, $G(\tau)$, para amostras que apresentam polidispersão no tamanho da partículas é dada por [38]

$$G(\tau) = A + Bg^2(\tau), \quad (2.19)$$

onde $g(\tau)$ é a soma de todos os decaimentos exponenciais contidos na função de correlação temporal.

2. As técnicas de caracterização das interações DNA-ligantes

A equação (2.16) fornece a relação entre a dinâmica das partículas que compõem a amostra e a função de correlação temporal, $G(\tau)$, através do parâmetro Γ . Por último, é necessário relacionar a distribuição de tamanho das partículas, representada pelo raio hidrodinâmico, R_H , com a informação obtida através do experimento de espalhamento de luz, o coeficiente de difusão, D . Para situações onde as partículas são aproximadamente esféricas e não interagem entre si, a relação entre R_H e D é dada pela equação de Stokes-Einstein [37]

$$R_H = \frac{K_B T}{6\pi\eta D}, \quad (2.20)$$

onde K_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura absoluta e η é a viscosidade da solução.

2.3 Calorimetria isotérmica de titulação

A calorimetria isotérmica de titulação (do termo inglês “Isothermal Titration Calorimetry” ou ITC) é uma importante técnica experimental que permite a extração de parâmetros físico-químicos e termodinâmicos utilizados no estudo de interações intermoleculares. Importantes aplicações da ITC podem ser encontradas nas referências [42–44] como, por exemplo, no estudo da interação de proteínas com diversas biomoléculas, interação DNA-ligantes, no desenvolvimento de novos fármacos, entre outras.

Os calorímetros atuais possuem uma alta sensibilidade (da ordem de 10^{-8} J), possibilitando uma medida com precisão da quantidade de calor liberado ou absorvido na interação entre moléculas. A Figura 2.11 ilustra, de maneira qualitativa, um calorímetro típico utilizado nos experimentos de ITC.

Como pode ser visto na Figura 2.11, o calorímetro possui duas células, uma de referência e a outra de medida, cada uma com um volume específico. Na célula de referência se encontra a molécula A, geralmente uma macromolécula. Nessa célula nada será acrescentado, servindo apenas como referência. Na célula de medidas se encontra a molécula A e, posteriormente, a molécula B, geralmente um ligante, que será titulado

2. As técnicas de caracterização das interações DNA-ligantes

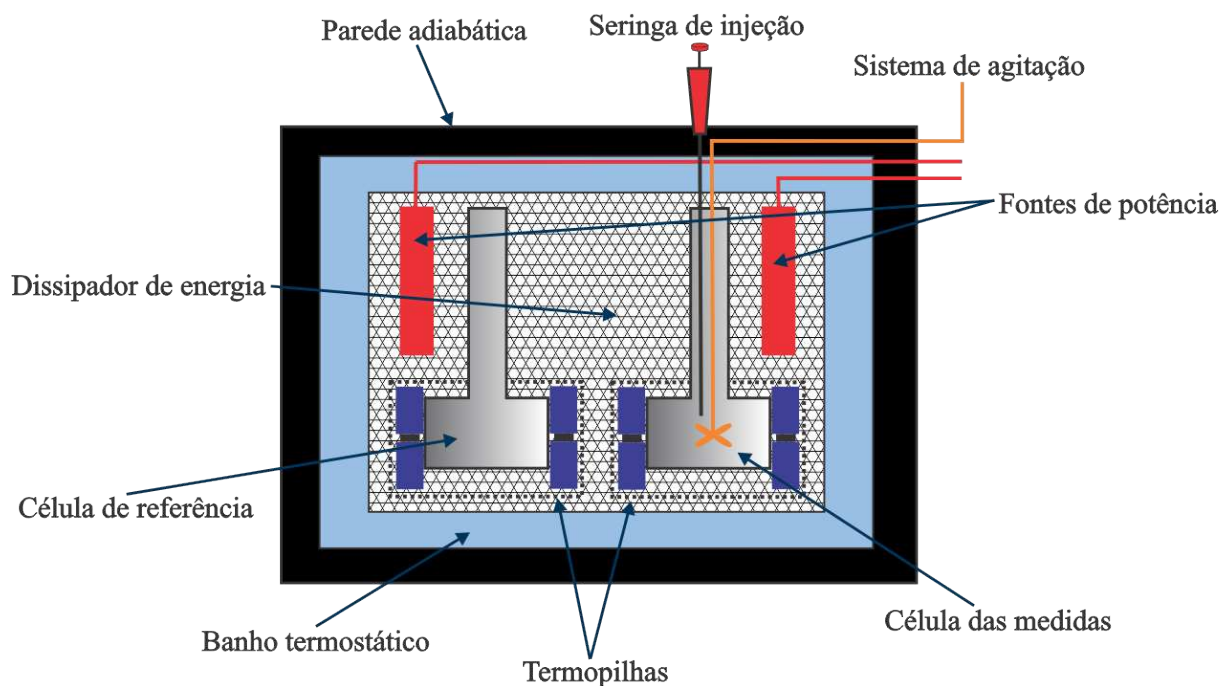


Figura 2.11: Ilustração de um calorímetro típico utilizado nos experimentos de ITC.

na célula de medidas através de um sistema de injeção. Um agitador, colocado no interior da célula das medidas, é o responsável por homogeneizar a solução. Todo o experimento é realizado em uma condição de pressão e temperatura constantes. O fluxo de calor absorvido ou liberado, após cada injeção do ligante, é detectado através de um sistema de termopilhas. A Figura 2.12 ilustra um termograma típico obtido em um experimento de ITC para uma reação exotérmica, ou seja, quando certa quantidade de calor é liberada da célula de medidas por unidade de tempo.

Antes da titulação do ligante, as células do calorímetro entram em contato com o banho termostático localizado no interior do aparelho e, após um certo intervalo de tempo, elas entram em equilíbrio térmico com o banho. Após o equilíbrio térmico ser atingido, espera-se mais um intervalo de tempo para que a linha base seja gerada, correspondendo à situação na qual a potência dissipada no calorímetro é constante. A linha base corresponde à linha tracejada mostrada na Figura 2.12.

Sabemos que a potência é a taxa com que certa quantidade de calor flui da célula de medidas por unidade de tempo, ou seja, $P = dQ/dt$. Realizando-se a integração

2. As técnicas de caracterização das interações DNA-ligantes

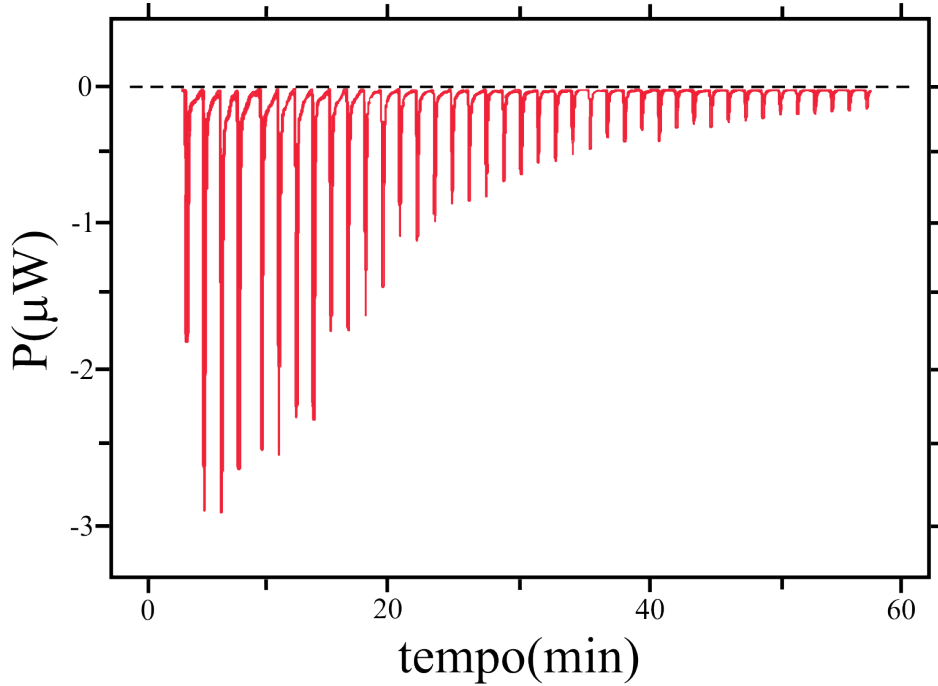


Figura 2.12: Ilustração de um termograma típico obtido em um experimento de ITC para uma reação exotérmica.

sobre todo o intervalo de tempo, teremos que

$$\int_{t_o}^{t_f} P dt = Q, \quad (2.21)$$

ou seja, a integração de todos os picos do termograma fornece a quantidade de calor liberada ou absorvida na célula de medidas durante o experimento de ITC [45]. Nosso objetivo agora é demonstrar que essa quantidade de calor, Q , é igual à variação de entalpia, ΔH , do sistema quando a pressão é mantida fixa durante todo o experimento [46]. Inicialmente, vamos definir a função de estado entalpia, H , estudada no âmbito da Termodinâmica e, posteriormente, mostraremos a relação entre Q e ΔH .

A energia interna, U , de um sistema termodinâmico pode ser considerada um função de duas variáveis entre a pressão, P , o volume, V , e a temperatura, T , uma vez que essas grandezas se relacionam através da equação de estado [47]. Vamos, inicialmente, escolher como variáveis fundamentais, P e T e, na sequência, escrever uma equação de estado que relacione V em termos de P e T . Dessa forma, nós teremos

2. As técnicas de caracterização das interações DNA-ligantes

duas funções: $U(P, T)$ e $V(P, T)$. Diferenciando ambas as funções, obtemos

$$dU = \left(\frac{\partial U}{\partial P} \right)_T dP + \left(\frac{\partial U}{\partial T} \right)_P dT, \quad (2.22)$$

e

$$dV = \left(\frac{\partial V}{\partial P} \right)_T dP + \left(\frac{\partial V}{\partial T} \right)_P dT. \quad (2.23)$$

A primeira lei da Termodinâmica, na sua forma diferencial, pode ser escrita como

$$\bar{d}Q = dU + \bar{d}W, \quad (2.24)$$

sendo que $\bar{d}W = PdV$.

Substituindo as equações (2.22) e (2.23) na equação (2.24), obtemos

$$\bar{d}Q = \left(\frac{\partial U}{\partial P} \right)_T dP + \left(\frac{\partial U}{\partial T} \right)_P dT + P \underbrace{\left[\left(\frac{\partial V}{\partial P} \right)_T dP + \left(\frac{\partial V}{\partial T} \right)_P dT \right]}_{dV}, \quad (2.25)$$

onde, rearranjando os termos, teremos

$$\bar{d}Q = \left[\left(\frac{\partial U}{\partial P} \right)_T + P \left(\frac{\partial V}{\partial P} \right)_T \right] dP + \left[\left(\frac{\partial U}{\partial T} \right)_P + P \left(\frac{\partial V}{\partial T} \right)_P \right] dT. \quad (2.26)$$

Se a pressão, P , é mantida constante durante o processo, então o primeiro termo na equação (2.26) desaparece, logo, teremos

$$\bar{d}Q = \left[\left(\frac{\partial U}{\partial T} \right)_P + P \left(\frac{\partial V}{\partial T} \right)_P \right] dT. \quad (2.27)$$

A capacidade térmica a pressão constante é definida pela equação [48]

$$C_P = \left(\frac{\bar{d}Q}{dT} \right)_P, \quad (2.28)$$

onde identificamos

$$C_P = \left(\frac{\partial U}{\partial T} \right)_P + P \left(\frac{\partial V}{\partial T} \right)_P. \quad (2.29)$$

A equação (2.29) pode ser simplificada, encontrando uma função, $H(P, T)$, de

2. As técnicas de caracterização das interações DNA-ligantes

forma que a capacidade térmica a pressão constante, C_P , possa ser escrita como

$$C_P = \left(\frac{dH}{dT} \right)_P , \quad (2.30)$$

onde $H(P, T)$ é chamada de entalpia.

Observando a equação (2.27) identificamos a entalpia como sendo

$$H(P, V) = U + PV . \quad (2.31)$$

Diferenciando ambos os lados da equação (2.31), teremos

$$dH = dU + PdV + VdP . \quad (2.32)$$

Combinando a equação (2.32) com a primeira lei da Termodinâmica, dada pela equação (2.24), obtemos

$$dH = dQ + VdP . \quad (2.33)$$

Considerando, novamente, que a pressão, P , é mantida constante durante o processo, teremos que

$$dH = dQ , \quad (2.34)$$

ou seja, a variação de entalpia é igual a quantidade de energia trocada na forma de calor entre o sistema e a sua vizinhança, se a pressão, P , é mantida constante. É importante mencionar que a entalpia, H , é definida em termos de funções de estado, como pode ser visto na equação (2.31), portanto, ela é também uma função de estado. A vantagem disso é que os processos envolvendo variações de entalpia, ΔH , medidas nos calorímetros através da energia transferida na forma de calor, dependem apenas dos estados inicial e final, não importando o “caminho” que conecta esses dois estados.

Capítulo 3

A interação DNA-Actinomicina D

Neste capítulo faremos uma breve descrição da Actinomicina D, discutiremos toda a metodologia utilizada para a caracterização da interação entre a molécula de DNA e a Actinomicina D e discutiremos todos os resultados obtidos.

3.1 A Actinomicina D

A Actinomicina D foi o primeiro antibiótico que mostrou possuir uma atividade antineoplásica [49]. O fármaco foi extraído pela primeira vez em 1940, por Selman Waksman e H. B. Woodruff, de bactérias do gênero *Streptomyces** [50]. O seu uso em humanos foi autorizado em 1964, pela FDA† e o fármaco foi comercializado com o nome de Cosmegen. A Actinomicina D é um dos fármacos anticâncer mais antigos e tem sido amplamente utilizada desde sua liberação em 1964. A Figura 3.1 mostra a estrutura molecular do composto.

A Actinomicina D é utilizada em tratamentos de tumores com uma alta malignidade, tais como, doença trofoblástica gestacional [19], tumor de Wilms [20] e rabdomiossarcoma [21]. O composto exibe um complexo mecanismo de interação com a molécula de DNA, com duas partes da molécula do composto se ligando através de di-

**Streptomyces* é um gênero de bactérias que habitam, principalmente, o solo e são responsáveis pelo cheiro característico de terra molhada. Devido ao grande número de microorganismos existentes no ambiente em que vivem, elas secretam antibióticos para matar outros microorganismos que competem com elas e que servem de nutrientes para o seu próprio desenvolvimento.

†FDA é a abreviação do termo em inglês “U. S. Food and Drug Administration”, que é a agência americana reguladora de alimentos e medicamentos.

3. A interação DNA-Actinomicina D

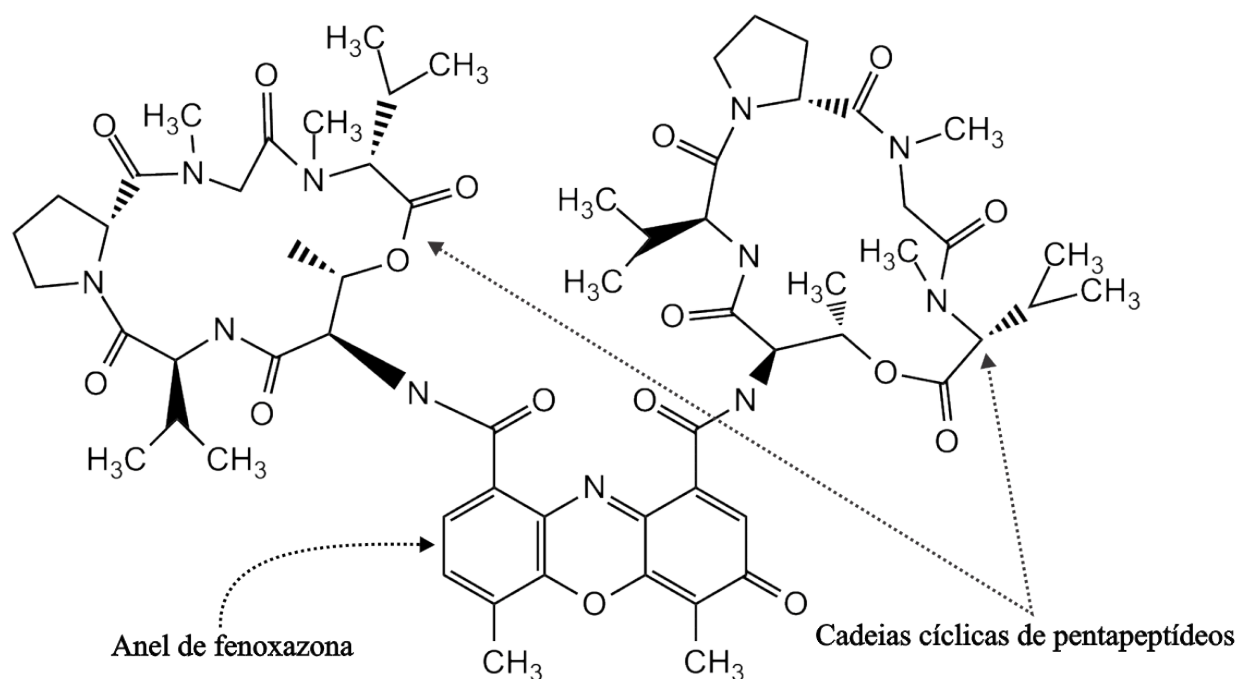


Figura 3.1: Estrutura molecular da Actinomicina D, $C_{62}H_{86}N_{12}O_{16}$, cuja massa molar é $M = 1255,42$ g/mol.

ferentes modos: enquanto o anel de fenoxazona se intercala preferencialmente nos pares de base C-G, a cadeia cíclica de pentapeptídeos se liga na fenda menor, geralmente, formando ligações de hidrogênio com as guaninas [51–54].

É bem estabelecido na literatura que esses tipos de interações podem perturbar fortemente a estrutura de dupla hélice, dependendo da concentração do composto. De fato, a intercalação, em geral, produz dois efeitos: um aumento no comprimento de contorno do DNA, através do aumento da distância axial entre dois pares de bases consecutivos e um giro na molécula de DNA, no sentido de desfazer a estrutura de dupla hélice [55–57]. Ligantes de fenda, por sua vez, podem induzir significantes dobras na molécula, desenrolamento parcial na estrutura de dupla hélice e eventualmente um giro de um nucleotídeo para fora da dupla hélice (do termo em inglês “base flipping”) [58,59]. Essas perturbações estruturais usualmente se refletem em mudanças nas propriedades mecânicas do DNA, de forma que o mecanismo de ação do fármaco pode ser encontrado monitorando as mudanças nesses parâmetros mecânicos, tais como: comprimento de contorno, comprimento de persistência, raio de giro, distância ponta à ponta, etc.

3.2 Construção do porta amostras e preparação da solução DNA-microesferas

Nessa seção, descrevemos o processo de construção do porta amostras e a preparação da solução DNA-microesferas utilizada em todos os experimentos apresentados nesse trabalho. É importante salientar que os procedimentos apresentados nas seções 3.2 e 3.3 são utilizados em todos os experimentos, por isso só serão apresentados nesse primeiro capítulo de resultados, que trata da interação DNA-Actinomicina D.

3.2.1 Preparação das amostras

As amostras utilizadas neste trabalho consistem em uma solução aquosa de PBS (do termo em inglês “Phosphate Buffer Saline”) com uma concentração de $\text{NaCl} = 140$ mM, além das microesferas de poliestireno com um diâmetro de $3,0 \mu\text{m}$ recobertas com estreptavidina e o DNA biotinilado. Utilizando o protocolo disponível na referência [25], foi possível realizar a biotinilização da molécula de DNA. Uma das pontas da molécula DNA é ligada a microesfera de poliestireno recoberta com estreptavidina e a outra ponta é ligada às moléculas de estreptavidina que recobrem a lamínula. Para fazer o recobrimento da lamínula, nós utilizamos o protocolo disponível na referência [60]. É importante mencionar que a biotina é uma vitamina do complexo B e a estreptavidina é uma proteína e que ambas possuem uma alta afinidade. Utilizando a pinça óptica para aprisionar a microesfera é possível então, realizar os estiramentos da molécula de DNA.

3.2.2 Construção do porta amostras

O nosso porta amostra consiste de uma lamínula (Corning) com uma espessura de aproximadamente $0,15$ mm, além de um anel de borracha do tipo *O-ring* com um diâmetro de $0,7$ cm. Utilizando-se um aquecedor, derretemos parafina para colar o *O-ring* na lamínula da Corning. A região delimitada pelo *O-ring* é recoberta com uma camada de estreptavidina, para que a biotina presente nas pontas da molécula de DNA possa se ligar. A seguir, detalhamos esse procedimento:

3. A interação DNA-Actinomicina D

(i) Depois de colado o *O-ring*, acrescentamos 25 μL de BSA*-biotinilada preparada no solvente que denominamos tampão A[†], com uma concentração de 1,8 $\mu\text{g/mL}$ e aguardamos ~ 30 minutos para que a área fosse totalmente recoberta.

(ii) Vencidos os 30 minutos, todo o excesso de BSA biotinilada é retirado e a amostra recebe uma camada de tampão A, que serve para "lavar" a amostra.

(iii) Na sequência, são inseridos 30 μL de estreptavidina preparada no tampão A, com uma concentração de 0,1 $\mu\text{g/mL}$ e aguardamos, novamente, mais 30 minutos aproximadamente, para que a área fosse totalmente recoberta.

(iv) Efetuamos novamente a "lavagem" da amostra, como citado no passo (ii).

(v) Por último, levamos o porta amostras ao microscópio e utilizando a própria iluminação do aparelho, efetuamos a secagem da amostra. Depois de alguns meses trabalhando com esse protocolo, percebemos que esse último passo era extremamente importante para que a ligação entre o DNA biotinilado e a estreptavidina que recobre o porta amostras, fosse otimizada.

3.2.3 Preparação da solução DNA-microesferas

Paralelamente à preparação do porta amostras, é efetuada também a preparação da solução contendo o DNA e as microesferas de poliestireno recobertas com estreptavidina. Para isso, seguimos a seguinte sequência de operações:

(i) Em um microtubo do tipo eppendorf, acrescentamos 20 μL de PBS 7,4[‡], que é o solvente utilizado na preparação de todas as concentrações do fármaco, além de 3 μL de microesferas de poliestireno recobertas com estreptavidina e 4 μL de DNA biotinilado previamente preparado utilizando o protocolo descrito na referência [25]. O eppendorf é então levado ao banho térmico a uma temperatura de 37°C[§] e o tempo de incubação é de 1 hora.

(ii) Vencido o tempo de incubação, acrescentamos 73 μL de PBS 7,4 para que

*A BSA, Albumina Sérica Bovina, do termo em inglês "Bovine Serum Albumin", é uma proteína que possui uma carga negativa em pH 7,4 e se liga ao vidro através da interação eletrostática.

[†]O solvente, que denominamos tampão A, consiste de uma solução previamente preparada com 10 mM de MgCl_2 , 40 mM de KCl, e 25 mM de Tris HCl em pH 8,0.

[‡]O número 7,4 representa o pH do solvente, que é o valor do pH intracelular, no qual o DNA se encontra *in vivo*.

[§]Nessa temperatura há uma otimização da ligação entre a biotina e estreptavidina

3. A interação DNA-Actinomicina D

a solução contenha um volume total de 100 μL e aguardamos mais ~ 20 minutos para a diluição da solução de DNA e microesferas.

(iii) Na sequência, utilizando uma micropipeta, levamos a solução de DNA para o microscópio e a inserimos ao porta amostras, que já se encontra seco e pronto para receber a solução de DNA.

(iv) Por último, esperamos ~ 20 minutos para que possa ocorrer a ligação entre a biotina no DNA e a estreptavidina que recobre o porta amostras.

Vencidas todas essas etapas, estamos prontos para começar o experimento, que consiste, inicialmente, na procura de um bom conjunto DNA-microesfera para a realização dos estiramentos.

3.3 Procedimento experimental para a realização dos estiramentos

Nessa seção, faremos uma descrição detalhada do procedimento experimental utilizado não somente para fazer a caracterização da interação DNA-Actinomicina D, mas também utilizada para a caracterização da interação DNA-GelRed e no estudo da influência do Polietilenoglicol na interação DNA-intercalantes, que serão discutidos nos capítulos seguintes.

3.3.1 Encontrando um bom conjunto DNA-microesferas

O primeiro passo, após a preparação da solução de DNA-microesferas, para que o nosso experimento seja bem sucedido é a procura de um bom conjunto DNA-microesferas para a realização dos estiramentos. A Figura 3.2 mostra as possíveis configurações para o DNA, as microesferas de poliestireno e do conjunto DNA-microesferas em nossa amostra.

É possível encontrar em nossa amostra várias configurações, dentre as quais podemos citar: DNA biotinilado isolado, microesferas de poliestireno aderidas à lamínula, moléculas de estreptavidina, BSA e biotina isoladas em solução, DNA com uma ponta aderida à microesfera mas com a outra ponta solta, além da situação que realmente nos

3. A interação DNA-Actinomicina D

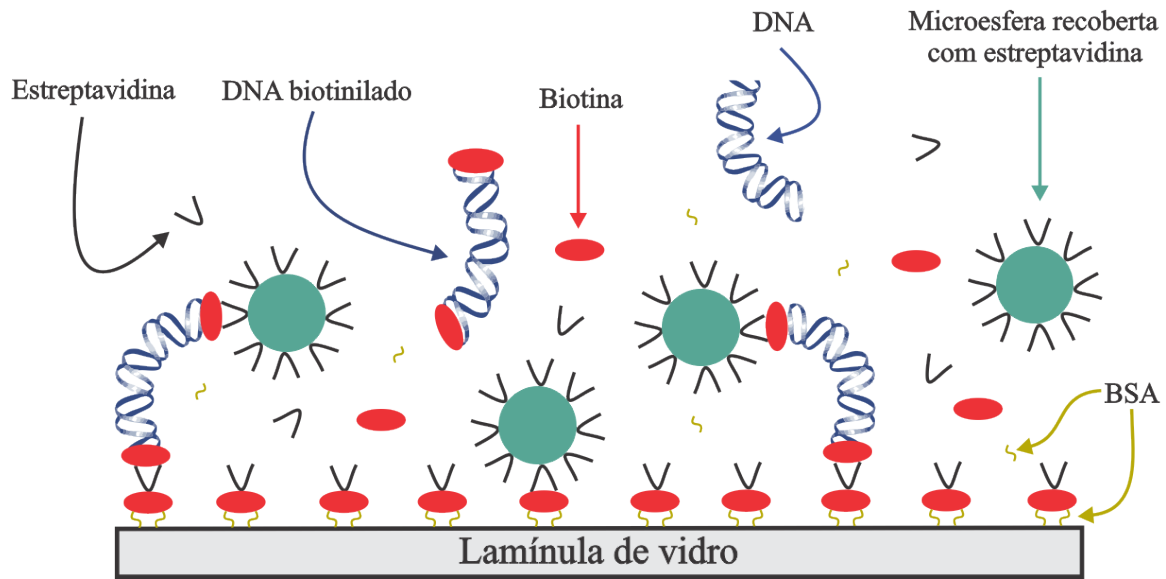


Figura 3.2: Possíveis configurações para o DNA, as microesferas de poliestireno e do conjunto DNA-microesferas em nossa amostra.

interessa que é uma ponta do DNA biotinizado adsorvido na microesfera de poliestireno recoberta com estreptavidina e a outra ponta adsorvida na lamínula de vidro recoberta com estreptavidina.

Inicialmente, procuramos as microesferas que executam movimento browniano, ou seja, aquelas microesferas que não estão aderidas à lamínula. Utilizando-se os deslocadores piezoelétricos acoplados ao microscópio óptico, a microesfera é puxada com a pinça óptica e obtemos duas situações:

(i) A microesfera permanece durante todo o deslocamento dentro do poço de potencial da pinça e, conseqüentemente, não há DNA colado a microesfera*.

(ii) Após um certo tempo, a microesfera escapa do poço de potencial da pinça e esse é um forte indício que há DNA colado tanto na microesfera quanto na lamínula. É importante destacar que não é possível enxergar o DNA via microscopia óptica e, dessa forma, a procura pelo DNA é dita indireta.

Mesmo após a configuração desejada ser encontrada, é importante verificar se não há mais de um DNA colado à microesfera. Isso pode ser feito esticando o DNA em

*Estritamente falando, é possível que mesmo nessa situação exista DNA colado a microesfera, mas a configuração que realmente nos interessa não é encontrada nesse caso.

3. A interação DNA-Actinomicina D

dois sentidos opostos (+x e -x, por exemplo) e verificando que o tempo que a microesfera demora para escapar do poço de potencial da pinça óptica seja aproximadamente o mesmo nos dois sentidos. Obviamente, isso não garante que haja apenas um único DNA colado à microesfera, mas é um forte indício.

3.3.2 Realização do estiramento da molécula de DNA

Uma vez encontrado um bom conjunto DNA - microesfera, estamos aptos a realizar os estiramentos. Inicialmente, deixamos o conjunto DNA - microesfera fora da pinça óptica para que este encontre sua configuração de equilíbrio. Uma vez obtida a posição de equilíbrio da microesfera, a pinça óptica é então utilizada para capturá-la.

O motor piezoelétrico que está acoplado ao estágio do microscópio é iniciado e a filmagem do experimento é iniciada simultaneamente. A velocidade na qual o estágio se desloca[†] é constante e, em nossos experimentos, seu valor foi de $v = 0,1 \mu\text{m/s}$. A Figura 3.3 mostra um esquema dos estiramentos da molécula de DNA.

A altura h da microesfera é mantida fixa em $\sim 4,0 \mu\text{m}$ enquanto o estágio do microscópio se desloca com velocidade constante. Como essa velocidade é muito baixa, podemos desprezar a força de Stokes que atua sobre a microesfera e considerar que o experimento é realizado em um regime quase-estático, de forma que a força que o DNA exerce sobre a microesfera é, em módulo, igual a força que a pinça óptica exerce sobre a mesma. A molécula de DNA é então esticada, até que ela escape do poço de potencial da pinça óptica. Quando isso acontece, esperamos novamente o DNA retornar a sua posição de equilíbrio e todo o procedimento discutido acima é repetido. Isso é feito para que no final do procedimento possamos tomar as médias dos valores dos parâmetros de interesse, a fim de melhorar a precisão do experimento.

Para encontrar a força que o DNA exerce sobre a microesfera, todo o experimento é filmado com uma câmera CCD (detalhes podem ser encontrados na Figura 2.4) e com isso podemos determinar a posição do centro de massa da microesfera em função do tempo, $x(t)$. Portanto, conhecendo-se a posição inicial da microesfera, $x(0)$, quando

[†]O porta amostras, contendo a solução de DNA, fica dentro do estágio do microscópio e, diante disso, a velocidade na qual o estágio do microscópio se desloca é igual a velocidade na qual o porta amostra se desloca.

3. A interação DNA-Actinomicina D

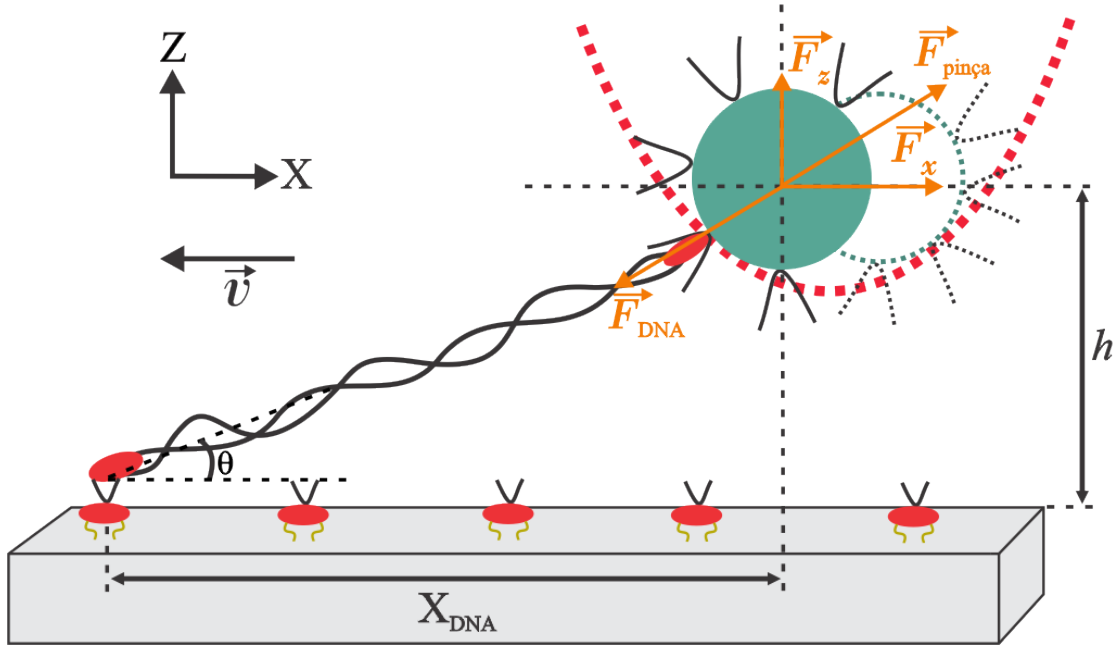


Figura 3.3: Esquema da realização dos estiramentos da molécula de DNA em um regime quase-estático. São mostradas duas posições da microesfera em instantes de tempo distintos, evidenciando o seu deslocamento dentro do poço de potencial gerado pela pinça óptica.

esta encontra-se no fundo do poço de potencial da pinça óptica, podemos calcular a mudança da posição da microesfera, em função do tempo, dada por

$$\Delta x(t) = x(t) - x(0) . \quad (3.1)$$

A força que o DNA exerce sobre a microesfera[‡], em função do tempo, é dada por

$$F(t) = \kappa \Delta x(t) , \quad (3.2)$$

onde κ é a constante de força da pinça óptica.

A Figura 3.4 mostra a curva típica obtida com esse procedimento, além do ajuste feito utilizando-se o modelo WLC [26].

[‡]Repare que esta força é igual a força óptica gerada pela pinça quando a microesfera se desloca dentro do poço de potencial. No entanto, conforme já discutimos acima, esta força é igual, em módulo, à força que a molécula de DNA exerce sobre a microesfera, visto que o experimento é realizado em um regime quase-estático.

3. A interação DNA-Actinomicina D

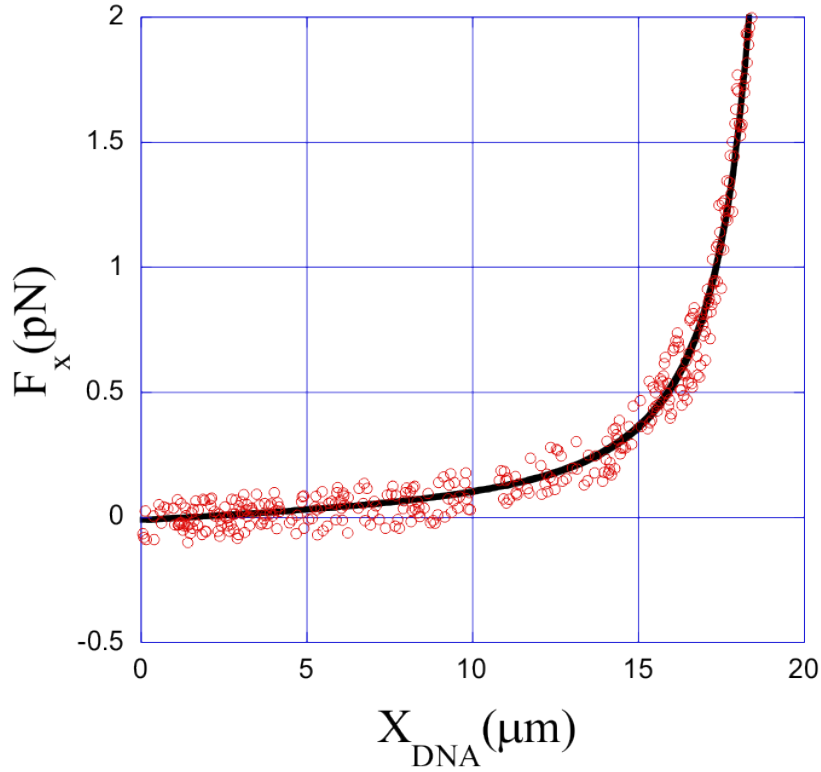


Figura 3.4: Curva típica da componente x da força $\times$ extensão do DNA. O ajuste é feito utilizando-se a equação 3.4.

A expressão de Marko e Siggia (modelo WLC) é dada pela equação

$$F = \frac{k_B T}{A} \left[\frac{z}{L} + \frac{1}{4 \left(1 - \frac{z}{L}\right)^2} - \frac{1}{4} \right], \quad (3.3)$$

onde k_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura absoluta, A o comprimento de persistência, L o comprimento de contorno e z é a extensão da molécula de DNA.

No entanto, como estamos realizando o experimento na direção x , é mais conveniente utilizar a componente x da equação (3.3). Observe, na Figura 3.3, que a extensão do DNA, z , é dada por $z = \sqrt{x_{DNA}^2 + h^2}$ e $F_x = F \cos \theta = F(x_{DNA}/z)$. A altura h é fixa durante todo o experimento e seu valor é $\sim 4,0 \mu\text{m}$. Substituindo essas relações na equação (3.3), obtemos a expressão final da componente x da força, dada

3. A interação DNA-Actinomicina D

por

$$F_x = \frac{k_B T}{A} \left[\frac{\sqrt{x_{DNA}^2 + h^2}}{L} + \frac{1}{4 \left(1 - \frac{\sqrt{x_{DNA}^2 + h^2}}{L} \right)^2} - \frac{1}{4} \right] \frac{x_{DNA}}{\sqrt{x_{DNA}^2 + h^2}} . \quad (3.4)$$

Utilizando a equação (3.4), nós fizemos o ajuste aos dados experimentais da Figura 3.4, para a molécula de λ -DNA[§] pura e obtivemos os valores do comprimento de contorno e de persistência, respectivamente, iguais a: $L = (16,5 \pm 1) \mu\text{m}$ e $A = (50 \pm 3) \text{ nm}$, obtidos com uma média de 7 estiramentos com uma mesma molécula de λ -DNA. Nossos resultados possuem grande semelhança com os dados encontrados na literatura [62,63] e, portanto, o procedimento pode ser usado para estudar a variação das propriedades mecânicas da molécula de DNA ao interagir com os fármacos/compostos utilizados nesse trabalho.

3.3.3 Adição do fármaco na amostra

Uma vez realizado todos os estiramentos com a molécula pura de λ -DNA, era necessário incluir o fármaco na amostra. As alíquotas contendo o fármaco foram inseridas diretamente na amostra, introduzindo a micropipeta no porta amostras contendo a solução de DNA-microesferas. A Figura 3.5 ilustra esse procedimento.

A Actinomicina D utilizada em nossos experimentos foi produzida pela *Sigma-Aldrich* e as alíquotas contendo o fármaco foram preparadas de forma a fornecer uma faixa de concentração que variava desde $1 \mu\text{M}$ até $12 \mu\text{M}$.

A mesma alíquota era inserida e retirada algumas vezes da amostra, para garantir que a concentração do fármaco na amostra fosse praticamente a mesma daquela previamente preparada no eppendorf.

É importante ressaltar que esse procedimento de adição e troca do fármaco é extremamente importante, uma vez que permite realizar o experimento completo com a mesma molécula de DNA, para várias concentrações do fármaco.

[§]O fago λ é um vírus que infecta a bactéria *E. Coli* [61]. O DNA do fago λ é ideal para os nossos experimentos, devido ao seu tamanho. Uma molécula de λ -DNA possui cerca de 48.500 pares de base, o que resulta em um comprimento de contorno médio de $16,5 \mu\text{m}$.

3. A interação DNA-Actinomicina D

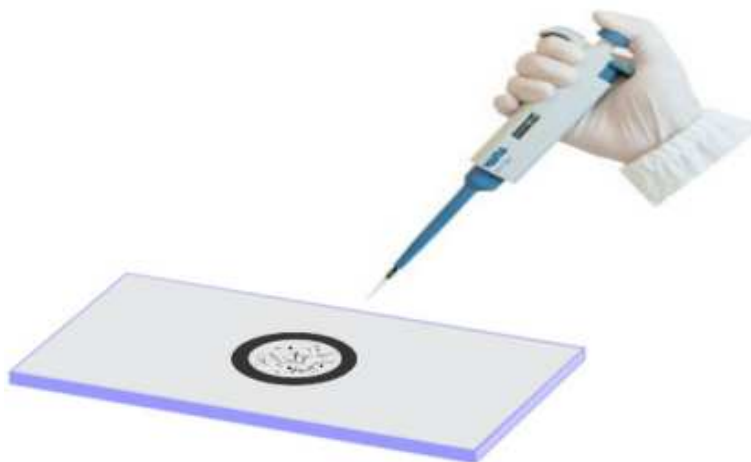


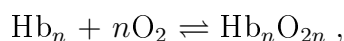
Figura 3.5: Ilustração do procedimento usado para a troca das alíquotas contendo a Actinomicina D.

3.4 Caracterização da interação DNA-Actinomicina D

Nesta seção discutiremos o modelo de Hill e o modelo teórico proposto por Siman *et al.* [64] para extrair os dados físico-químicos da interação para compostos que apresentam um comportamento não monotônico para o comprimento de persistência, A , em função da concentração do composto, como é o caso da Actinomicina D. Além disso, apresentaremos detalhadamente os resultados obtidos para a interação da Actinomicina D com o DNA.

3.4.1 O modelo de Hill

O modelo de Hill, proposto em 1910 pelo fisiologista inglês Archibald Vivian Hill, foi formulado para explicar a interação do oxigênio com a hemoglobina* [65]. De maneira geral, essa interação pode ser descrita através da reação



onde Hb_n representa um agregado com n moléculas de Hb.

*A hemoglobina é uma proteína presente nas hemácias, cuja função é absorver o oxigênio presente nos pulmões e transportá-lo aos tecidos de todo o corpo.

3. A interação DNA-Actinomicina D

Podemos definir a constante de interação aparente, K_A , quando n moléculas de O_2 se ligam a um agregado de Hb_n , como sendo

$$K_A = \frac{[Hb_n O_{2n}]}{[Hb_n][O_2]^n} , \quad (3.5)$$

onde $[Hb_n O_{2n}]$, $[Hb_n]$ e $[O_2]$ representam a concentração do composto resultante e as concentrações dos solutos, respectivamente.

Se cada molécula de oxigênio que se liga com a hemoglobina possuir a mesma constante de interação (no equilíbrio), K_i , então a equação seguinte é válida

$$K_A = K_i^n . \quad (3.6)$$

O modelo de Hill pode ser adaptado ao nosso estudo da interação da molécula de DNA com fármacos/compostos. Para isso, vamos substituir as moléculas de hemoglobina (Hb) pelas moléculas de DNA e as moléculas de oxigênio (O_2) pelas moléculas dos fármacos/compostos. Desse modo, $[O_2] \equiv C_f$, representa a concentração de fármacos/compostos livres em solução (do termo inglês “free”); $[Hb_n O_{2n}] \equiv C_b$, representa a concentração de fármacos/compostos ligados ao DNA (do termo inglês “bound”) e, finalmente, $[Hb_n] \equiv C_{bp} - C_b$, representa o número de sítios livres na molécula de DNA. C_{bp} é a concentração de pares de base do DNA (do termo inglês “base-pair”), que é uma constante em nossos experimentos.

Substituindo a equação (3.6) na equação (3.5) e fazendo as adaptações citadas no parágrafo anterior, podemos escrever a seguinte equação

$$K_i^n = \frac{C_b}{C_f^n (C_{bp} - C_b)} . \quad (3.7)$$

Dividindo o numerador e o denominador, do lado direito da equação (3.7), por C_{bp} , temos que

$$K_i^n = \frac{r}{C_f^n (1 - r)} , \quad (3.8)$$

onde

$$r = \frac{C_b}{C_{bp}} = \frac{N_b}{N_{bp}} , \quad (3.9)$$

3. A interação DNA-Actinomicina D

representa a fração de sítios ligados, que pode ser definida em termos da razão entre concentrações, C_b/C_{bp} ou em termos da razão entre os números de moléculas, N_b/N_{bp} .

Isolando r na equação (3.8), finalmente chegamos à isoterma de “ligação” do modelo de Hill (ou equação de Hill), dada por

$$r = \frac{(K_i C_f)^n}{1 + (K_i C_f)^n}, \quad (3.10)$$

onde K_i é a constante da interação (no equilíbrio) e n é o expoente de Hill, um parâmetro usualmente utilizado para medir o grau de cooperatividade em reações químicas[†]. O expoente de Hill, também pode ser interpretado como o limite inferior de sítios que efetivamente cooperam para a ligação [66] e, conseqüentemente, uma medida da média do número de moléculas do composto que formam um agregado [64].

Da maneira como foi originalmente formulado, o modelo de Hill prevê que apenas moléculas pequenas possam se ligar aos sítios vazios, que não é o caso da maioria dos fármacos/compostos utilizados no laboratório de Física Biológica. Em outras palavras, o modelo de Hill não admite a possibilidade de uma molécula do ligante excluir alguns sítios vizinhos após a sua ligação. Podemos “contornar” esse fato ao introduzirmos um termo *ad hoc* na equação (3.10). Esse termo, r_{max} , representa a fração máxima de sítios ligados e, dessa forma, a equação (3.10) passa a ser escrita como

$$r = \frac{r_{max}(K_i C_f)^n}{1 + (K_i C_f)^n}. \quad (3.11)$$

Se todos os sítios disponíveis estão ocupados, então $r_{max} = 1$ e a molécula de DNA está saturada. Por outro lado, se uma molécula, ao interagir com o DNA, exclui alguns sítios vizinhos, então $r_{max} < 1$. A Figura 3.6 mostra um gráfico teórico de r em função de C_f para vários valores de n , utilizando a equação (3.11). Nesse gráfico, $r_{max} = 1$ e $K_i = 10^5 \text{ M}^{-1}$, para todas as curvas.

[†]Se $n > 1$, então há uma cooperatividade positiva, ou seja, uma molécula do composto, ao interagir com o DNA, aumenta a afinidade do polímero para a ligação subsequente. Por outro lado, se $n < 1$, então há uma cooperatividade negativa, ou seja, uma molécula do composto, ao interagir com o DNA, diminui a afinidade do polímero para a ligação subsequente. Se $n = 1$, a interação é não cooperativa e a afinidade é independente do número de moléculas ligadas.

3. A interação DNA-Actinomicina D

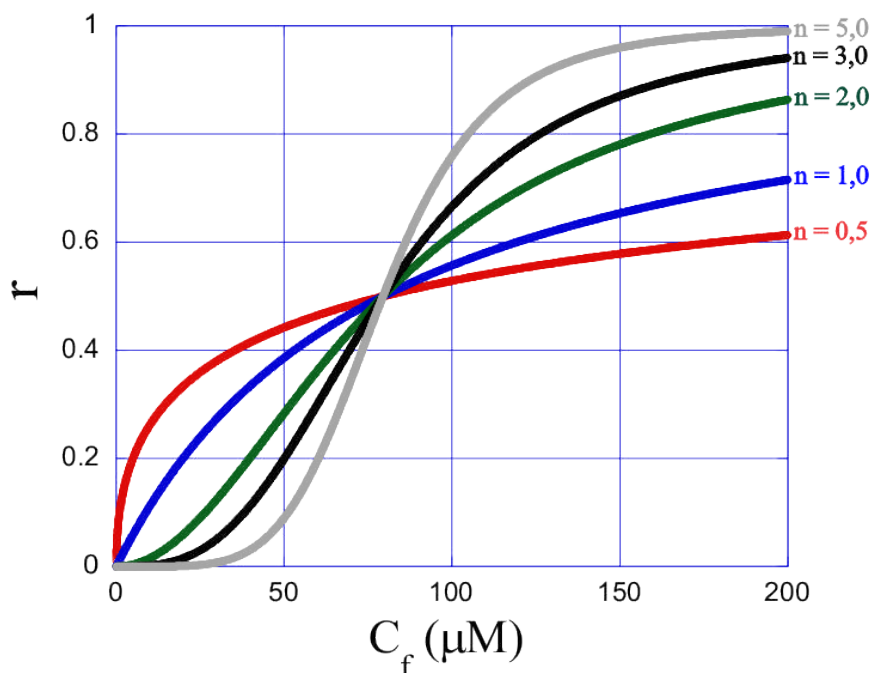


Figura 3.6: Gráfico de r em função de C_f , para vários valores de n . Nesse gráfico, $r_{max} = 1$ e $K_i = 10^5 \text{ M}^{-1}$, para todas as curvas.

É importante observar que, quanto maior o valor de n , menor o valor de C_f quando a curva começa a atingir o limiar de saturação para a fração máxima de sítios ligados que, nesse caso, é $r_{max} = 1$.

3.4.2 O modelo estatístico de dois sítios

O modelo estatístico de dois sítios, formulado em parceria com o grupo de Física Biológica da UFMG, surgiu da necessidade de explicar a interação da β -ciclodextrina com a molécula de DNA [64]. O modelo é uma poderosa ferramenta que permite a extração de parâmetros físico-químicos da interação de fármacos que apresentam um comportamento não monotônico no gráfico de comprimento de persistência, A , em função da concentração do fármaco.

O modelo assume que os compostos possam se ligar à molécula de DNA com uma cooperatividade positiva[‡], formando agregados. Esses agregados têm uma distribuição

[‡]Se um composto apresenta uma cooperatividade positiva, significa que ele aumenta a afinidade da molécula de DNA para que mais moléculas do composto possam se ligar ao polímero.

3. A interação DNA-Actinomicina D

de tamanho estreita, com n moléculas na média e estão distribuídos aleatoriamente ao longo da molécula de DNA. Se não há cooperatividade, como no caso da Actinomicina D, $n = 1$ e cada molécula do ligante está localizada aleatoriamente ao longo da molécula de DNA. Quando uma molécula do composto se liga ao DNA, ela muda o comprimento de persistência local da molécula pura de DNA de A_0 para o valor A_1 . Se duas moléculas do composto se ligam à molécula de DNA em sítios vizinhos, o comprimento de persistência local muda para o valor A_2 .

Vamos chamar de C_T [§] a concentração total do composto, C_f a concentração de composto livre em solução e C_b a concentração de composto ligado. Essas grandezas se relacionam através da equação

$$C_T = C_f + C_b. \quad (3.12)$$

A fração de sítios ligados, r , é dada pela equação (3.9) e o termo, r_{max} , que foi introduzido na equação (3.10), representa a fração máxima de sítios ligados, como discutido em detalhes na seção 3.4.1. Consequentemente, a probabilidade de um sítio estar ocupado é r/r_{max} e a probabilidade de um sítio não estar ocupado é $1 - r/r_{max}$. Assumindo uma distribuição aleatória para a distribuição de sítios ligados, nós teremos três probabilidades distintas relacionadas à ligação de moléculas em sítios vizinhos: (a) dois sítios vizinhos não ocupados com comprimento de persistência local A_0 e probabilidade $P_0 = (1 - r/r_{max})^2$; (b) dois sítios vizinhos simultaneamente ocupados com comprimento de persistência local A_2 e probabilidade $P_2 = (r/r_{max})^2$ e, finalmente, (c) um sítio não ocupado e um sítio ocupado com comprimento de persistência local A_1 e probabilidade $P_1 = 1 - P_0 - P_2 = (2r/r_{max})(1 - r/r_{max})$. Como discutido na referência [64], essa distribuição de probabilidade pode ser usada mesmo quando o ligante apresenta cooperatividade com a molécula de DNA. A Figura 3.7 ilustra essa distribuição de probabilidades de ocupação em um fragmento da molécula de DNA.

Segundo o modelo estatístico de dois sítios, o comprimento de persistência efetivo, supondo a molécula de DNA como uma associação de molas entrópicas em série,

[§]Observe que C_T é a concentração total de composto que é adicionada a amostra contendo o DNA, colocando a micropipeta diretamente na amostra.

3. A interação DNA-Actinomicina D

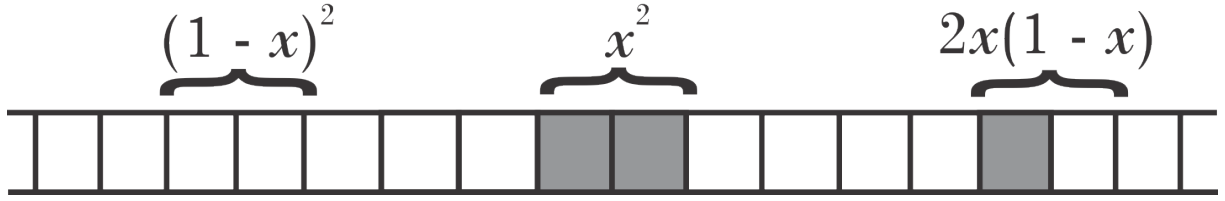


Figura 3.7: Distribuição de probabilidades de ocupação, segundo o modelo estatístico de dois sítios, em um fragmento da molécula de DNA, onde $x = r/r_{max}$.

é dado por

$$\frac{1}{A} = \frac{P_0}{A_0} + \frac{P_1}{A_1} + \frac{P_2}{A_2} . \quad (3.13)$$

Substituindo os valores de P_0 , P_1 e P_2 na equação (3.13) e reorganizando os termos, teremos

$$\frac{1}{A} = \frac{1}{A_0} + \left(\frac{2}{A_1} - \frac{2}{A_0} \right) \left(\frac{r}{r_{max}} \right) + \left(\frac{1}{A_0} - \frac{2}{A_1} + \frac{1}{A_2} \right) \left(\frac{r}{r_{max}} \right)^2 . \quad (3.14)$$

A relação entre a fração de sítios ligados, r , e a concentração de ligante livre em solução, C_f , pode ser aproximadamente descrita pela isoterma de “ligação” do modelo de Hill [66], dada pela equação (3.11).

A concentração de ligante livre em solução, C_f , pode ser escrita como, $C_f = C_T - rC_{bp}$. Substituindo essa relação na equação (3.11), podemos escrever que

$$\frac{r}{r_{max}} = \frac{[K_i(C_T - rC_{bp})]^n}{1 + [K_i(C_T - rC_{bp})]^n} . \quad (3.15)$$

Na referência [64], os autores demonstram que a equação (3.15) tem uma única solução e que ela pode ser determinada para uma condição inicial qualquer, o que é bastante apropriado quando queremos ajustar uma curva a conjunto de pontos experimentais. Para resolver a equação (3.15), vamos inicialmente definir $x = r/r_{max}$, de modo que ela possa ser escrita como

$$x = \frac{[K_i(C_T - rC_{bp})]^n}{1 + [K_i(C_T - rC_{bp})]^n} . \quad (3.16)$$

Observe que essa equação pode ser resolvida numericamente desde que os valores das

3. A interação DNA-Actinomicina D

constantes sejam conhecidos, retornando x para cada valor de C_T . Para isso, um algoritmo foi desenvolvido utilizando uma subrotina para resolver a equação (3.16) para valores iniciais das constantes. Uma vez obtido os valores dessas constantes, voltamos na equação (3.14) e substituímos esses valores, uma vez que essa equação foi utilizada para ajustar os valores do comprimento de persistência, A , em função de C_T/C_{bp} . Os ajustes foram feitos utilizando-se o programa *MATLAB*[®], através da função dos mínimos quadrados (do termo inglês “Least Squares Fitting”). Todo esse procedimento nos possibilitou extrair os dados da interação do DNA com a Actinomicina D (r_{max} , K_i e n) através de medidas puramente mecânicas.

3.4.3 Resultados obtidos para a interação DNA-Actinomicina D

A Figura 3.8 mostra o comportamento do comprimento de persistência, A , em função da concentração total de fármaco, C_T , normalizada pela concentração de pares de base de DNA na amostra, C_{bp} .

Observe que o comprimento de persistência exibe um comportamento não monotônico. Ele inicialmente decresce do valor para o DNA puro (~ 50 nm) até ~ 23 nm na concentração $C_T/C_{bp} = 0,09$. A partir dessa concentração, seu valor aumenta atingindo ~ 43 nm na concentração de $C_T/C_{bp} = 0,66$. Finalmente, para concentrações maiores que $C_T/C_{bp} > 0,66$, o comprimento de persistência cai abruptamente para ~ 25 nm.

O comportamento não monotônico exibido para as concentrações $C_T/C_{bp} < 0,66$, pode ser entendido utilizando-se o modelo estatístico de dois sítios, discutido na seção 3.4.2. A queda abrupta do comprimento de persistência para concentrações $C_T/C_{bp} > 0,66$, está relacionada, provavelmente, a uma desnaturação parcial da molécula de DNA, através da formação de bolhas de desnaturação, induzida pela força aplicada pela pinça óptica, como discutido nas referências [67,68]. A Figura 3.9 mostra, de maneira qualitativa, uma molécula de DNA com uma bolha de desnaturação. A princípio, esse efeito poderia ser descrito adicionando-se mais um comprimento de persistência local na equação (3.14), associado a formação de bolhas de desnaturação. No

3. A interação DNA-Actinomicina D

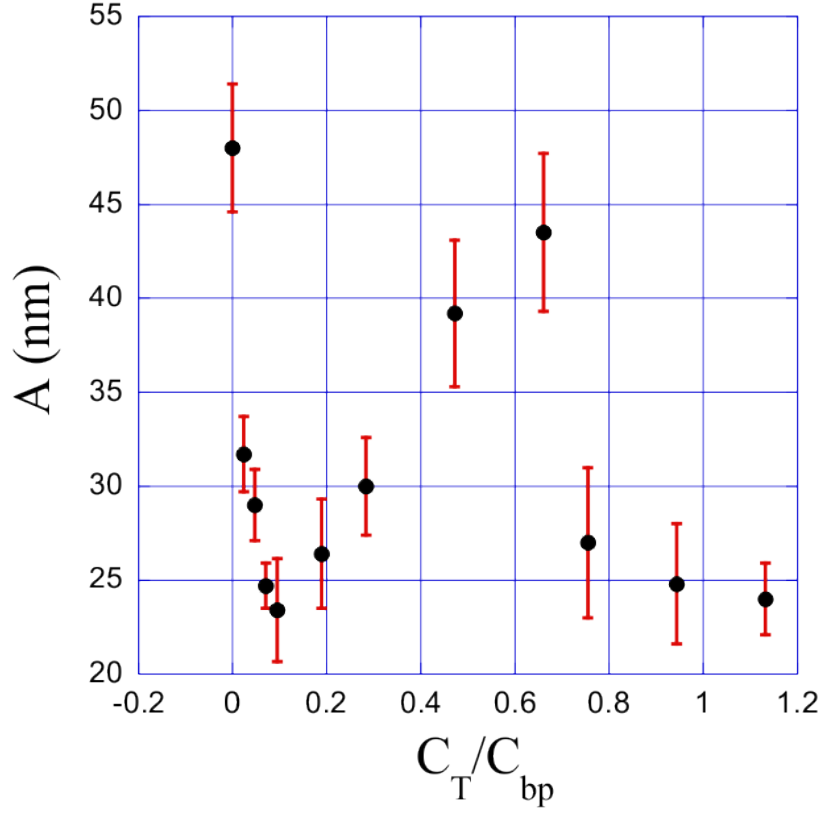


Figura 3.8: Comprimento de persistência, A , em função da razão de concentrações, C_T/C_{bp} , para os complexos DNA-Actinomicina D.

entanto, o número de parâmetros ajustáveis se tornaria maior, dificultando o processo de ajuste dos pontos experimentais. Além disso, nós estamos interessados em estudar a interação DNA-fármacos, quando a molécula de DNA não se encontra desnaturada (ou parcialmente desnaturada), de forma que os dados para concentrações $C_T/C_{bp} > 0,66$, não foram incluídos na nossa análise.

Inicialmente, nós fizemos o ajuste dos dados experimentais da Figura 3.8 utilizando a equação (3.14), deixando A_1 , A_2 , K_i , n e r_{max} como parâmetros ajustáveis. Para isso, nós utilizamos todo o procedimento discutido na seção 3.4.2 e $A_0 = 48$ nm, que é o valor do comprimento de persistência para o DNA puro. O resultado desse procedimento está mostrado na Figura 3.10.

Por conveniência, o ajuste foi realizado no gráfico do inverso do comprimento de persistência, $1/A$, em função da razão de concentrações, C_T/C_{bp} , pois a equação (3.14)

3. A interação DNA-Actinomicina D

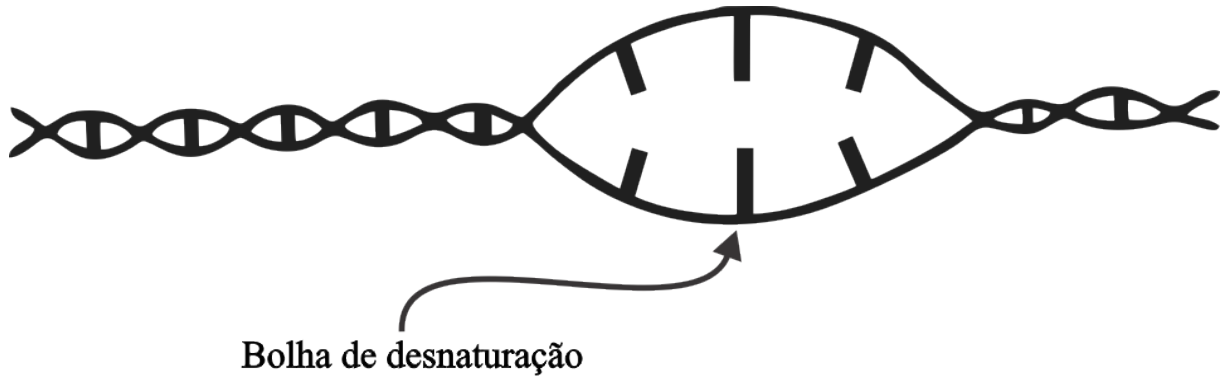


Figura 3.9: Molécula de DNA com uma bolha de desnaturação, devido à aplicação da força pela pinça óptica.

apresenta uma relação com os inversos dos comprimentos de persistência. É importante mencionar que o modelo teórico se ajusta de maneira bastante satisfatória aos dados experimentais. Desse ajuste, nós obtivemos os seguintes valores: $A_1 = 15,2 \pm 0,6$ nm, $A_2 = 65 \pm 25$ nm, $K_i = (1,5 \pm 0,4) \times 10^6$ M⁻¹, $n = 1,1 \pm 0,2$ e $r_{max} = 0,11 \pm 0,01$.

Como mencionado na seção 3.4.2, A_1 e A_2 são os comprimentos de persistências locais, associados com a ligação de uma e duas moléculas de Actinomicina D em sítios vizinhos, respectivamente. Portanto, o resultado obtido $A_1 < A_0$, indica que a ligação de uma molécula de Actinomicina D diminui o comprimento de persistência efetivo dos complexos DNA-Actinomicina D, enquanto o resultado $A_2 > A_1$ indica que a interação de duas moléculas de Actinomicina D em sítios vizinhos aumenta o comprimento de persistência efetivo dos complexos DNA-Actinomicina D. A barra de erro relativamente grande, apresentada para A_2 , é explicada pelo fato do grande número de parâmetros ajustáveis no modelo teórico. Quando essa mesma metodologia é aplicada a um sistema DNA-ligante particular, é possível obter barras de erros menores, quando alguns dos parâmetros ajustáveis são previamente determinados por outras técnicas experimentais e, dessa maneira, reduzindo o número de parâmetros ajustáveis.

O fato de $n \sim 1$, indica que a interação não é cooperativa, o que está de acordo com os resultados experimentais obtidos com outras técnicas [69,70]. Além disso, podemos utilizar o valor da fração máxima de sítios ligados, r_{max} , para estimar o número de pares de base que são excluídos por uma molécula de Actinomicina D no λ -DNA, que

3. A interação DNA-Actinomicina D

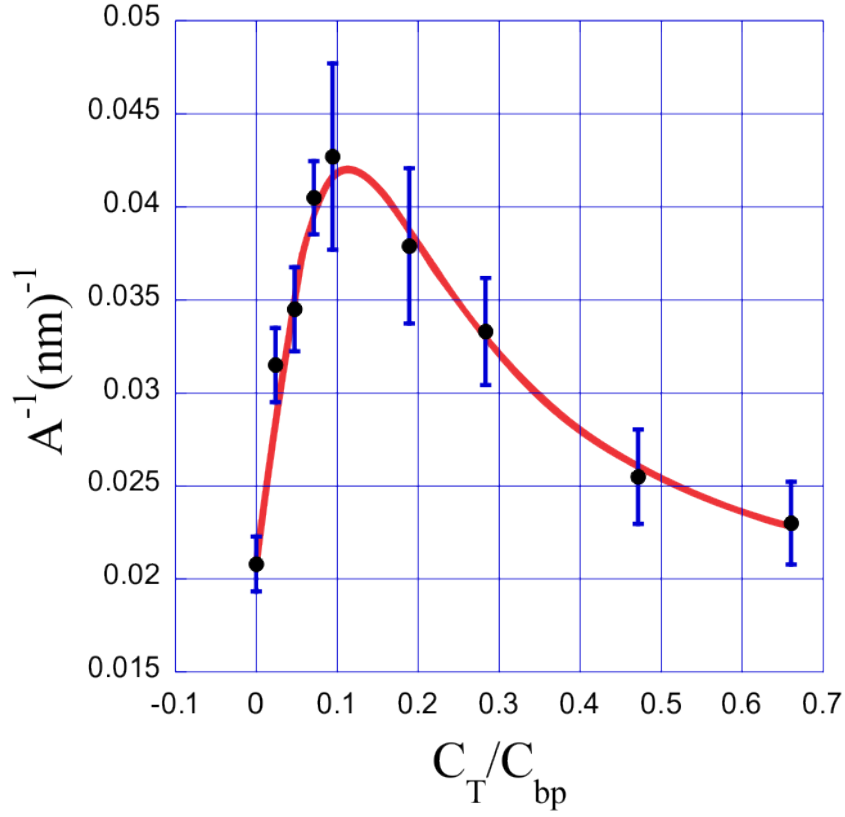


Figura 3.10: Círculos: inverso do comprimento de persistência, $1/A$, em função da razão de concentrações, C_T/C_{bp} , obtido a partir dos dados experimentais da Figura 3.8. Linha: ajuste feito usando o modelo estatístico de dois sítios, através da equação (3.14).

é, $N = 1/r_{max} = 9,1 \pm 0,8$. Na referência [71], os autores encontraram que o número de pares de base excluídos por uma molécula de Actinomicina D é 11, usando o DNA extraído do timo de bezerro. É importante salientar, entretanto, que esse número não significa que 9 sítios estão efetivamente ocupados por uma molécula de Actinomicina D, pois devemos levar em conta o fato da ligação gerar sítios vazios ao longo da molécula de DNA. O número de sítios que uma molécula de Actinomicina D efetivamente ocupa é ~ 4 [69].

Finalmente, o valor obtido para a constante de interação (no equilíbrio), K_i , está em excelente acordo com os valores reportados na literatura utilizando outras abordagens e técnicas experimentais, embora tenham sido utilizados diferentes tipos de DNA [69,72,73]. A maioria das drogas anticâncer possuem constantes de equilíbrio da ordem de 10^4 a 10^7 M^{-1} quando interagem com o DNA. Como exemplos, podemos

3. A interação DNA-Actinomicina D

citar o antibiótico antraciclínico Daunomicina ($7,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$), que é usado para o tratamento de leucemia e outros tipos de câncer [74]; o intercalante Psoralen ($9,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$), utilizado no tratamento de várias doenças de pele [67] e o composto de platina, Cisplatina ($1,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$), utilizado no tratamento de vários tipos de câncer, dentre os quais podemos citar: câncer de cabeça, pescoço, pulmões e sistema genituri-nário [75,76]. Enquanto a constante de ligação no equilíbrio, K_i , indica qual composto se liga mais fortemente ao DNA, o expoente de Hill, n , possui um papel fundamental no entendimento do mecanismo de ação do composto, uma vez que ele está correlacionado com a cooperatividade da interação e com o tamanho do agregado formado entre o DNA e o composto. Os dois primeiros exemplos, Daunomicina e Psoralen, são ligantes que não apresentam cooperatividade, enquanto a Cisplatina possui uma cooperatividade positiva [75,77]. Nos tratamentos de câncer, geralmente, são utilizadas duas ou mais drogas que são complementares, a fim de potencializar os resultados. Portanto, entender as diferenças nos aspectos moleculares das interações DNA-fármacos, pode melhorar a eficácia de tais tratamentos. No entanto, não é objetivo desse trabalho classificar a eficiência da Actinomicina D frente a outras drogas utilizadas em tratamentos quimioterápicos, uma vez que essa classificação depende fortemente da especificidade de cada tipo de câncer que se deseja tratar.

A Figura 3.11 mostra o aumento relativo do comprimento de contorno, $\Delta L/L_0$, em função da concentração total de fármaco, C_T , normalizada pela concentração de pares de base de DNA na amostra, C_{bp} .

É importante observar que o comprimento de contorno aumenta monotonicamente com o aumento da concentração de Actinomicina D na amostra, assemelhando-se ao comportamento de intercalantes típicos [67]. Para fazer o ajuste dos dados experimentais da Figura 3.11, nós assumimos que o comprimento de contorno aumenta quando dois sítios da molécula de DNA são ocupados simultaneamente, de modo que,

$$\frac{\Delta L}{L_0} = \gamma P_2 = \gamma \left(\frac{r}{r_{max}} \right)^2, \quad (3.17)$$

onde γ é o valor de saturação de $\Delta L/L_0$ e $r/r_{max} = x$ é dada pela equação (3.16). Essa suposição, quanto ao aumento do comprimento de contorno, é bastante razoável,

3. A interação DNA-Actinomicina D

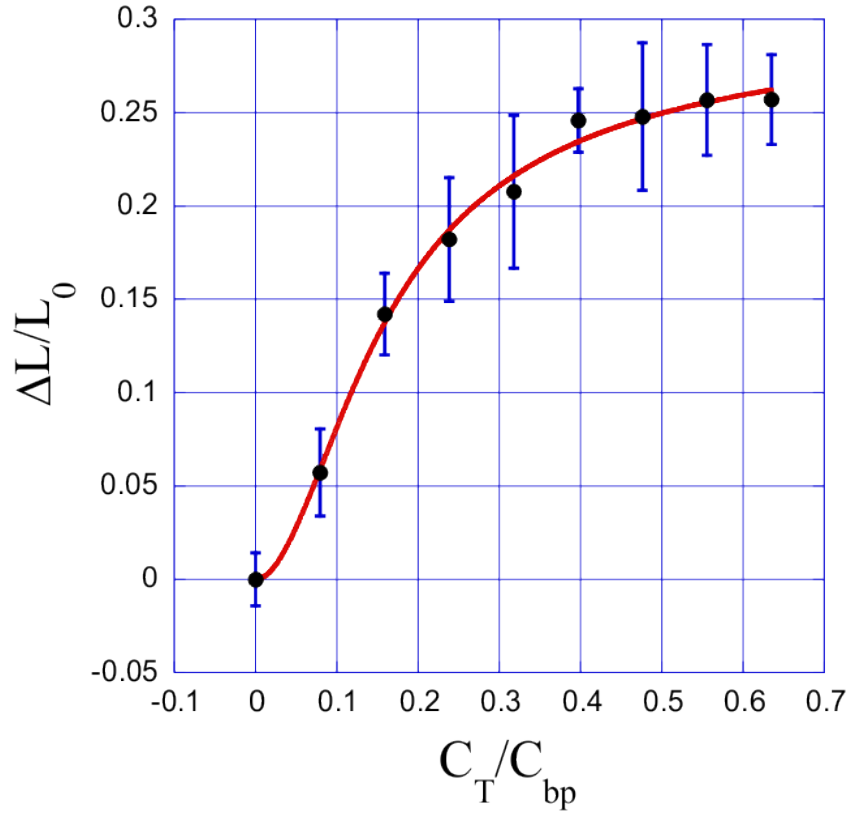


Figura 3.11: Círculos: aumento relativo do comprimento de contorno, $\Delta L/L_0$, em função da razão de concentrações, C_T/C_{bp} . Linha: ajuste feito usando a equação (3.17).

uma vez que quando duas moléculas de Actinomicina D ocupam dois sítios vizinhos no DNA, há também um aumento do comprimento de persistência, do valor inicial A_0 para o valor A_2 , efeito que também é verificado para intercalantes típicos [67].

A linha sólida, mostrada na Figura 3.11, é o resultado do ajuste feito utilizando-se a equação (3.17) e a metodologia discutida na seção 3.4.2. É importante destacar que a equação (3.17) se ajusta de maneira bastante satisfatória aos dados experimentais. Desse ajuste, nós obtivemos os seguintes valores para os parâmetros ajustáveis: $r_{max} = 0,10 \pm 0,01$, $n = 1,0 \pm 0,2$ e $K_i = (1,6 \pm 0,2) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$. Esses resultados obtidos concordam de maneira bastante satisfatória com os resultados previamente obtidos no ajuste dos dados experimentais para o inverso do comprimento de persistência, $1/A$. Além disso, nós obtivemos que $\gamma = 0,31 \pm 0,02$, indicando que as moléculas de Actinomicina D que intercalam no DNA causam um aumento de $\sim 30\%$ no comprimento

3. A interação DNA-Actinomicina D

de contorno, L , quando a saturação é atingida.

É importante mencionar que foi feita uma outra tentativa de ajuste aos dados experimentais da Figura 3.11, usando a ligação de apenas uma molécula de Actinomicina D em um sítio específico, de maneira que $\Delta L/L_0$ seria proporcional a r/r_{max} . No entanto, esse ajuste retornou valores duas vezes maiores do que os valores obtidos para n e K_i com o ajuste dos dados do inverso do comprimento de persistência.

Capítulo 4

A interação DNA-GelRed

Neste capítulo faremos uma breve descrição do GelRed, discutiremos toda a metodologia utilizada para a caracterização da interação entre a molécula de DNA e o GelRed e discutiremos todos os resultados obtidos.

4.1 O GelRed

O GelRed é um marcador de ácidos nucleicos que foi desenvolvido com o propósito de substituir o Brometo de Etídio* (EtBr) em experimentos de eletroforese e em outras atividades experimentais que dependam da obtenção de fluorescência do complexo quando ligado a molécula de DNA. Quando intercalado ao DNA o GelRed apresenta, segundo o seu fabricante (Biotium, Hayward, CA, USA), o mesmo espectro de absorção e de emissão que o EtBr, com a vantagem de ser bem menos tóxico e mutagênico. Essas duas últimas características são devidas, segundo o seu fabricante, ao fato de que a estrutura química da molécula ter sido concebida de maneira a não permitir que ela penetre na membrana celular [78]. A estrutura química do GelRed é patenteada e, até o presente momento, não foi apresentada oficialmente pelo seu fabricante. No entanto, como mostrado na Figura 4.1 é possível encontrar uma informação não oficial na internet, através do site <http://en.wikipedia.org/wiki/GelRed>, mostrando a estrutura química do composto e sugerindo que o GelRed possa ser, na verdade, o resultado

*O Brometo de Etídio (EtBr) é um composto monointercalante, altamente mutagênico, utilizado como marcador de ácidos nucleicos em experimentos de eletroforese.

4. A interação DNA-GelRed

da união entre duas moléculas de EtBr, além de ser um bis-intercalante.

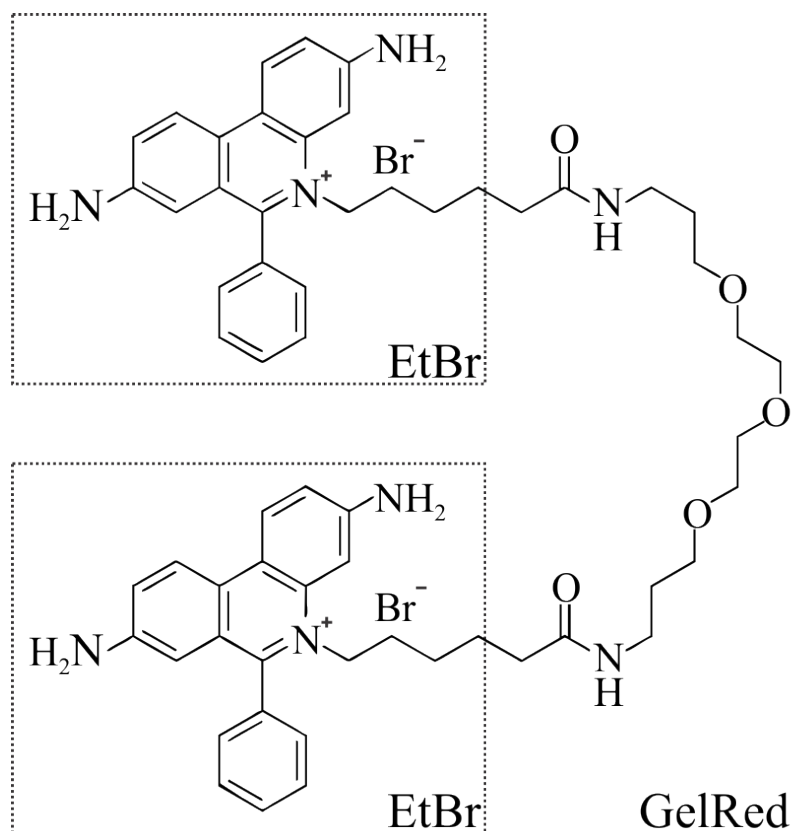


Figura 4.1: Estrutura não oficial do GelRed, mostrando que o composto é o resultado da união entre duas moléculas de EtBr. A estrutura pode ser encontrada no site <http://en.wikipedia.org/wiki/GelRed>.

Embora o seu fabricante declare que o GelRed interaja com o DNA através de uma combinação de intercalação e interação eletrostática, maiores detalhes dessa interação não foram reportados na literatura [78]. A proposta desse trabalho foi aliar duas técnicas experimentais, a pinça óptica e o espalhamento de luz, a fim de fazermos uma caracterização robusta da interação DNA-GelRed, através do monitoramento das mudanças nas propriedades mecânicas dos complexos DNA-GelRed. Através desse monitoramento, foi possível extrair os parâmetros físico-químicos da interação e a natureza do mecanismo de interação do composto.

4.2 O procedimento experimental

4.2.1 Pinça óptica

O procedimento experimental utilizado na caracterização da interação DNA-GelRed é o mesmo apresentado detalhadamente na seção 3.3 e não será discutido novamente.

4.2.2 Espalhamento de Luz

Para realizar os experimentos de espalhamento de luz, nós utilizamos moléculas de DNA com 3000 pares de bases, diferentemente das moléculas de DNA utilizadas nos experimentos com a pinça óptica, que possuem da ordem de 48.500 pares de bases. Isso foi necessário, pois, a segunda molécula de DNA citada, possui um comprimento de contorno grande, o que inviabiliza a sua utilização nos experimentos de espalhamento de luz. O solvente utilizado nos experimentos de espalhamento de luz é o mesmo utilizado nos experimentos com a pinça óptica e, além disso, a concentração de DNA utilizada nas duas técnicas foi a mesma, $C_{bp} = 2,4 \mu\text{M}$. Nessa concentração suficientemente baixa, é possível garantir que as moléculas de DNA não formem aglomerados e interajam umas com as outras [79].

Para a realização dos experimentos de espalhamento de luz, nós utilizamos o equipamento ZetaSizer Nano-S (Malvern Instruments), com uma cubeta de quartzo de baixo volume (ZEN2112, Hellma Analytics). Em todos os experimentos o ângulo de espalhamento utilizado foi de 173° e a distribuição do tamanho das partículas foi determinada utilizando-se o algoritmo dos mínimos quadrados não-negativos (do termo inglês “non-negative least squares” ou NNLS). As moléculas de DNA foram equilibradas com quatro concentrações específicas de GelRed, diretamente na cubeta utilizada para o experimento de espalhamento de luz. Para cada concentração de GelRed foram realizadas aproximadamente 100 medidas de 15 s de duração cada uma, para o cálculo dos valores médios e barras de erro. O tempo de espera para que o equilíbrio entre o GelRed e a molécula de DNA fosse atingido foi de, aproximadamente, 20 minutos e todos os experimentos de espalhamento de luz foram realizados a uma temperatura de

25°C.

4.3 Resultados obtidos para a interação DNA-GelRed

4.3.1 Resultados obtidos com a pinça óptica

A Figura 4.2 mostra o comportamento do comprimento de persistência, A , em função da concentração, C_T , de GelRed e de Brometo de Etídio. Observe que, utilizando o GelRed, inicialmente, o comprimento de persistência cresce a partir do valor inicial para o DNA puro (~ 46 nm) até alcançar o seu valor máximo ~ 86 nm quando $C_T = 4,0 \mu\text{M}$. Para concentrações maiores, há uma queda abrupta fazendo com que o comprimento de persistência assumira um valor ~ 43 nm.

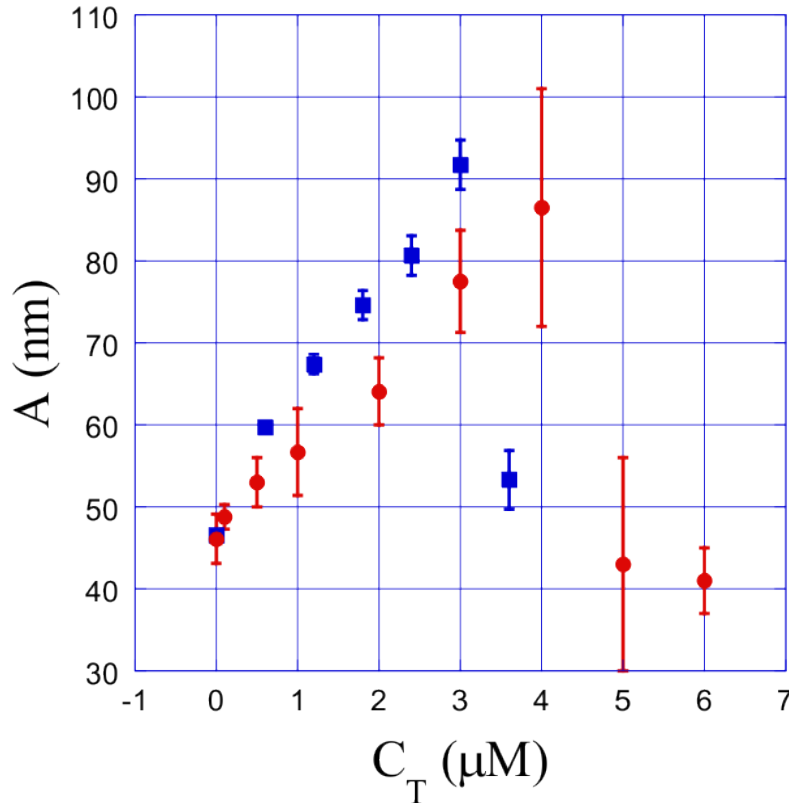


Figura 4.2: Comprimento de persistência, A , em função da concentração, C_T , de GelRed (círculos vermelhos) e EtBr (quadrados azuis).

4. A interação DNA-GelRed

Observe que o comportamento desse parâmetro mecânico para as duas drogas é bastante similar, mesmo quantitativamente, o que fornece uma primeira evidência que a estrutura química e o modo de ligação dos dois compostos são, de certa forma, similares. A Figura 4.3 mostra o comportamento do comprimento de contorno, L , em função da concentração, C_T , de GelRed e de Brometo de Etídio. Observe que, utilizando o GelRed, o comprimento de contorno cresce monotonicamente a partir do valor inicial para o DNA puro ($\sim 16,5 \mu\text{m}$) até alcançar o seu valor de saturação $\sim 24,0 \mu\text{m}$. Observe que, novamente, o comportamento quantitativo é bastante similar, mas no caso do comprimento de contorno há uma maior diferença: para os complexos DNA-GelRed, o comprimento de contorno satura em uma baixa concentração ($\sim 1 \mu\text{M}$) quando comparados aos resultados para os complexos DNA-EtBr, que saturam com uma concentração de $\sim 10 \mu\text{M}$, com um valor para o comprimento de contorno $\sim 23 \mu\text{m}$, como pode ser verificado na referência [80].

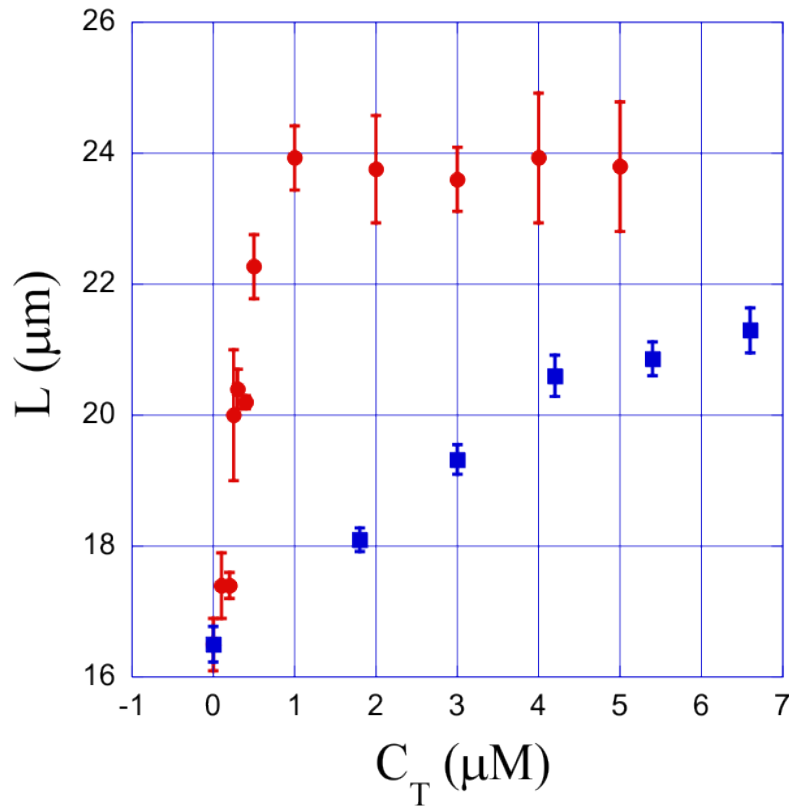


Figura 4.3: Comprimento de contorno, L , em função da concentração, C_T , de GelRed (círculos vermelhos) e EtBr (quadrados azuis).

4. A interação DNA-GelRed

O comportamento de ambos os parâmetros mecânicos, A e L , sugerem fortemente que o mecanismo dominante de interação entre o DNA e o GelRed é a intercalação, uma vez que o comportamento apresentado nas Figuras 4.2 e 4.3 é qualitativamente semelhante ao comportamento do monointercalante EtBr. De fato, o comportamento geral para o comprimento de persistência, A , mostrado na Figura 4.2 já foi previamente verificado pelo nosso grupo de pesquisa para outros intercalantes, tais como, Daunomicina, Psolaren, Diaminobenzidina e mesmo para o EtBr, em condições experimentais bastante similares, usando a pinça óptica em um regime de forças baixas (≤ 2 pN) [67,68,80,81]. Outros trabalhos encontrados na literatura reportam o mesmo comportamento qualitativo para o comprimento de persistência de intercalantes, demonstrando que seu valor aumenta para baixas concentrações e depois sofre uma queda abrupta para concentrações mais altas [82–84]. Como discutido no Capítulo 3, a queda abrupta no comprimento de persistência apresentada na Figura 4.2 está relacionada a uma desnaturação parcial da molécula de DNA, através da formação de bolhas de desnaturação, induzida pela força aplicada pela pinça óptica. No entanto, é importante mencionar que alguns trabalhos encontrados na literatura, utilizando espectroscopia de força (pinça óptica e pinça magnética), reportam o decaimento monotônico do comprimento de persistência para os complexos DNA-intercalantes, em função da concentração de intercalantes [57,85,86]. Do nosso ponto de vista, tais resultados são verificados por conta da faixa de forças utilizadas para a realização dos experimentos, pois, à medida que a força óptica utilizada para esticar o DNA torna-se cada vez mais intensa, a probabilidade de formação de bolhas de desnaturação torna-se cada vez maior [87]. Além disso, devemos somar o fato de que a dupla hélice já está altamente distorcida por conta da interação DNA-intercalantes, o que coopera ainda mais para a formação das bolhas de desnaturação e, conseqüentemente, para a queda do valor comprimento de persistência, mesmo para concentrações mais baixas. Outros fatores também podem afetar os resultados experimentais, como por exemplo, a concentração de sal no solvente (solução tampão), o modelo teórico utilizado para ajustar os dados experimentais (o qual deve incluir o módulo elástico da molécula de DNA se o módulo da força aplicada é ≥ 10 pN) e a razão entre a concentração de ligantes por

4. A interação DNA-GelRed

concentração de pares de bases do DNA [80].

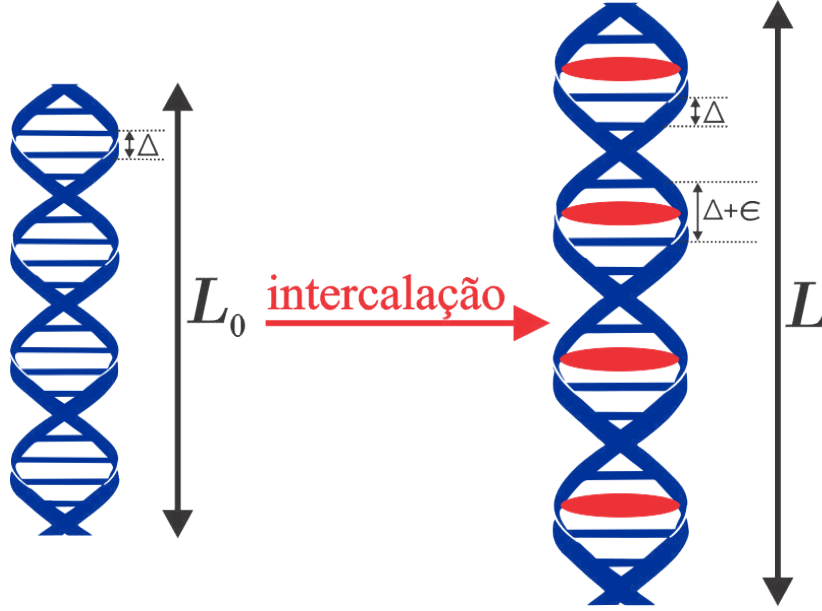


Figura 4.4: Aumento do comprimento de contorno, devido a intercalação entre os pares de base do DNA. L_0 representa o comprimento de contorno inicial (antes da intercalação) e L representa o comprimento de contorno final (após a intercalação). Δ é a distância entre dois pares de bases adjacentes e ϵ representa o aumento da distância entre os pares de bases adjacentes, devido a intercalação do composto.

É bem estabelecido na literatura que intercalantes sempre aumentam o comprimento de contorno, L , do DNA, através do aumento da distância axial entre dois pares de base adjacentes [55,57,74]. A Figura 4.4 ilustra o aumento do comprimento de contorno, L , após a intercalação de algumas moléculas do ligante entre os pares de base do DNA. Outros tipos comuns de interação entre a molécula de DNA e ligantes, tais como: interações de fenda, interação eletrostática ou ligação covalente, não aumentam o comprimento de contorno. Pelo contrário, em alguns casos, como observado pelo nosso grupo de pesquisa, esses tipos de interações podem causar uma compactação da molécula de DNA com um decréscimo no comprimento de contorno aparente* medidos com espectroscopia de força no regime entrópico (baixas forças) [75,88]. Portanto, para as concentrações $C_T \leq 1 \mu\text{M}$ (faixa de concentração na qual o comprimento de

*Quando a molécula de DNA sofre a formação de loops, não podemos mais nos referir ao comprimento de contorno, pois essa grandeza é a distância ponta à ponta do polímero quando este se encontra totalmente esticado. Nesse caso, chamamos essa grandeza de comprimento de contorno aparente.

4. A interação DNA-GelRed

contorno, L , sofre um grande aumento) a intercalação é o tipo de interação dominante para os complexos DNA-GelRed.

Como mostra a Figura 4.4, antes da intercalação, o comprimento de contorno inicial, L_0 , pode ser calculado como

$$L_0 = N_{bp}\Delta , \quad (4.1)$$

onde N_{bp} é o número de pares de base e Δ é a distância entre dois pares de base adjacentes. Após a intercalação, há um aumento na distância axial entre dois pares de base adjacentes, ocasionando um aumento do comprimento de contorno. O novo comprimento de contorno, L , pode ser escrito como

$$L = L_0 + N_b\epsilon , \quad (4.2)$$

onde N_b é o número de moléculas do composto que intercalaram e ϵ é o aumento da distância entre os pares de bases adjacentes, devido a intercalação do composto.

Para o λ -DNA puro, o comprimento de contorno é $\sim 16,5 \mu\text{m}$ e $N_{bp} \sim 48.500$, então, utilizando a equação (4.1), temos que $\Delta \sim 0,34 \text{ nm}$.

As propriedades físico-químicas da interação DNA-GelRed podem ser obtidas a partir dos dados do comprimento de contorno na Figura 4.3. Primeiramente, utilizando esses dados experimentais, nós determinamos o aumento relativo do comprimento de contorno, Θ , para cada concentração, C_T , de GelRed. O aumento relativo do comprimento de contorno é dado por

$$\Theta = \frac{L - L_0}{L_0} , \quad (4.3)$$

onde L_0 é o comprimento de contorno do DNA puro (quando a concentração de GelRed na solução é zero). Para cada valor da concentração do ligante, C_T , temos um valor para Θ . Com isso, podemos obter um gráfico que relaciona o aumento relativo do comprimento de contorno, Θ , em função da concentração de GelRed, C_T . Esses dados estão mostrados na Figura 4.5.

Substituindo as equações (4.1) e (4.2) na equação (4.3), obtemos a seguinte

4. A interação DNA-GelRed

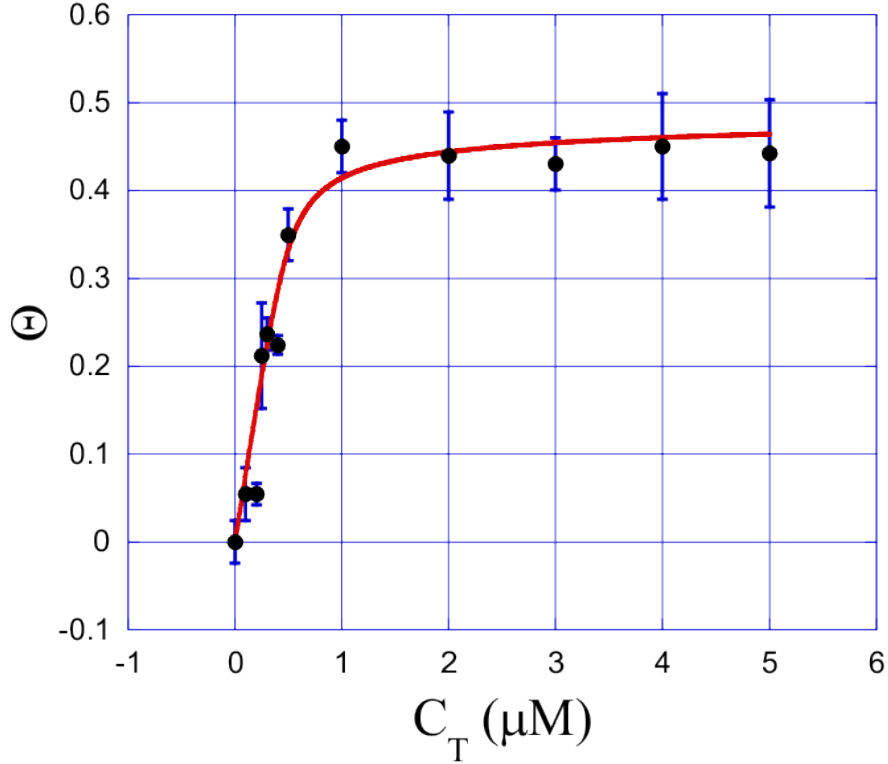


Figura 4.5: Aumento relativo do comprimento de contorno, Θ , em função da concentração de GelRed, C_T . A linha vermelha representa o ajuste feito utilizando-se a equação 4.6.

equação

$$\Theta = \frac{L - L_0}{L_0} = \frac{\cancel{L_0} + N_b \epsilon - \cancel{L_0}}{N_{bp} \Delta} = \frac{N_b \epsilon}{N_{bp} \Delta}, \quad (4.4)$$

onde a razão N_b/N_{bp} é definida pela equação (3.9) e $\gamma = \epsilon/\Delta$. Para intercalantes típicos, $\epsilon \sim 0,34$ nm e, conseqüentemente, $\gamma \sim 1$ [55,57].

A fração de composto “ligado” r e, conseqüentemente, a variável mecânica Θ , podem ser relacionadas às propriedades físico-químicas do sistema através da isoterma de “ligação”. A equação de McGhee e von Hippel descreve de maneira satisfatória a interação da molécula de DNA com compostos intercalantes, pois esse modelo leva em conta o efeito de exclusão de vizinhos, que é um efeito comumente associado a esse tipo de interação [89]. A isoterma de McGhee e von Hippel é dada pela equação

$$\frac{r}{C_f} = K_i(1 - nr) \left[\frac{1 - nr}{1 - (n-1)r} \right]^{n-1}, \quad (4.5)$$

4. A interação DNA-GelRed

onde r é a razão entre a concentração de composto ligado, C_b , pela concentração de pares de base do DNA, C_{bp} ; C_f (do termo inglês “free”) é a concentração de composto livre em solução, K_i é a constante da interação (no equilíbrio) e n é o número de exclusão (número de sítios livres na molécula de DNA que uma molécula do intercalante efetivamente ocupa). A concentração de composto livre em solução, C_f , e a concentração de composto ligado, C_b , se relacionam com a concentração total de ligante, C_T , através da equação (3.12).

Substituindo a equação (3.12) na equação (4.5) e usando a relação $r = \Theta/\gamma$, é possível escrever a seguinte equação

$$C_T = \frac{C_{bp}}{\gamma} \Theta + \frac{\Theta(\gamma - n\Theta + \Theta)^{n-1}}{K_i(\gamma - n\Theta)^n} . \quad (4.6)$$

A equação (4.6) foi, então, utilizada para ajustar (linha vermelha) os dados experimentais na Figura 4.5. O ajuste foi feito utilizando-se o programa *MATLAB*[®], através da função dos mínimos quadrados. É importante observar que o modelo se ajusta de maneira bastante satisfatória aos dados experimentais. Desse ajuste obtivemos os seguintes valores: $n = 3,7 \pm 0,4$, $K_i = (1,8 \pm 0,3) \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ e $\gamma = 1,9 \pm 0,1$. Esses resultados sugerem fortemente que o GelRed é um bis-intercalante. De fato, o número de exclusão, n , indica que cada molécula ligada do GelRed ocupa efetivamente 3,7 pares de base do DNA, um valor substancialmente maior do que o obtido para a maioria dos monointercalantes e aproximadamente duas vezes maior que o do EtBr [68,74,90]. A constante da interação (no equilíbrio), K_i , possui um valor maior do que o valor obtido para os monointercalantes típicos ($\sim 10^5 \text{ M}^{-1}$) [68,74,80,90] e seu valor está dentro da faixa de valores para bis-intercalantes reportados na literatura (10^7 a 10^9 M^{-1}) [85,91–94]. Em particular, quando comparamos a constante de interação, K_i , para o GelRed e para o EtBr, verificamos que o seu valor para o GelRed são duas ordens de magnitude maior do que para o EtBr. Situação muito semelhante pode ser encontrada na literatura quando comparamos o bis-intercalante YOYO com o seu precursor YO que, assim como o EtBr, é também um monointercalante [85]. Por último, o valor $\gamma = 1,9 \pm 0,1$ que é aproximadamente duas vezes maior do que os valores obtidos para monointercalantes típicos, sugere que cada molécula de GelRed que se

4. A interação DNA-GelRed

liga ao DNA aumenta o comprimento de contorno, L , por um fator $\sim 0,65$ nm, que também é um valor típico para bis-intercalantes [91,93]. É interessante notar que bis-intercalantes devem aumentar, por um fator de aproximadamente dois, o comprimento de contorno do DNA por molécula ligada, por que cada molécula ligada contém duas porções intercaladoras.

Todos esses resultados unidos formam uma forte evidência de que o GelRed é, de fato, um bis-intercalante e que, provavelmente, é formado pela união de duas moléculas de EtBr, como declarado de maneira não oficial no site <http://en.wikipedia.org/wiki/GelRed>. De fato, se nós considerarmos como verdadeira a suposição que o GelRed é um bis-intercalante, consistindo de duas moléculas de EtBr unidas, é fácil entender por que o seu fabricante declara que o GelRed é mais sensível que o EtBr nos experimentos de eletroforese [78]. Se duas amostras utilizadas em experimentos de eletroforese forem preparadas, uma contendo GelRed e a outra contendo EtBr com uma mesma concentração molar, na amostra que possui GelRed as moléculas de DNA terão, aproximadamente, o dobro de pares de base ocupados (pelo menos para valores de concentrações longe da saturação), o que implica em uma maior fluorescência e, conseqüentemente, um maior contraste. Além disso, o fato do espectro de absorção e emissão dos dois compostos serem os mesmos pode ser explicado pelo fato do GelRed ser formado pela união de duas moléculas de EtBr.

Embora o comportamento qualitativo e, de certa maneira, quantitativo entre os dois compostos sejam similares, como pode ser visto nas Figuras 4.2 e 4.3, existem algumas diferenças que, na nossa opinião, estão relacionadas com a interação eletrostática. Como pode ser visto na Figura 4.6, o EtBr é uma molécula monocatiônica e, sendo o GelRed possivelmente composto por duas moléculas de EtBr, como pode ser visto na Figura 4.1, é esperado que o GelRed tenha duas cargas positivas em cada porção intercalante de sua molécula.

Em princípio, é esperado que a interação eletrostática, de alcance mais longo, tenha efeitos físicos relevantes. O primeiro desses efeitos é a estabilização da estrutura de dupla hélice, por conta da blindagem da forte interação eletrostática existente entre as cargas negativas existentes no grupo fosfato [95], o que deve refletir no fato da

4. A interação DNA-GelRed

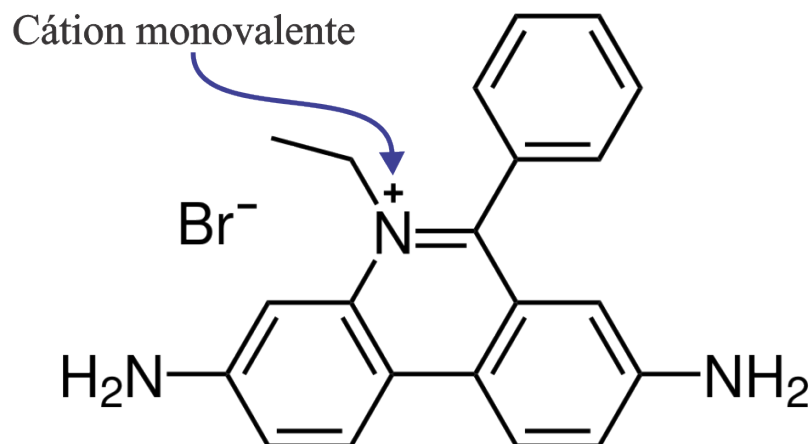


Figura 4.6: Estrutura molecular do EtBr. É importante observar que o EtBr é um ligante monocatiônico.

transição abrupta dos complexos DNA-GelRed ocorrer em uma concentração maior quando comparado aos complexos DNA-EtBr. O segundo efeito está relacionado ao fato das duas cargas positivas na molécula de GelRed estarem distantes de um valor fixo, definido pelo espaçador linear usado para conectar as duas porções intercalantes da molécula, o que resulta em uma correlação posicional das cargas positivas ao longo da molécula de DNA. Essa correlação posicional, provavelmente, reflete no fato dos valores do comprimento de persistência dos complexos DNA-GelRed serem menores do que para os complexos DNA-EtBr, para as mesmas concentrações dos ligantes.

4.3.2 Resultados obtidos com o espalhamento de luz

Utilizando a técnica de espalhamento de luz, foi possível determinar o raio hidrodinâmico[†] dos complexos DNA-GelRed, que é uma estimativa do tamanho desses complexos [81]. Através do monitoramento do raio hidrodinâmico, é possível descobrir o efeito do composto no tamanho efetivo da molécula de DNA, uma vez que essa grandeza deve exibir o mesmo comportamento qualitativo do raio de giro[‡], que depende dos comprimentos de contorno e de persistência. Dessa forma, os resultados obtidos com

[†]O raio hidrodinâmico, R_H , é o raio da esfera com o mesmo coeficiente de difusão, D , da molécula de DNA. Essa grandeza é também conhecida como raio de Stokes.

[‡]O raio de giro, R_g , é uma espécie de medida efetiva do raio da esfera que representa o volume esférico ocupado pelo polímero em solução.

4. A interação DNA-GelRed

a pinça óptica e espalhamento de luz podem ser comparados, mesmo que de maneira indireta.

A Figura 4.7 mostra o comportamento do raio hidrodinâmico R_H e do raio de giro R_g , dos complexos DNA-GelRed em função da concentração, C_T , de GelRed.

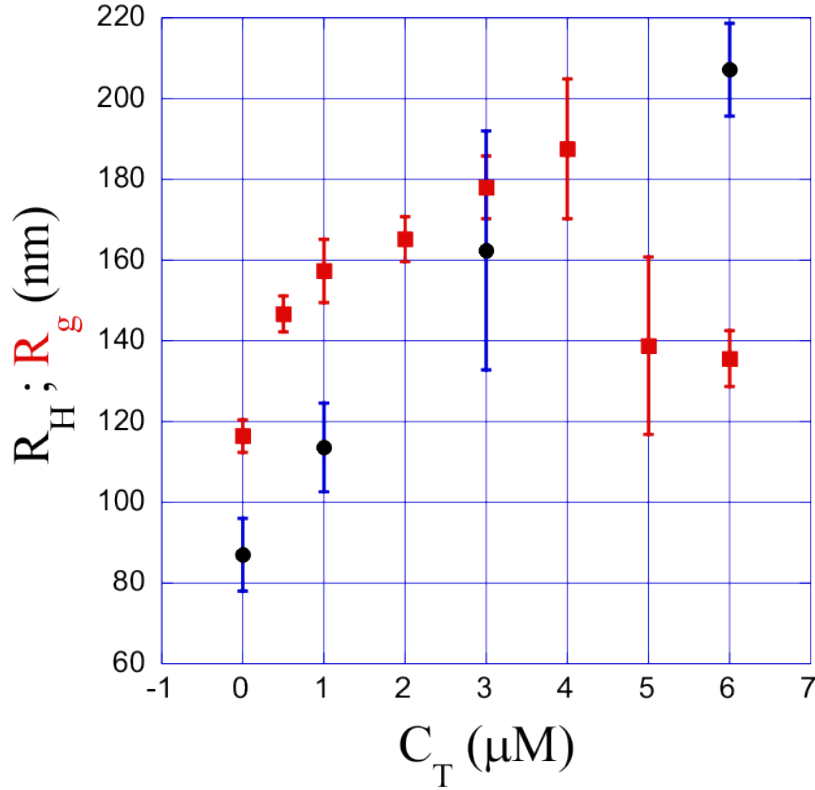


Figura 4.7: Círculos: Raio hidrodinâmico, R_H , dos complexos DNA-GelRed, obtidos a partir dos experimentos de espalhamento de luz, em função das concentrações de GelRed, C_T . Quadrados: estimativa do raio de giro, R_g , dos complexos DNA-GelRed, obtidos a partir dos experimentos de estiramento, em função das concentrações de GelRed, C_T .

A intensidade da função de autocorrelação da luz espalhada foi ajustada com o algoritmo NNLS, permitindo assim, determinar o coeficiente de difusão para cada concentração de GelRed. O raio hidrodinâmico, obtido para cada concentração de GelRed, fornece o tamanho efetivo dos complexos DNA-GelRed. O raio hidrodinâmico, R_H e o coeficiente de difusão, D , se relacionam através da equação (2.20).

A Figura 4.7 mostra que o raio hidrodinâmico, R_H , cresce monotonicamente com o aumento da concentração de GelRed, partindo de ~ 87 nm e chegando em

4. A interação DNA-GelRed

~ 207 nm para uma concentração de $6 \mu\text{M}$. Na mesma figura, é possível perceber o comportamento apresentado pelo raio de giro, R_g , dos complexos DNA-GelRed para cada concentração específica de GelRed. O raio de giro se relaciona com os parâmetros mecânicos, que são obtidos com os experimentos na pinça óptica, através da equação [66],

$$R_g = \sqrt{\frac{1}{3}AL \left(1 - \frac{3A}{L} + \dots\right)}, \quad (4.7)$$

onde A é o comprimento de persistência e L é o comprimento de contorno.

Para o cálculo do raio de giro, R_g , na equação (4.7), nós usamos os valores do comprimento de persistência, A , mostrados na Figura 4.2 e assumimos que o comprimento de contorno, L , para moléculas de DNA com ~ 3000 pares de base, sofre o mesmo aumento relativo encontrado na Figura 4.5, para o λ -DNA, que possui ~ 48.500 pares de base.

O fato do raio de giro depender dos parâmetros mecânicos, A e L , explica o comportamento dessa grandeza, ao sofrer um decréscimo abrupto para as duas últimas concentrações de GelRed utilizadas. Observe que o mesmo comportamento é verificado na Figura 4.2. O fato do raio hidrodinâmico não sofrer o mesmo decréscimo, indica que o comprimento de persistência não sofre essa transição abrupta nas amostras utilizadas nos experimentos de espalhamento de luz. Um comportamento bastante similar pode ser encontrado em um outro composto intercalante, a Diaminobenzidina (DAB). Maiores detalhes sobre esse composto podem ser encontrados na referência [81]. Essa transição abrupta do comprimento de persistência está ligada ao fato da molécula de DNA estar sempre sendo esticada nos experimentos com a pinça óptica, o que deve promover uma desnaturação local nas moléculas de DNA que já sofrem, previamente, uma deformação na sua estrutura de dupla hélice, ao interagirem com o composto intercalante [67,68]. Dessa forma, podemos dizer que os resultados obtidos nos experimentos de espalhamento de luz, através da obtenção do raio hidrodinâmico, R_H , concordam qualitativamente com os resultados obtidos com a espectroscopia de força, através do raio de giro, R_g .

Os resultados obtidos através da técnica de espalhamento de luz, concordam

4. A interação DNA-GelRed

com a maioria dos resultados reportados na literatura, para a medida do comprimento de persistência de complexos DNA-intercalantes, através do uso de técnicas que não exijam aplicação de força nas moléculas de DNA, tais como: microscopia de fluorescência, microscopia eletrônica, viscometria, entre outras [96,97]. Nesses trabalhos, os autores reportam que os intercalantes causam, além do aumento do comprimento de contorno, L , um aumento do comprimento de persistência, A , dentro dessas condições experimentais, demonstrando assim um aumento do tamanho efetivo dos complexos DNA-intercalantes.

Capítulo 5

A interação DNA-intercalantes em soluções contendo Poli(etileno glicol) 8000

Neste capítulo faremos uma breve descrição do Poli(etileno glicol) (PEG), discutiremos toda a metodologia utilizada para a caracterização da interação entre a molécula de DNA, os compostos intercalantes (GelRed e EtBr) e o PEG e, por último, discutiremos todos os resultados obtidos.

5.1 O Poli(etileno glicol)

O Poli(etileno glicol) (PEG), também conhecido como Poli(oxietileno) ou Poli(óxido de etileno) (PEO) é um polímero neutro sintético que possui uma massa molar que pode ser amplamente variada. Se o polímero apresenta uma massa molar < 20.000 g/mol, ele geralmente é denominado Poli(etileno glicol) (PEG), enquanto que se a massa molar for > 20.000 g/mol, ele geralmente é denominado de Poli(óxido de etileno) (PEO) [98]. O PEG é solúvel em água e na maioria dos solventes orgânicos, tais como: clorofórmio, tolueno, acetona, etc. Por essa característica, o PEG é conhecido como um polímero anfifílico, possuindo uma parte hidrofílica e uma parte hidrofóbica, mas que é lipossolúvel. A Figura 5.1 mostra a estrutura molecular do PEG.

O PEG é muito utilizado em processos de regulação osmótica, no estudo da

5. A interação DNA-intercalantes em soluções contendo Poli(etileno glicol) 8000

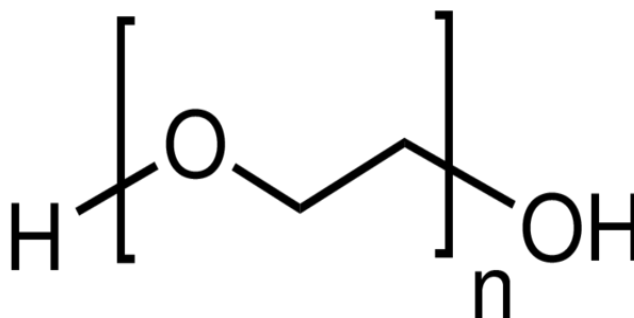


Figura 5.1: Estrutura molecular do PEG, cuja fórmula molecular é $\text{HO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-H}$.

desidratação da molécula de DNA, na condensação ψ do DNA *in vitro* e no estudo das mudanças conformacionais sofridas por macromoléculas em solução [99–104]. Neste trabalho, nós utilizamos o Poli(etileno glicol) cuja massa molar é 8000 g/mol e, por conta disso, vamos nos referir ao polímero como PEG, segundo a definição dada na referência [98]. Como dito no Capítulo 1, o PEG foi utilizado nesse trabalho como um osmólito, de forma a entender as interações DNA-ligantes em um contexto bem mais realista do que a maioria dos trabalhos encontrados na literatura, nos quais a molécula de DNA se encontra dispersa em solução.

5.2 O procedimento experimental

5.2.1 Pinça óptica

Conforme o procedimento experimental apresentado detalhadamente na seção 3.3, nós utilizamos a pinça óptica para caracterizar, inicialmente, a interação da molécula de DNA puro com o PEG 8000, variando a concentração de PEG na amostra. Uma vez realizada essa caracterização, nós acrescentamos os intercalantes na amostra, a fim de monitorar as mudanças nos parâmetros mecânicos do DNA introduzidas pelos intercalantes na solução, contendo uma concentração específica de PEG 8000. Todos os experimentos foram realizados em condições bem próximas da fisiológica ($[\text{NaCl}] = 140 \text{ mM}$ e $\text{pH} = 7,4$), exceto pela presença do PEG 8000. Os resultados obtidos com esses procedimentos serão discutidos detalhadamente na seção 5.3.1.

5. A interação DNA-intercalantes em soluções contendo Poli(etileno glicol) 8000

5.2.2 Calorimetria isotérmica de titulação

A calorimetria isotérmica de titulação (ITC) foi utilizada para fornecer as informações termodinâmicas sobre os complexos PEG-EtBr e DNA-EtBr, a fim de descobrirmos se a afinidade dos complexos PEG-EtBr pode mudar, efetivamente, a quantidade de EtBr ligado ao DNA nos experimentos realizados com a pinça óptica. A ITC mede a mudança de entalpia de uma solução de DNA+PBS 7,4 ou PEG+PBS 7,4, após a adição de 50 μL de EtBr+PBS 7,4. A entalpia aparente de interação, ΔH_{ap-int} , para os complexos PEG-EtBr e DNA-EtBr foram medidas variando a concentração de EtBr na célula do calorímetro, que possuía uma concentração fixa de DNA (21,3 μM) ou de PEG (1% em massa). A concentração de DNA utilizada nos experimentos de ITC foi consideravelmente maior do que a concentração utilizada nos experimentos com a pinça óptica, para que os resultados obtidos com a ITC tivessem uma maior precisão. Para os experimentos de ITC, nós consideramos a mudança de entalpia observada, ΔH_{obs} , como sendo a diferença de calor medida após a titulação de EtBr na solução de DNA ou de PEG, preparadas no mesmo solvente utilizado nos experimentos com a pinça óptica, o PBS 7,4. Nesse caso, a entalpia aparente de ligação, ΔH_{ap-int} , foi obtida dividindo ΔH_{obs} pelo número de mols de EtBr adicionado em cada injeção. Como o número de mols de EtBr que é ligado ao DNA não é conhecido, então não é possível calcular a mudança exata de entalpia molar, mas somente a mudança na entalpia molar aparente. Dessa forma, ΔH_{ap-int} , representa a entalpia na formação dos complexos, desde que seja desconsiderada a energia de diluição do EtBr. Se a formação do complexo apresenta $\Delta H > 0$, então o processo é dito endotérmico e, do ponto de vista entálpico, não favorável que a interação ocorra. Por outro lado, se a formação do complexo apresenta $\Delta H < 0$, então o processo é dito exotérmico e, do ponto de vista entálpico, favorável para que a interação ocorra.

Os experimentos de ITC foram realizados no calorímetro modelo CSC-4200 (Calorimeter Science Corp.), onde o volume máximo das células de referência e de medida é de 1,30 mL. Após a titulação do EtBr, na célula de medidas, a solução foi homogeneizada por um agitador que gira com uma frequência de 300 rpm e o tempo de espera entre as injeções foi ~ 13 minutos, o suficiente para que o sinal registrado pelas

5. A interação DNA-intercalantes em soluções contendo Poli(etileno glicol) 8000

termopilhas retornasse à linha base. A temperatura de realização dos experimentos foi de $(25,000 \pm 0,001)^\circ\text{C}$ e a incerteza associada ao tipo de equipamento utilizado para a realização dos experimentos de ITC é $< 0,05 \text{ kJ/mol}$.

5.3 Resultados obtidos para a interação DNA-intercalantes em soluções contendo Poli(etileno glicol) 8000

5.3.1 Resultados obtidos com a pinça óptica

Inicialmente, antes da adição dos intercalantes na amostra, nós fizemos a caracterização do DNA puro em uma solução contendo apenas PEG 8000, com algumas concentrações variadas de PEG, devido à possibilidade do surgimento de interações de depleção e/ou mudanças termodinâmicas na atividade do solvente [105]. Na Figura 5.2, são mostradas algumas curvas de força $\times$ extensão da molécula de DNA puro para concentrações crescentes de PEG, medidas no regime entrópico ($F \leq 2 \text{ pN}$). É possível observar que as curvas se tornam ligeiramente diferentes, a medida que a concentração de PEG aumenta, mostrando um encurtamento aparente da molécula de DNA, que é um sinal do surgimento da força de depleção que ocasiona em uma interação de atração entre os próprios segmentos da molécula de DNA. Além disso, como sugerem os dados da Figura 5.2, a medida que a concentração de PEG aumenta, há um aumento no efeito de exclusão de volume, de forma que podemos considerar o PEG como um polímero neutro, uma vez que a interação de depleção induzida por ele tem origem puramente entrópica [106]. Um aumento na concentração de PEG na solução, resultará no fenômeno conhecido como condensação ψ do DNA [102].

A Figura 5.3 mostra o comportamento do comprimento de persistência, A , do DNA puro em função da concentração do PEG 8000 na amostra (C_{PEG} é expressa pela fração da massa de PEG contida na solução).

Como pode ser observado na Figura 5.3, a presença do PEG na solução não altera o comprimento de persistência, A , do DNA puro, uma vez que seu valor fica

5. A interação DNA-intercalantes em soluções contendo Poli(etileno glicol) 8000

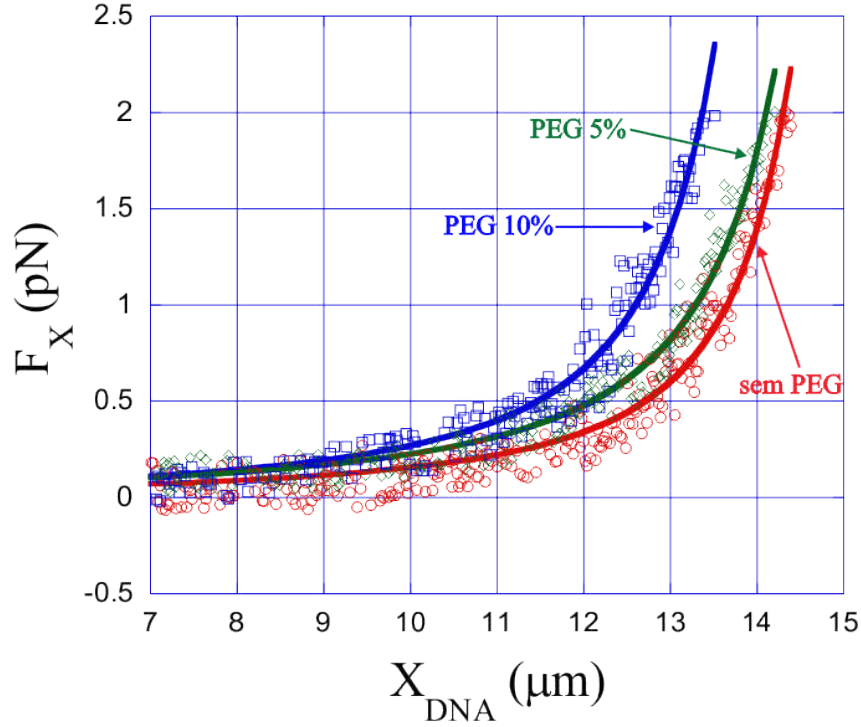


Figura 5.2: Curvas típicas de força $\times$ extensão para a molécula de DNA puro com concentrações crescentes de PEG 8000, realizadas no regime entrópico ($F \leq 2$ pN). É possível observar que as curvas se tornam ligeiramente diferentes, a medida que a concentração de PEG aumenta na solução, mostrando a existência da interação de depleção.

constante dentro das barras de erro do experimento.

A Figura 5.4 mostra o comportamento do comprimento de contorno, L , do DNA puro em função da concentração do PEG 8000 na amostra (C_{PEG} é expressa pela fração da massa de PEG contida na solução) normalizado pelo valor do comprimento de contorno, L_0 , do DNA puro (sem PEG na solução). Para o caso do λ -DNA, utilizado em nossos experimentos, temos $L_0 \sim 16,5 \mu\text{m}$.

Como pode ser observado na Figura 5.4, o comprimento de contorno, L , começa a sofrer um ligeiro decréscimo no seu valor a medida que a concentração de PEG aumenta. Uma vez que o PEG é um polímero neutro que não interage diretamente com o DNA, o ligeiro decréscimo do comprimento de contorno, L , do DNA puro deve ser interpretado com bastante cuidado. De fato, o que nós realmente medimos com a espectroscopia de força é o comprimento de contorno aparente, que apresenta, em geral, um valor diferente do medido para o comprimento de contorno, L , do DNA

5. A interação DNA-intercalantes em soluções contendo Poli(etileno glicol) 8000

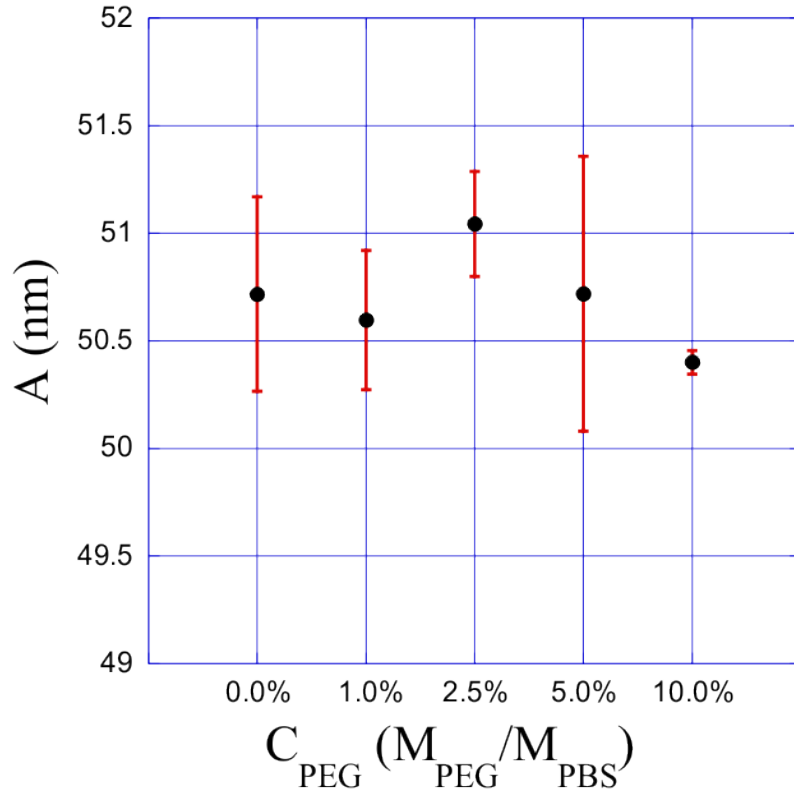


Figura 5.3: Comprimento de persistência, A , do DNA puro em função da concentração do PEG 8000 na solução.

se algum agente condensante está presente na solução [75,88]. Esse é o caso do PEG 8000, que é capaz de condensar moléculas de DNA para altas concentrações ($> 18\%$ em massa) em soluções com $[\text{NaCl}] = 150 \text{ mM}$ [101,102]. Para concentrações mais baixas, como mostradas nas Figuras 5.3 e 5.4, embora não ocorra, de fato, uma condensação das moléculas de DNA, os experimentos de estiramento foram realizados em uma solução onde há outras moléculas, de forma que a interação de depleção está pronta para desempenhar o seu papel e, portanto, é necessário uma força de módulo maior para esticar completamente a molécula de DNA. Uma vez que os experimentos foram realizados com forças máximas de $\sim 2 \text{ pN}$ (regime entrópico), então é esperado que o comprimento de contorno aparente, obtido através do ajuste com o modelo WLC, apresente valores cada vez menores a medida que a concentração de PEG aumenta na solução.

5. A interação DNA-intercalantes em soluções contendo Poli(etileno glicol) 8000

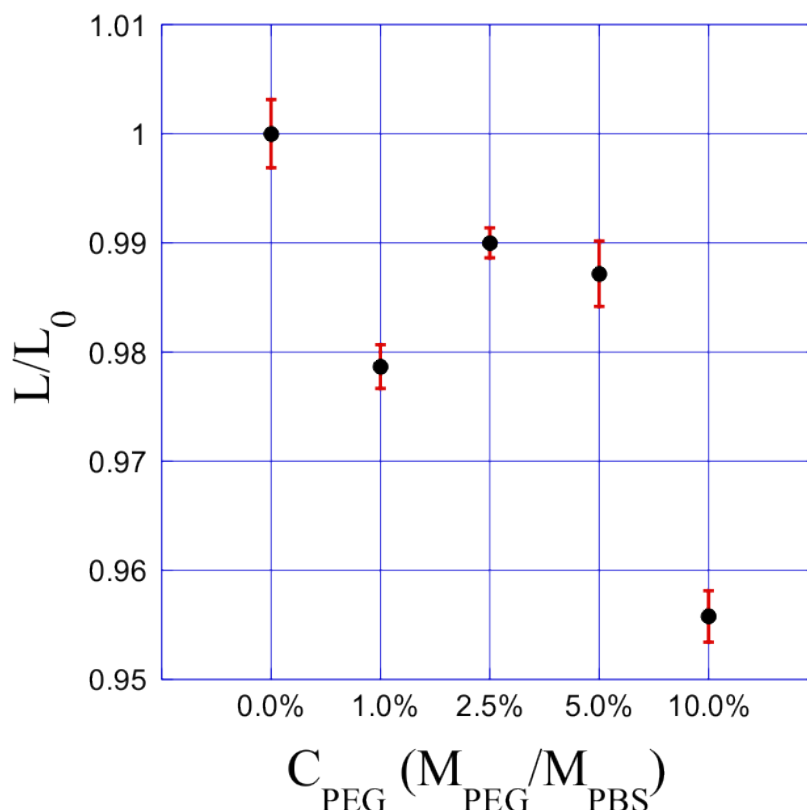


Figura 5.4: Comprimento de contorno, L , do DNA puro normalizado pelo valor do comprimento de contorno, L_0 , do DNA puro (sem PEG na solução) em função da concentração do PEG 8000 na solução.

Uma vez realizada a caracterização do DNA puro em soluções com concentrações variadas de PEG 8000, a segunda etapa do trabalho foi a inclusão dos compostos intercalantes na solução contendo o DNA e o PEG 8000, a fim de verificarmos a influência de osmólitos na interação do DNA com compostos intercalantes. Os compostos intercalantes utilizados nesse trabalho foram: Brometo de Etídio (EtBr) e o GelRed (GR).

A Figura 5.5 (círculos pretos) mostra o comportamento do comprimento de persistência, A , e do comprimento de contorno, L , para os complexos DNA-EtBr quando não há PEG na solução. Já na Figura 5.6 (círculos pretos) são mostrados os comportamentos do comprimento de persistência, A , e do comprimento de contorno, L , para os complexos DNA-GR quando não há PEG na solução.

Podemos notar que, para as nossas condições experimentais, o efeito qualitativo

5. A interação DNA-intercalantes em soluções contendo Poli(etileno glicol) 8000

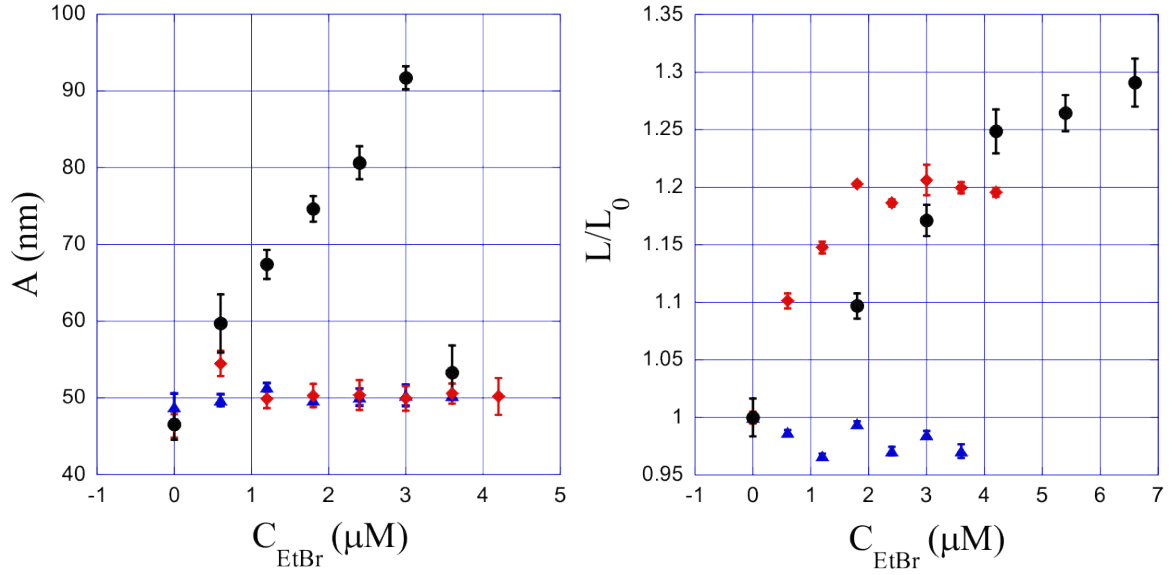


Figura 5.5: Comprimento de persistência, A , e comprimento de contorno relativo, L/L_0 , para os complexos DNA-EtBr em função da concentração de EtBr. Círculos pretos: solução sem PEG; losangos vermelhos: PEG 1% em massa na solução; triângulos azuis: PEG 5% em massa na solução.

do dois intercalantes é o mesmo: o comprimento de persistência, A , cresce até atingir um certo valor para uma concentração crítica e depois decai abruptamente; o comprimento de contorno, L , por sua vez, cresce monotonicamente em função da concentração de intercalante, até que o valor de saturação seja atingido. O comportamento desses parâmetros mecânicos já havia sido determinado pelo nosso grupo de pesquisa para o EtBr e para o GR, em soluções sem PEG [80,107], e também para outros intercalantes, em condições experimentais bastante similares às utilizadas nesse trabalho [80,81]. Em particular, o comportamento do comprimento de contorno, L , é muito bem estabelecido na literatura e foi reportado em diversos trabalhos [55,57,74,108,109]. O comportamento do comprimento de persistência, A , por outro lado, é em geral, dependente das condições experimentais e mesmo da técnica utilizada para realizar os experimentos, uma vez que o seu decaimento abrupto está relacionado a uma desnaturação parcial da molécula de DNA, devido ao surgimento de bolhas de desnaturação por conta da força aplicada pela pinça óptica [67,68].

Na Figura 5.5 (losangos vermelhos) é mostrado também o comportamento dos

5. A interação DNA-intercalantes em soluções contendo Poli(etileno glicol) 8000

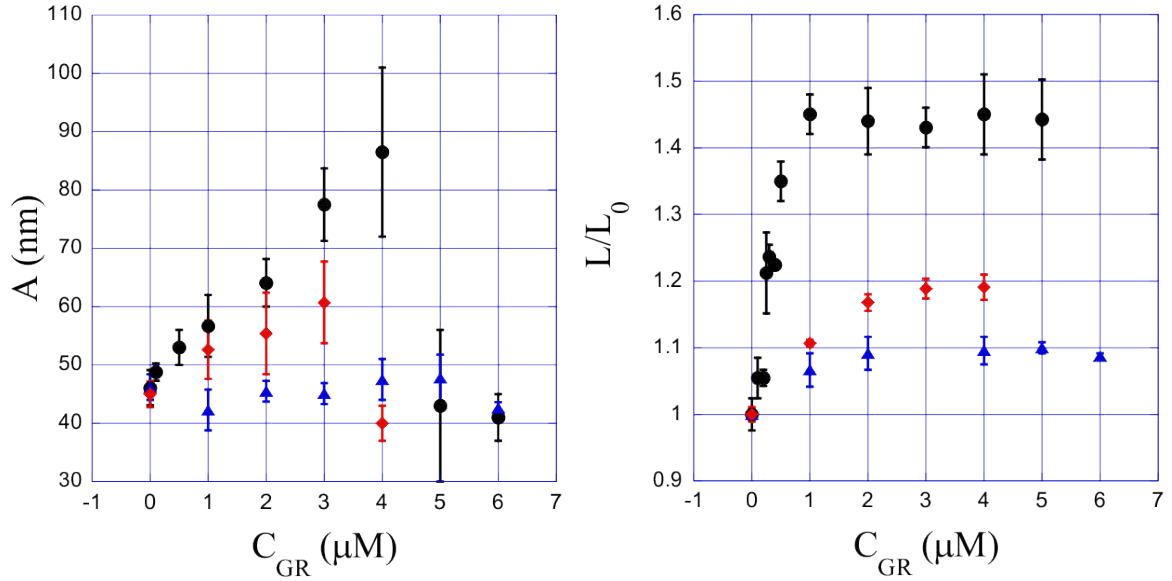


Figura 5.6: Comprimento de persistência, A , e comprimento de contorno relativo, L/L_0 , para os complexos DNA-GR em função da concentração de GR. Círculos pretos: solução sem PEG; losangos vermelhos: PEG 1% em massa na solução; triângulos azuis: PEG 5% em massa na solução.

complexos DNA-EtBr após a adição de PEG 1% em massa na solução. Essa concentração de PEG foi mantida constante durante todo o experimento, enquanto a concentração de EtBr era variada. A Figura 5.6 (losangos vermelhos) mostra o resultado equivalente para os complexos DNA-GR. É importante observar que a adição de PEG 1% em massa na solução, muda quantitativamente o comportamento das propriedades mecânicas dos complexos DNA-intercalantes. Ambos os comprimentos de persistência, A , e de contorno, L , variam muito menos quando comparados a situação em que não há PEG na solução (círculos pretos), embora o comportamento qualitativo aparenta ser aproximadamente o mesmo, especialmente no caso dos complexos DNA-GR.

Finalmente, também nas Figuras 5.5 e 5.6 (triângulos azuis), são mostrados os comportamentos dos comprimentos de persistência, A , e do comprimento de contorno, L , dos complexos DNA-EtBr e DNA-GR, respectivamente, quando o PEG 5% em massa é adicionado a solução. Nessa concentração de PEG 8000, os comprimentos de persistência, A , de ambos os complexos permanecem constantes dentro das barras de erro e os comprimentos de contorno, L , de ambos os complexos variam menos

5. A interação DNA-intercalantes em soluções contendo Poli(etileno glicol) 8000

ainda quando comparados à situação em que há PEG 1% em massa na solução, o que significa que o acréscimo na concentração de PEG suprime as mudanças no parâmetros mecânicos dos complexos DNA-intercalantes medidos através da espectroscopia de força.

É importante mencionar que nós também verificamos a influência da ordem de aplicação dos intercalantes sobre os nossos resultados experimentais. Para realizar essa tarefa, nós repetimos o procedimento empregado para obter os resultados experimentais mostrados nas Figuras 5.5 e 5.6, para algumas moléculas de DNA e utilizando algumas concentrações específicas dos intercalantes, mas agora aplicando primeiramente o intercalante e depois o PEG 1% em massa na solução. A proposta de tais medidas foi verificar a influência do PEG em moléculas de DNA previamente intercaladas. Inicialmente, nós medimos as propriedades mecânicas dos complexos DNA-intercalantes antes de adicionar o PEG na solução e, com isso, obtivemos o mesmo comportamento mostrado nas Figuras 5.5 e 5.6. Para concentrações baixas, nós verificamos um crescimento de ambos os comprimentos de persistência, A e de contorno, L , após a adição dos intercalantes e um decréscimo desses mesmos parâmetros após a inclusão do PEG 1% em massa na solução. Para $C_{EtBr} = 1,2 \mu\text{M}$, por exemplo, o comprimento de persistência, A , de um dos complexos DNA-intercalantes testados teve um acréscimo, a partir do valor inicial para o DNA puro ($\sim 49 \text{ nm}$), até alcançar um valor $\sim 65,3 \text{ nm}$ quando adicionado o EtBr e depois decresceu para um valor $\sim 55 \text{ nm}$ após a adição do PEG 1% em massa na solução (mantendo a mesma concentração de EtBr na solução). Para a mesma molécula de DNA, o comprimento de contorno, L , teve um acréscimo, a partir do valor inicial para o DNA puro ($\sim 16,4 \mu\text{m}$), até alcançar um valor $\sim 18,5 \mu\text{m}$ quando adicionado o EtBr e depois decresceu para um valor $\sim 16,2 \mu\text{m}$ após a adição do PEG 1% em massa na solução. Para uma outra molécula de DNA testada, mas agora utilizando $C_{EtBr} = 2,4 \mu\text{M}$ o comportamento qualitativo é exatamente o mesmo: o comprimento de persistência, A , aumenta de $\sim 50,3 \text{ nm}$ até alcançar um valor $\sim 70,6 \text{ nm}$ quando adicionado o EtBr e depois decresceu para um valor $\sim 49,6 \text{ nm}$ após a adição do PEG 1% em massa na solução (mantendo a mesma concentração de EtBr na solução). Para a mesma molécula de DNA, o comprimento de contorno, L ,

5. A interação DNA-intercalantes em soluções contendo Poli(etileno glicol) 8000

aumentou de $\sim 16,8 \mu\text{m}$, até alcançar um valor $\sim 18,9 \mu\text{m}$ quando adicionado o EtBr e depois decresceu para um valor $\sim 16,9 \mu\text{m}$ após a adição do PEG 1% em massa na solução. Esses resultados sugerem fortemente que a ordem de aplicação dos compostos (intercalantes e PEG) não mudam o comportamento geral dos parâmetros mecânicos mostrados nas Figuras 5.5 e 5.6.

Os resultados sintetizados nas Figuras 5.5 e 5.6, juntamente com a discussão do último parágrafo, podem ser prontamente explicados como base em uma interação entre o PEG e os compostos intercalantes. De fato, os efeitos físicos introduzidos pelo PEG na solução de DNA (aumento da viscosidade, aumento da pressão osmótica e desidratação da molécula de DNA), não são relevantes para as concentrações de PEG utilizadas nesse trabalho ($\leq 5\%$ em massa) [105,110], de forma que somente uma interação entre o PEG e os compostos intercalantes pode explicar os resultados obtidos com a espectroscopia de força. É importante observar que, em nossos experimentos, a concentração molar do PEG 8000 (1% em massa) é $\sim 1,25 \text{ mM}$, que é ~ 500 vezes maior que a concentração de pares de base do DNA na amostra ($\sim 2,43 \mu\text{M}$). Portanto, mesmo que a afinidade da interação PEG-intercalantes seja muito menor que a afinidade da interação DNA-intercalantes, o grande número de moléculas de PEG em solução é suficiente para interagir significativamente com os compostos intercalantes, que é exatamente o que sugere os resultados obtidos com a pinça óptica.

5.3.2 Resultados obtidos com a calorimetria isotérmica de titulação

De forma a complementar os resultados obtidos com a espectroscopia de força, nós realizamos alguns experimentos de calorimetria, a fim de verificarmos as interações PEG-EtBr e DNA-EtBr, bem como determinarmos a competição relativa entre o DNA e o PEG pelas moléculas de EtBr disponíveis em solução, de acordo com as nossas condições experimentais. Uma vez que há um forte indício experimental que o GelRed seja composto basicamente por duas moléculas de EtBr [107], é esperado que ele também interaja como o PEG.

A Figura 5.7 mostra o resultado obtido para a entalpia aparente de interação,

5. A interação DNA-intercalantes em soluções contendo Poli(etileno glicol) 8000

ΔH_{ap-int} , para os complexos PEG-EtBr formados na ausência (quadrados) e na presença (círculos) de DNA cuja concentração é $21,3 \mu\text{M}$, em função da concentração de EtBr na célula calorimétrica.

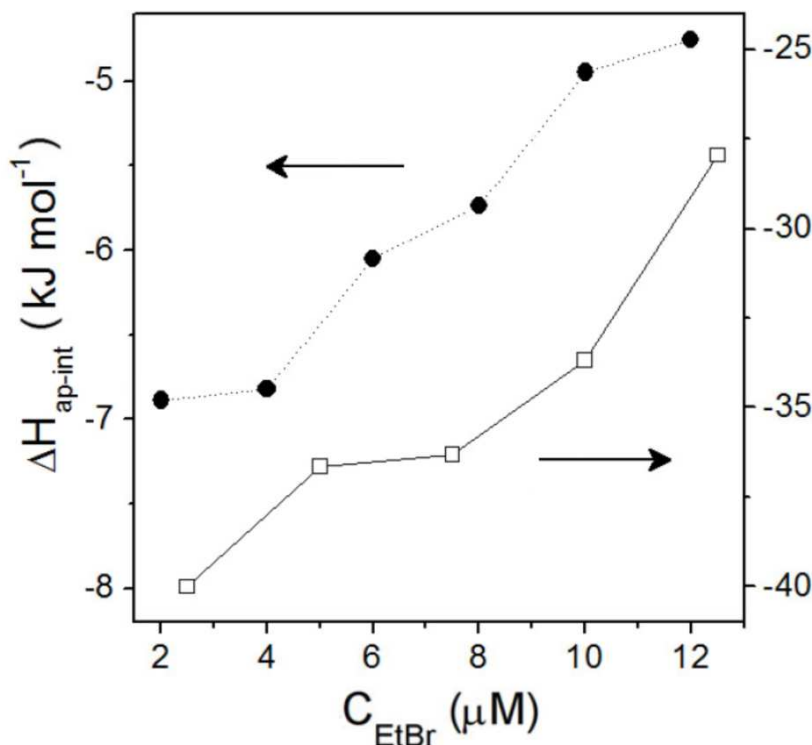


Figura 5.7: Entalpia aparente de interação, ΔH_{ap-int} , para os complexos PEG - EtBr formados na ausência (quadrados, eixo vertical à direita) e na presença (círculos, eixo vertical à esquerda) de DNA cuja concentração é $21,3 \mu\text{M}$.

Infelizmente não foi possível determinar o ΔH_{ap-int} para a interação DNA-EtBr, uma vez que a quantidade de calor medida para essa interação estava na faixa da incerteza do calorímetro, o que mostra que a interação DNA-EtBr, observada nos experimentos com a pinça óptica, é puramente entrópica. Por outro lado, para a faixa de concentrações de EtBr utilizadas, a interação PEG-EtBr foi exotérmica, com o ΔH_{ap-int} assumindo valores cada vez maiores (menos negativos), à medida que a concentração de EtBr foi aumentando, devido à diminuição do número de sítios livres de PEG na solução, por conta do aumento da concentração de EtBr. O ΔH_{ap-int} para a formação dos complexos PEG-EtBr (na ausência de DNA) muda de -40 kJ/mol em uma baixa concentração de EtBr para -28 kJ/mol em concentrações mais altas de

5. A interação DNA-intercalantes em soluções contendo Poli(etileno glicol) 8000

EtBr, sugerindo que as interações moleculares dispersivas* (e não somente interações hidrofóbicas) estejam conduzindo a interação PEG-EtBr.

A fim de determinarmos a competição entre o DNA e o PEG, pelas moléculas de EtBr disponíveis na solução, foi realizada a medida do ΔH_{ap-int} para a formação dos complexos PEG-EtBr na presença de DNA, com uma concentração de $21,3 \mu\text{M}$. Dessa forma, foi possível comparar os valores do ΔH_{ap-int} na ausência e na presença do DNA na solução. A ideia é que a adição de moléculas de EtBr na solução de DNA-PEG fará com que menos moléculas do composto intercalante estejam disponíveis para interagir com o PEG, uma vez que uma parte das moléculas do EtBr estarão intercaladas nas moléculas de DNA. Uma vez que a interação DNA-EtBr foi atérmica ($\Delta H_{ap-int} = 0$), é possível propor que a fração f dada por

$$f = \frac{\Delta H_{ap-int} \text{ (presença DNA)}}{\Delta H_{ap-int} \text{ (ausência DNA)}} , \quad (5.1)$$

expressa a fração de moléculas de EtBr que permanecem interagindo com o PEG quando o DNA está presente na solução. Independente da concentração de EtBr, nós encontramos que $f \sim 0,16$, o que significa que $\sim 84\%$ das moléculas de EtBr que, inicialmente, estavam interagindo com o PEG na ausência de moléculas de DNA são liberadas para intercalarem nos sítios disponíveis das moléculas de DNA, quando ele se encontra na solução. Além disso, a fração f obtida com a equação (5.1), pode ser comparada diretamente com o resultado obtido na espectroscopia de força, uma vez que a razão entre os valores de saturação do comprimento de contorno normalizado (L/L_0) devem fornecer a mesma fração f . De fato, na saturação, o EtBr aumenta o comprimento de contorno, L , do λ -DNA em $\sim 39\%$ segundo nossas condições experimentais [80]. No entanto, quando o PEG 1% em massa está presente na solução, a Figura 5.5 mostra que tal aumento é somente de $\sim 20\%$ na saturação. Portanto, na saturação, nós temos $[L/L_0](\text{PEG } 1,0\%)/[L/L_0](\text{PEG } 0,0\%) \sim 1,20/1,39 \sim 86\%$, o que significa que $\sim 14\%$ das moléculas de EtBr previamente intercaladas ao DNA, são liberadas para interagirem com o PEG 1% em massa presente na solução. Tal estima-

*Interações moleculares dispersivas são interações de van der Waals que envolvem uma energia na faixa de 0-40 kJ/mol.

5. A interação DNA-intercalantes em soluções contendo Poli(etileno glicol) 8000

tiva está em excelente acordo com o valor obtido com os experimentos de calorimetria ($f \sim 16\%$).

Por último, é importante levar em conta a diferença de entropia em sistemas onde há grandes moléculas de PEG em solução (onde os monômeros estão unidos, formando a molécula de PEG) e monômeros de PEG livres em solução. No primeiro, a entropia é menor e, por isso, esse efeito deve desempenhar um papel importante no comportamento do polímero em solução [111], uma vez que o decréscimo de entropia, associada à conectividade entre os monômeros, deve aumentar, localmente, a interação entre o ligante e os monômeros de PEG. Dessa forma, embora oligômeros de etileno-glicol tenham uma pequena (ou quase desprezível) interação com intercalantes, o mesmo conjunto de monômeros, agora reunidos formando uma grande molécula de PEG, pode interagir significativamente com o ligante. Em outras palavras, nós podemos levar em conta a fração do volume de monômeros, ϕ , dentro de uma molécula isolada do polímero em um solvente qualquer, onde ϕ é proporcional ao número de monômeros, N , ou seja, $\phi \sim 1/N^{1/2}$ [112]. Portanto, embora a concentração de monômeros de PEG na solução seja muito pequena, a concentração local de monômeros dentro de uma molécula isolada é muito maior, devido ao tamanho da molécula. No nosso caso, para uma molécula de PEG 8000, $N = 181$ e, portanto, $\phi \sim 7$ vezes maior do que a concentração de monômeros na solução. Dessa forma, uma atração quase desprezível para oligômeros, torna-se uma interação forte a nível polimérico e, conseqüentemente, uma molécula pequena de um ligante hidrofóbico (como é o caso do EtBr) deve permanecer “presa” dentro da cadeia polimérica.

Capítulo 6

Conclusões e Perspectivas

Neste trabalho, utilizando o modelo Worm Like-Chain (WLC) elaborado por Marko e Siggia [26], foi possível monitorar as mudanças nas propriedades mecânicas da molécula de DNA ao interagir com a Actinomicina D e o GelRed, além de verificar a influência do Poli(etileno glicol) 8000 na interação do DNA com os compostos intercalantes (Brometo de Etídio e GelRed).

Mostramos que a utilização do modelo estatístico de dois sítios, permite a extração dos parâmetros físico-químicos da interação DNA-Actinomicina D [113] e que os valores encontrados concordam de maneira bastante satisfatória com os resultados obtidos com outras técnicas experimentais [69–72].

Utilizando duas técnicas experimentais diferentes, a espectroscopia de força e o espalhamento de luz, nós realizamos a primeira caracterização para interação DNA-GelRed, que é um composto que possui a sua estrutura química patenteada e ainda não foi oficialmente divulgada pelo seu fabricante. Utilizando o modelo de exclusão de vizinhos, determinamos os parâmetros físico-químicos da interação DNA-GelRed e mostramos que o GelRed se liga fortemente ao DNA. Além disso, nossos dados obtidos sugerem fortemente que o GelRed é um bis-intercalante [107].

Por último, utilizando a espectroscopia de força e a calorimetria isotérmica de titulação, estudamos a influência do Poli(etileno glicol) (PEG) 8000 na interação da molécula de DNA com compostos intercalantes. Vimos que, para concentrações de $\text{PEG} \leq 10\%$ em massa, há uma ligeira alteração nos parâmetros mecânicos do DNA

6. Conclusões e Perspectivas

puro medidos no regime entrópico. O gráfico de força $\times$ extensão (Figura 5.2) revela a ocorrência de uma fraca, porém mensurável, força de depleção que ocasiona em uma interação de atração entre os próprios segmentos da molécula de DNA. Além disso, nossos dados de espectroscopia de força e ITC mostraram que o PEG interage significativamente com o EtBr, mesmo em uma concentração de 1% em massa. Uma vez que há um forte indício experimental que o GelRed seja composto basicamente por duas moléculas de EtBr, é esperado que ele também interaja significativamente como o PEG. Nossos resultados demonstraram que o PEG não é um polímero totalmente neutro para esses tipos de sistemas e, portanto, deve ser utilizado com cautela quando utilizado como osmólito ou como agente condensante na interação DNA-ligantes [114].

Como perspectiva deste trabalho podemos citar: simular, de maneira cada vez mais realista, o ambiente intracelular usando proteínas que compactam o DNA, como é o caso das histonas, e osmólitos encontrados *in vivo*. Esperamos que tais caracterizações possam fornecer informações úteis sobre o mecanismo de ação de ligantes e melhorar a eficácia dos tratamentos médicos atuais.

Apêndice: Artigos publicados

Neste apêndice apresentamos os artigos publicados durante o período de doutorado do autor desta tese (março de 2012 a fevereiro de 2016).

- Revista *Physical Chemistry Chemical Physics*

E. C. Cesconetto, F. S. A. Junior, F. A. P. Crisafuli, O. N. Mesquita, E. B. Ramos and M. S. Rocha, “DNA interaction with Actinomycin D: mechanical measurements reveal the details of the binding data”. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **15**, 11070-11077 (2013).

- Revista *European Biophysics Journal*

F. A. P. Crisafuli, E. B. Ramos and M. S. Rocha, “Characterizing the interaction between DNA and GelRed fluorescent stain”. *Eur. Biophys. J.* **44** (1), 1-7 (2014).

- Revista *Biopolymers*

F. A. P. Crisafuli, L. H. M. da Silva, G. M. D. Ferreira, E. B. Ramos and M. S. Rocha, “Depletion interactions and modulation of DNA-intercalators binding: Opposite behavior of the “neutral” polymer poly(ethylene-glycol)”. *Biopolymers* **105** (4), 227-233 (2016).

DNA interaction with Actinomycin D: mechanical measurements reveal the details of the binding data

Cite this: *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2013, **15**, 11070

E. C. Cesconetto,^a F. S. A. Junior,^a F. A. P. Crisafuli,^a O. N. Mesquita,^b E. B. Ramos^a and M. S. Rocha^{*a}

We have studied the interaction between the anticancer drug Actinomycin D (ActD) and the DNA molecule by performing single molecule stretching experiments and atomic force microscopy (AFM) imaging. From the stretching experiments, we determine how the mechanical properties of the DNA–ActD complexes vary as a function of drug concentration, for a fixed DNA concentration. We have found that the persistence lengths of the complexes formed behave non-monotonically: at low concentrations of ActD they are more flexible than the bare DNA molecule and become stiffer at higher concentrations. On the other hand, the contour length increases monotonically as a function of ActD concentration. Using a two-sites quenched disorder statistical model recently developed by us, we were able to extract chemical parameters such as the intrinsic binding constant and the degree of cooperativity from these pure mechanical measurements, thus performing a robust characterization of the interaction. The AFM images, otherwise, were used to measure the bending angle size distribution that ActD introduces on the double-helix structure and the average number of bendings per DNA molecule as a function of drug concentration, two quantities that cannot be determined from the stretching experiments.

Received 28th February 2013,
Accepted 7th May 2013

DOI: 10.1039/c3cp50898f

www.rsc.org/pccp

Introduction

The characterization of DNA interactions with ligands such as proteins and drugs is important to many areas of knowledge, from the comprehension of basic intracellular processes to the application in medical sciences, especially in cancer chemotherapy. In fact, some drugs such as the anthracycline antibiotics and the platinum-based compounds exhibit a strong affinity to the DNA of cancer cells. When bound, these drugs usually inhibit DNA replication, thus stopping the tumor growth. Therefore, characterizing such interactions may allow the improvement of current therapies and the development of more efficient therapeutic drugs.

Actinomycin D (ActD) is a DNA ligand clinically used as an antibiotic and to treat some highly malignant cancers, such as gestational trophoblastic disease,¹ Wilms' tumor² and rhabdomyosarcoma.³ The drug exhibits a complex interaction with double-stranded (ds) DNA, presenting two distinct parts which bind to DNA in different modes: while the phenoxazone ring

intercalates, preferentially at the G–C base pairs, the cyclic pentapeptide chains bind to the minor groove, usually forming hydrogen bonds with the guanine bases.^{4–7}

It is well known that these types of interaction can strongly disturb the double-helix structure depending on the drug concentration. In fact, intercalation in general produces an effective increase of the DNA contour length by increasing the axial distance between consecutive base pairs in each intercalated site, which is usually accompanied by a double-helix unwinding.^{8–10} Groove binding, otherwise, can induce significant bending, unwinding and even base flipping^{11,12} on the double-helix structure. These structural perturbations are usually reflected in changes in the mechanical properties of the DNA molecule, such that the mechanism of action of the drug can be usually deduced by monitoring the changes in mechanical parameters such as the contour and persistence lengths, the radius of gyration, the equilibrium end-to-end distance, *etc.*

In this work we use single molecule stretching experiments performed by optical tweezers to study the DNA–ActD interaction, determining how the mechanical properties of the DNA–ActD complexes vary as a function of drug concentration, for a fixed DNA concentration. In particular, we have found that the persistence length of the DNA–ActD complexes exhibits an

^a Departamento de Física, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil. E-mail: marcios.rocha@ufv.br; Fax: +55-31-3899-2483; Tel: +55-31-3899-3399

^b Departamento de Física, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

unusual non-monotonic behavior: the complexes formed are more flexible than the bare DNA molecule for low concentrations of ActD and stiffer for higher concentrations. The measured contour length of the complexes, otherwise, increases monotonically as a function of drug concentration. Previous works that have used optical tweezers to study DNA–ActD interaction have focused on large forces (tens of piconewtons) to determine the influence of the drug on the DNA overstretching transition.¹³ The present study, however, focuses on stretching DNA–ActD complexes by using typical forces on the order of a few piconewtons, thus within the entropic regime. It is also the first report on how the mechanical properties of DNA–ActD complexes vary as a function of the drug concentration in the sample.

In addition, we have used atomic force microscopy (AFM) to obtain some images of the DNA–ActD complexes deposited on mica substrates, with the purpose of characterizing the morphology of these complexes. The images obtained allowed us to measure the bending angle distribution that ActD introduces on the double-helix structure. Furthermore, by analyzing the average number of bendings per molecule as a function of drug concentration, we recovered qualitatively the non-monotonic behavior of the persistence length as a function of drug concentration, previously obtained in the stretching experiments. In previous works, the AFM technique was used to investigate the ActD interaction with single-stranded (ss) DNA at very low salt concentrations.¹⁴

Finally, using a methodology of data analysis recently developed by us,^{15–17} we show how the chemical parameters of the interaction, and consequently the binding data, can be extracted from the pure mechanical measurements performed using the optical tweezers. Therefore, such an approach allows one to extract information about the physical chemistry of the system by knowing only its mechanical properties. In this work we have applied this methodology to both the persistence and contour length data of the DNA–ActD complexes, obtaining nearly similar results and conclusions about the mechanism of action of ActD. In particular, we have confirmed the power of our theoretical model¹⁷ to determine the cooperativity of a drug–DNA binding reaction, by letting the degree of cooperativity be a free parameter in the fitting of the persistence length data. In addition, this is the first work which explicitly shows that our theoretical approach can be successfully applied to other mechanical properties besides the persistence length.

Methods

Stretching experiments

To study the DNA–ActD interaction, we have used optical tweezers to perform single molecule stretching experiments of these complexes. In particular, we are interested in determining the changes in the mechanical properties while varying the drug concentration in the sample, for a fixed DNA concentration.

The samples consist of a Phosphate Buffered Saline (PBS) solution with pH = 7.4 and [NaCl] = 150 mM containing λ -DNA molecules (at a base-pair concentration $C_{bp} = 10.6 \mu\text{M}$) attached by the ends to a microscope coverslip and to a polystyrene bead

with 3 μm diameter (Polysciences Inc.), such that one can easily manipulate the DNA molecule by trapping the polystyrene bead using the optical tweezers. Details about the sample preparation can be found in ref. 18, and the λ -DNA molecules were purchased from Promega Corp.

The optical tweezers consist of a 1064 nm ytterbium-doped fiber laser with a maximum output power of 5.8 W (IPG Photonics) mounted on a Nikon Ti-S inverted microscope with a 100 $\times$ N.A. 1.4 objective. The apparatus is previously calibrated by two independent methods using free beads (without attached DNA) in solution: indirect Stokes force calibration and by analyzing the Brownian fluctuations of the bead in the potential well of the tweezers,¹⁹ from which we determine its trap stiffness κ . Once calibrated, the optical tweezers are used to trap the polystyrene bead attached to a DNA molecule. By moving the microscope stage, and consequently the coverslip (in the horizontal x -direction) with controlled velocity, we stretch the DNA while monitoring the change in the bead position in the potential well of the tweezers, $x(t)$, by videomicroscopy.

Therefore, the stretching force can be determined by $F(t) = \kappa x(t)$, and t is converted to the DNA extension x_{DNA} by multiplying by the velocity of the coverslip. The details about this procedure can be found in ref. 16. Finally, we plot the force $\times$ extension curve of a bare DNA molecule in Fig. 1 (circles). The solid line shown in this figure is a fitting to the Marko–Siggia Worm-Like Chain (WLC) model.²⁰ From this fitting, we extract the persistence length A and the contour length L of the DNA molecule. Observe that the WLC model fits well to our experimental data, which has allowed us to determine the mechanical parameters A and L with accuracy. For the bare λ -DNA molecule, in fact, we find the average values $A = 50 \pm 3 \text{ nm}$ and $L = 16.5 \pm 1 \mu\text{m}$. These results correspond to well-known values reported in the literature.^{21,22} The method therefore can be

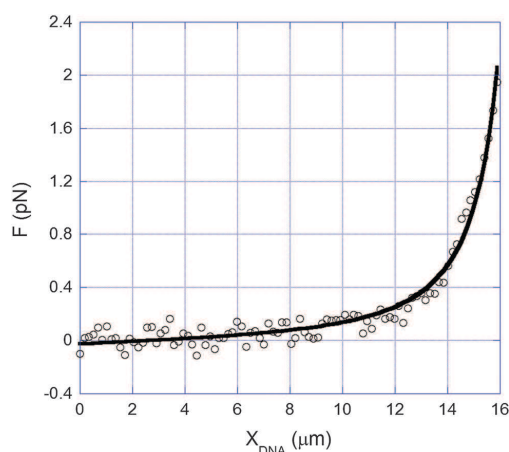


Fig. 1 Force $\times$ extension curve of a bare DNA molecule obtained with our experimental procedure. Circles: experimental data; solid line: a fitting to the Marko–Siggia Worm-Like Chain (WLC) model.²⁰

used to study the variation of these parameters for DNA-ActD complexes as a function of the drug concentration in the sample.

Observe that we have limited the maximum stretching forces to ~ 2 pN. There are some advantages of working in this regime. Firstly, the Marko-Siggia WLC model works only in the entropic regime, where the forces applied to the DNA molecule are low enough.²⁰ Therefore, it is expected that the model describes better experiments performed under low forces. Secondly, we do not disturb significantly the chemical equilibrium between the DNA and the drug in this force regime.²³ It is well established now that higher applied forces may change the chemical equilibrium between the DNA and the drug molecules in solution. In fact, recently Vladescu *et al.* have shown that important interaction parameters such as the intrinsic binding constant and the binding site size depend strongly on the applied force on the DNA-drug complexes,²³ and therefore it is expected that mechanical properties such as the persistence and the contour lengths of these complexes are also force-dependent, since they usually depend on the quantity of drug bound to the DNA. Finally, although the DNA is tightly bound to the histone proteins inside the crowded cell's environment, there is theoretical and experimental evidence that the net forces acting on the DNA are on the order of a few piconewtons.²⁴

Atomic force microscopy (AFM) experiments

To perform the AFM experiments we have used the EcoRI-linearized plasmid pUC118-DNA, since its contour length is about 1/16 of the λ -DNA, thus improving the visualization of various different molecules in the scanned images and avoiding confusion with the large number of natural bendings present in the λ -DNA. This DNA was purified with phenol-chloroform extraction twice, and the ratio A_{260}/A_{280} was equal to 1.81, indicating an excellent sample purity.

The samples here consist of a Tris-HCl buffer solution with 10 mM of $MgCl_2$ containing the drug and DNA at chosen concentrations. The mixture was allowed to equilibrate for ~ 20 min. An aliquot of 20 μ l was deposited on a mica substrate and completely dried out with nitrogen at ambient temperature (~ 25 °C). To compare the morphologies observed with the results obtained in the stretching experiments, we have used similar ratios of drug concentration per DNA base-pair concentration (C_T/C_{bp}).

The mica substrates were scanned with the AFM (model NTEGRA, NT-MDT-Russia) operating in the conventional semicontact mode at a scan rate in the range of 1.5–3.0 Hz. We have used NanoWorld tips with a radius equal to 9 nm and a force constant equal to 7.4 N m^{-1} . The experiments were performed in air, at ambient temperature and controlled humidity (~ 30 – 35%). This experimental procedure has been shown suitable to visualize the deposited DNA and DNA-ActD complexes in a reproducible and reliable way.

Theory

We have recently developed a new methodology to analyze the changes in the mechanical properties of DNA-ligand complexes

as a function of drug concentration. This methodology was applied to study the interaction of the DNA molecule with the chemotherapeutic drug cisplatin^{15,16} and with the ligand β -cyclodextrin.¹⁷ In its more sophisticated version, which we discuss below, the methodology is based on a quenched disorder statistical model to calculate the effective persistence length of a DNA molecule partially bound to a ligand.

The model assumes that the ligands can bind to DNA with positive cooperativity, forming bound clusters. The bound clusters have a narrow size distribution with n molecules in average. These bound clusters are randomly distributed along the DNA. If there is no cooperativity, as we will show in the case of ActD, $n = 1$ and each molecule is located randomly along the DNA. When a bound cluster is formed it changes the local persistence length of the bare DNA (A_0) to the value A_1 . If two bound clusters happen to be nearest-neighbors, the complex changes again the local persistence length to the value A_2 .

Let us call C_T , C_f and C_b as the total, the free and the bound drug concentrations, respectively, such that $C_T = C_f + C_b$. We consider one linkable site of the DNA molecule the place occupied by one binding event, such that the bound site fraction is $r = C_b/C_{bp}$, and the maximum bound fraction will be denoted by r_{max} . Therefore, the probability for one site to be occupied is just r/r_{max} , and the probability for one unoccupied site is $1 - r/r_{max}$. Let us assume a random distribution for the location of the bound sites. There are therefore three distinct probabilities related to two nearest neighbor sites: (a) two nearest sites unoccupied have local persistence length A_0 and probability $P_0 = (1 - r/r_{max})^2$. (b) Two nearest sites simultaneously occupied have local persistence length A_2 and probability $P_2 = (r/r_{max})^2$. (c) Finally, one site unoccupied and the neighbor occupied have local persistence length A_1 and probability $P_1 = 1 - P_0 - P_2 = (2r/r_{max})(1 - r/r_{max})$. As discussed in ref. 17, this probability distribution for the bound ligands can be used even when the interaction between the DNA and the ligand presents cooperativity.

From the quenched disorder model the effective persistence length is given by ref. 17,

$$\frac{1}{A} = \frac{P_0}{A_0} + \frac{P_1}{A_1} + \frac{P_2}{A_2}. \quad (1)$$

Substituting the expressions of P_0 , P_1 and P_2 and rearranging the terms, one easily gets

$$\frac{1}{A} = \frac{1}{A_0} + \left(\frac{2}{A_1} - \frac{2}{A_0} \right) \left(\frac{r}{r_{max}} \right) + \left(\frac{1}{A_0} - \frac{2}{A_1} + \frac{1}{A_2} \right) \left(\frac{r}{r_{max}} \right)^2. \quad (2)$$

The relation between the bound site fraction r and the free drug concentration C_f in solution can be approximately described by the Hill binding isotherm,²⁵

$$r = \frac{r_{max}(K_i C_f)^n}{1 + (K_i C_f)^n}, \quad (3)$$

where K_i is the equilibrium intrinsic association constant and n is the Hill exponent, a parameter usually used to measure the degree of cooperativity in chemical reactions. If $n > 1$, the

interaction is positively cooperative, *i.e.*, a bound ligand molecule increases the affinity of DNA for subsequent ligand binding. If $n < 1$, otherwise, the interaction is negatively cooperative and a bound ligand molecule decreases the affinity of DNA for subsequent ligand binding. If $n = 1$, the interaction is non-cooperative and the affinity is independent of the number of bound ligand molecules. The Hill exponent is also a lower bound for the number of cooperating sites involved in the reaction,²⁵ and consequently, a measure of the average number of bound molecules that form a bound cluster.¹⁷ Observe that neighbor-exclusion effects were computed in this binding isotherm *via* the parameter $r_{\max}$.

The free drug concentration can be written as $C_f = C_T - rC_{bp}$ such that eqn (3) can be rewritten as

$$\frac{r}{r_{\max}} = \frac{[K_i(C_T - rC_{bp})]^n}{1 + [K_i(C_T - rC_{bp})]^n} \quad (4)$$

In ref. 17 we demonstrated that eqn (4) has a single-fixed point solution. This single solution can then be determined from any initial condition, which is appropriate for a fitting procedure. We therefore have used this equation iteratively in order to fit the experimental data of the persistence length, by plugging eqn (4) into eqn (2). In this paper we present a more general method to perform this fitting. Firstly call $r/r_{\max} = x$. Eqn (4) can be rewritten as

$$x = \frac{[K_i(C_T - r_{\max}C_{bp}x)]^n}{1 + [K_i(C_T - r_{\max}C_{bp}x)]^n} \quad (5)$$

Observe that this equation can be solved numerically for known values of the constants, returning x for each value of C_T . We therefore have written a simple algorithm that uses a subroutine to solve eqn (5) for initial guessed values of the constants, and uses the results returned for x plugged into eqn (2) to fit the experimental data of the persistence length A as a function of C_T/C_{bp} , by using least squares fitting. The algorithm was written in MatLab and uses the built-in least squares fitting routine of the program. This procedure allows one to extract information about the binding data ($r_{\max}$, K_i , n) from pure mechanical measurements.

Results and discussion

Stretching experiments

Persistence length data analysis. In Fig. 2 we show the behavior of the persistence length A of DNA–ActD complexes as a function of drug total concentration normalized by the DNA base-pair concentration in the sample (C_T/C_{bp} , expressed in M/M). Observe that the persistence length exhibits a non-monotonic behavior. It firstly decreases from the bare DNA value (~ 50 nm) down to ~ 23 nm at $C_T/C_{bp} = 0.09$. Then, it increases up to ~ 43 nm measured at $C_T/C_{bp} = 0.66$. Finally, for $C_T/C_{bp} > 0.66$ it abruptly decreases down to ~ 25 nm.

To achieve these results, the experiments were performed as follows. Firstly, we choose a particular bare DNA molecule and stretch it seven times. Then, we change the drug concentration

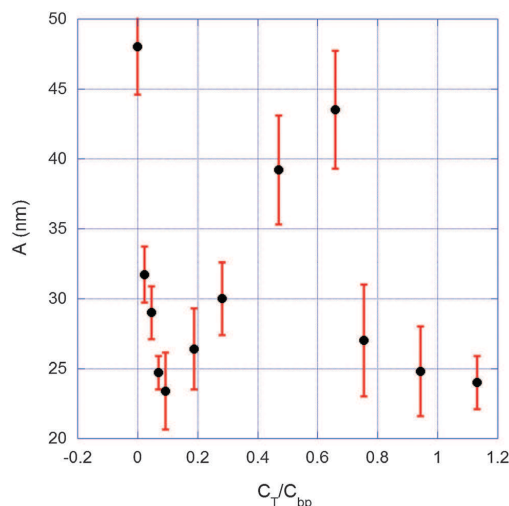


Fig. 2 Persistence length A as a function of concentration ratio C_T/C_{bp} for DNA–ActD complexes. Observe that it exhibits a non-monotonic behavior. It firstly decreases from the bare DNA value (~ 50 nm) down to ~ 23 nm at $C_T/C_{bp} = 0.09$. Then, it increases up to ~ 43 nm measured at $C_T/C_{bp} = 0.66$. Finally, for $C_T > 0.66$ it abruptly decreases down to ~ 25 nm. The error bars for each concentration are the standard deviations obtained from different DNA molecules used to perform the experiments.

in the sample using a micropipette. After changing the concentration, we wait ~ 25 minutes for the drug to equilibrate with DNA. This time scale was shown sufficient for ActD to equilibrate with DNA,¹³ and it was verified for our experimental conditions by analyzing the reversibility of the stretching curves. We then perform again seven stretching experiments, obtaining the new values for the persistence and contour lengths for the chosen ActD concentration. This procedure is then repeated sequentially for each drug concentration. We have also repeated the entire procedure, scanning all the concentrations, for other DNA molecules using different samples. The error bars presented in Fig. 2 for each concentration are the standard deviations obtained from this set of measurements.

The non-monotonic behavior exhibited for $C_T/C_{bp} < 0.66$, can be understood with the two-sites quenched disorder statistical model discussed in the previous section. This model can be used to determine the local persistence lengths and the chemical parameters of the interaction from these pure mechanical measurements.

The abrupt decrease of the persistence length at high drug concentrations ($C_T/C_{bp} > 0.66$) is probably related to partial DNA denaturation due to the formation of denaturing bubbles, as discussed in ref. 26 and 27 using a simple phenomenological model and using *ab initio* calculations, respectively. In principle, this effect could be modeled by adding another local persistence length in eqn (2), associated with the formation of denaturing bubbles. Nevertheless, the number of adjustable parameters

would increase accordingly, making the fitting procedure difficult. In addition, we are interested in the properties of the interaction when double-stranded DNA is not partially denatured, such that the points corresponding to $C_T/C_{bp} > 0.66$ will not be included in the fitting analysis.

Firstly we have fitted the experimental data of Fig. 2 to eqn (2) with the adjustable parameters A_1 , A_2 , K_i , n and r_{max} using the Hill binding isotherm, as described in the previous section. We have used the measured value $A_0 = 48$ nm in the fit, the well-known persistence length of a bare DNA molecule. This fitting is shown in Fig. 3, in which we have plotted the inverse of the persistence length ($1/A$) as a function of C_T/C_{bp} , for convenience. Observe that the model fits well to the experimental data. The fitting returns the results $A_1 = (15.2 \pm 0.6)$ nm, $A_2 = (64.1 \pm 24.8)$ nm, $K_i = (1.5 \pm 0.4) \times 10^6$ M⁻¹, $r_{max} = 0.11 \pm 0.01$, and $n = 1.1 \pm 0.2$.

As stated earlier, A_1 and A_2 are the local persistence lengths associated with the binding of one and two nearest neighbor ActD molecules, respectively. Therefore, the result $A_1 < A_0$ indicates that the binding of one single ActD molecule decreases the effective persistence length of the complex formed, while the result $A_2 > A_1$ indicates that the binding of two nearest ActD molecules increases the effective persistence length. The relatively large error bar obtained for the parameter A_2 is due to the number of adjustable parameters used in the fitting. When applying the presented methodology for a particular DNA-ligand system, one can obtain lower error bars if some of the parameters are previously known by other means, therefore reducing the number of adjustable parameters in the fitting process.

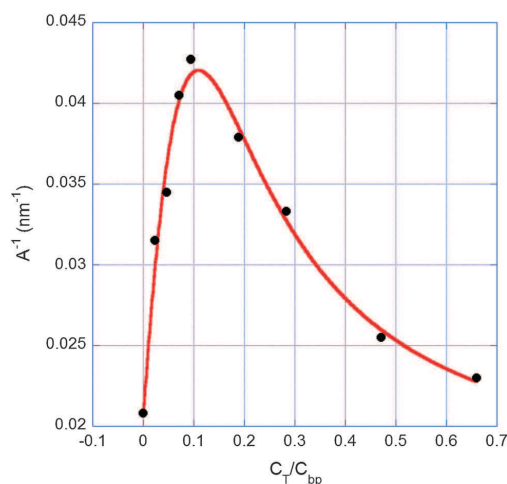


Fig. 3 Circles: inverse of the persistence length ($1/A$) as a function of concentration ratio C_T/C_{bp} obtained from the experimental data of Fig. 2. Solid line: a fitting to the two-sites quenched disorder model, eqn (2). Observe that the model fits well to the experimental data, allowing us to extract the local persistence lengths $A_1 = (15.2 \pm 0.6)$ nm, $A_2 = (64.1 \pm 24.8)$ nm, and the chemical parameters $K_i = (1.5 \pm 0.4) \times 10^6$ M⁻¹, $r_{max} = 0.11 \pm 0.01$ and $n = 1.1 \pm 0.2$.

The fact that $n \sim 1$ indicates that the interaction is non-cooperative, in agreement with previous experiments performed with different techniques.^{13,28} In addition, the value determined for the maximum bound fraction (r_{max}) can be used to estimate the number of base-pairs excluded by an ActD molecule in the λ -DNA molecule, which is $N = 1/r_{max} = 9 \pm 1$ base pairs. For comparison, Ruggiero Neto and Colombo have reported that the number of base-pairs excluded by an ActD molecule is 11 for calf thymus DNA.²⁹ It should be emphasized that this is not the number of base pairs that an ActD molecule spans along the double-helix, which is only ~ 4 base pairs.¹³ There are also naked base pairs effectively excluded by each ActD molecule, due to the gaps formed between bound drug molecules.

Finally, the value obtained for the intrinsic equilibrium binding constant K_i is close to those obtained by using other experimental techniques and/or approaches,^{13,30,31} albeit for different DNA sequences. Major anticancer drugs have equilibrium binding constants from 10^4 to 10^7 M⁻¹ when interacting with DNA. As examples, we cite the anthracycline antibiotic daunomycin (7×10^5 M⁻¹), which is used to treat leukemia and other cancers;³² the intercalator and covalent binder psoralen (9×10^4 M⁻¹), which is used to treat various skin diseases;²⁷ and the platinum-based compound cisplatin (1.5×10^4 M⁻¹), which is used to treat head, neck, testicular, ovarian and non-small cell lung cancers.¹⁶ While the binding constant indicates which drug binds stronger to DNA, the Hill exponent plays an important role in understanding the mechanism of action of the drug, since it is directly correlated to cooperativity and to the size of the drug cluster bound to DNA. The first two previous examples (daunomycin, psoralen) are typical non-cooperative ligands, while the last one (cisplatin) is positively cooperative, an aspect correlated to DNA compaction by the action of the drug.^{15,16} In real chemotherapy treatments, usually two or more drugs are complementarily used to improve the results. Therefore, understanding the differences in the molecular aspects of the interactions can improve the efficacy of such treatments. Nevertheless, it is out of the scope of this work to assort the efficiency of ActD as compared to other chemotherapeutic drugs, since this aspect strongly depends on the natural selectivity of each drug for a certain type of cancer cell.

Contour length data analysis. In Fig. 4 (circles) we shown the relative increase of the contour length $\Delta L/L_0$ of the DNA-ActD complexes, as a function of C_T/C_{bp} . Observe that the contour length increases monotonically as ActD binds to DNA, resembling the behavior observed for typical intercalators.²⁷ Let us assume that the contour length increases as two nearest linkable sites become simultaneously occupied, *i.e.*,

$$\frac{\Delta L}{L_0} = \gamma P_2 = \gamma \left(\frac{r}{r_{max}} \right)^2, \quad (6)$$

where γ is the saturation value of $\Delta L/L_0$, and $r/r_{max} = x$ is given by eqn (5). This assumption is reasonable since two nearest bound molecules also increase the persistence length (with a local value A_2), an effect also manifested by intercalators.²⁷

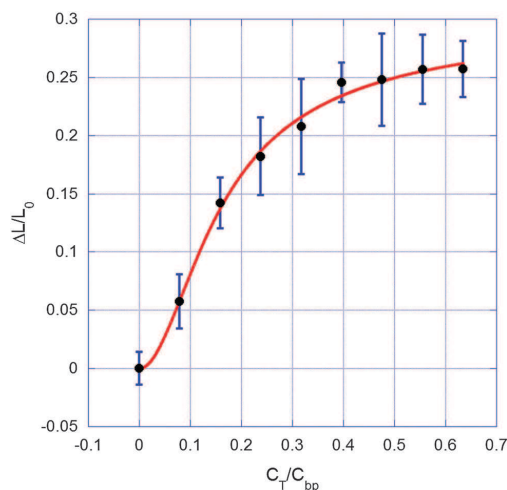


Fig. 4 Circles: relative increase of the contour length $\Delta L/L_0$ as a function of concentration ratio C_T/C_{bp} (experimental data). Solid line: a fitting to eqn (6). From this fitting we extract the chemical parameters $r_{\max} = 0.10 \pm 0.01$, $n = 1.0 \pm 0.2$ and $K_i = (1.6 \pm 0.2) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$.

The solid line shown in Fig. 4 is a fitting of eqn (6) to the experimental data, using the numerical method previously described. Observe that eqn (6) explains well the behavior of the contour length. The fitting gives the chemical parameters $r_{\max} = 0.10 \pm 0.01$, $n = 1.0 \pm 0.2$ and $K_i = (1.6 \pm 0.2) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$. These results agree very well with those provided by the persistence length data, within the error bars. Also, we found $\gamma = 0.31 \pm 0.02$, which indicates that ActD binding increases the DNA contour length by $\sim 30\%$ at saturation.

We have also tried to fit the data of contour length using a single molecule-event such that $\Delta L/L_0$ would be proportional to $r/r_{\max}$. However, this assumption returns a worse fit, with the values of K_i and n approximately twice the values obtained for these parameters from the persistence length data analysis. Since the binding occurs with the minor-groove and intercalation as a single binding mode, we would expect a single binding isotherm. With the assumption of two molecules, as in eqn (6), the fit is much better and the values of K_i , n and $r_{\max}$ obtained are now very close to their respective values obtained from the persistence length data analysis.

AFM experiments

In Fig. 5 we show the typical images of (a) bare DNA and of (b) a DNA-ActD complex ($C_T/C_{bp} = 0.09$) obtained with the AFM by using the procedure previously detailed. Observe that the images are clear and well defined, thus allowing a robust measurement of the bending angles introduced by ActD on the double-helix structure. These bending angles were measured using the appropriate tool of the Ntegra software, and one of them is illustrated in Fig. 5(b). In this same figure, we have pointed by arrows two typical bendings introduced by ActD in the DNA molecule.

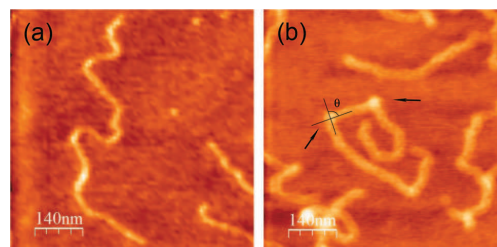


Fig. 5 Typical images of (a) bare DNA and of (b) a DNA-ActD complex ($C_T/C_{bp} = 0.09$) obtained with the AFM. In (b), we have pointed by arrows two bending angles introduced by ActD in the DNA molecule.

We have analyzed the angle size distribution, as well as the frequency of occurrence of these bending angles in an ensemble of different DNA-ActD complexes (~ 140 complexes for each different drug concentration). In Fig. 6 we show the angle size distribution for $C_T/C_{bp} = 0.37$. We have found an average value of $(84 \pm 22)^\circ$. As expected, this angle size distribution is about the same for all concentration ratios used, only the number of bendings per DNA molecule varies significantly from one concentration ratio to another. It is worth emphasizing, however, that the angles measured in the AFM experiments may be dependent on the bivalent ions present in the buffer used (Mg^{2+}) and/or surface effects.

In Fig. 7 we show the frequency of occurrence of at least three bendings per DNA molecule, $f(N_b \geq 3)$, as a function of the concentration ratio C_T/C_{bp} . Observe that this frequency reaches its maximum value at $C_T/C_{bp} = 0.09$, but then decreases for larger concentration ratios. This result is in qualitative

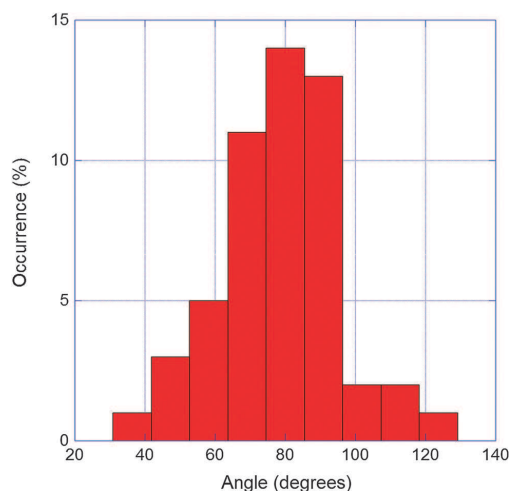


Fig. 6 Angle size distribution for $C_T/C_{bp} = 0.37$. We have found an average value of $(84 \pm 22)^\circ$. Such distribution is about the same for all concentration ratios used, only the number of bendings per DNA molecule varies significantly from one concentration ratio to another.

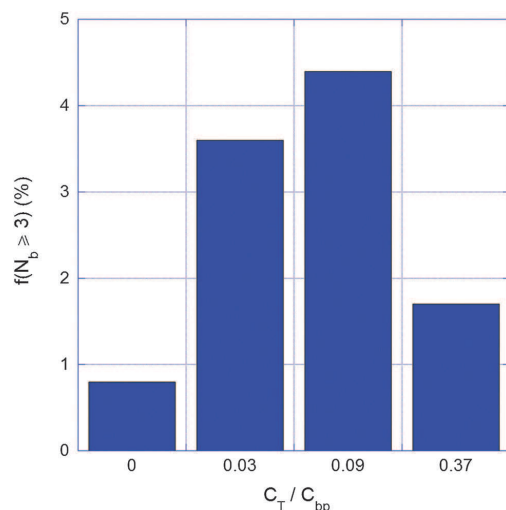


Fig. 7 Frequency of occurrence $f(N_b \geq 3)$ of at least three bendings per DNA molecule as a function of the concentration ratio C_T/C_{bp} .

agreement with the non-monotonic behavior of the persistence length shown in Fig. 2, since the persistence length is proportional to the inverse of the number of bendings per molecule. In fact, observe that the minimum of the persistence length coincides with the maximum of $f(N_b \geq 3)$, as expected. The threshold number of bendings (three) that we have used to plot the frequency of occurrence was chosen because the number of DNA molecules with four or more bendings is very small ($<0.5\%$) for the ActD–pUC118–DNA complexes.

Measuring the number of bendings per molecule is a reliable way to compare qualitatively the results from the stretching experiments to the AFM experiments. Some authors use a different approach to measure the persistence length of the DNA by analyzing AFM images, determining this quantity from the square-averaged end-to-end distance of the molecule.³³ This procedure is reliable for measuring the persistence length of bare DNA molecules. Nevertheless, it can lead to equivocated results depending on the drug used, because a DNA molecule partially deposited on the substrate may be constrained and not allowed to relax the conformational changes introduced by the drug as the substrate is dried out, thus increasing the effective drug concentration.

Conclusions

We have studied the interaction between double-stranded DNA and the drug Actinomycin D (ActD) both by single molecule stretching experiments and by analyzing AFM images of the complexes formed. We have monitored the mechanical properties of these complexes as a function of drug concentration, for a fixed DNA concentration. Using a methodology of data analysis recently developed by us, we were able to extract

the chemical parameters (intrinsic binding constant, occupancy, cooperativity degree), and consequently the binding data from pure mechanical measurements, thus performing a robust characterization of the interaction. The results obtained for the chemical parameters agree well with those obtained by other techniques.^{13,28–31} In addition, the methodology presented here can be straightforwardly applied to other ligands which interact with DNA by changing the mechanical properties, therefore being a new powerful tool in the field.

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 Fundação Arthur Bernardes – Universidade Federal de Viçosa (FUNARBE-UFV).

References

- 1 R. Osathanondh, D. P. Goldstein and G. B. Pastorfide, *Cancer*, 1975, **36**, 863–866.
- 2 G. J. D'Angio, A. E. Evans, N. Breslow, B. Beckwith, H. Bishop, P. Feigl, W. Goodwin, L. L. Leape, L. F. Sinks, W. Sutow, M. Tefft and J. Wolff, *Cancer*, 1976, **38**, 633–646.
- 3 D. Pinkel and J. Pickren, *JAMA, J. Am. Med. Assoc.*, 1961, **175**, 293–298.
- 4 D. J. Patel, S. A. Kozłowski, J. A. Rice, C. Broka and K. Itakura, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1981, **78**, 7281–7284.
- 5 W. Müller and D. M. Crothers, *J. Mol. Biol.*, 1968, **35**, 251–290.
- 6 H. M. Sobell, S. C. Jain, T. D. Sakore and C. E. Nordman, *Nat. New Biol.*, 1971, **231**, 200–205.
- 7 F. Takusagawa, M. Dabrow, S. Neidle and H. M. Berman, *Nature*, 1982, **296**, 466–469.
- 8 H. Fritzsche, H. Triebel, J. B. Chaires, N. Dattagupta and D. M. Crothers, *Biochemistry*, 1982, **21**, 3940–3946.
- 9 D. Reha, M. Kabelac, F. Ryjacek, J. Sponer, J. E. Sponer, M. Elstner, S. Suhai and P. Hobza, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 3366–3376.
- 10 A. Sischka, K. Toensing, R. Eckel, S. D. Wilking, N. Sewald, R. Rios and D. Anselmetti, *Biophys. J.*, 2005, **88**, 404–411.
- 11 C. Zimmer and U. Wähner, *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 1986, **47**, 31–112.
- 12 T. D. Schneider, *Nucleic Acids Res.*, 2001, **29**, 4881–4891.
- 13 T. Paramanathan, I. Vladescu, M. J. McCauley, I. Rouzina and M. C. Williams, *Nucleic Acids Res.*, 2012, **40**, 1–8.
- 14 J. Adamcik, F. Valle, G. Witz, K. Rechendorff and G. Dietler, *Nanotechnology*, 2008, **19**, 384016.
- 15 F. A. P. Crisafuli, E. C. Cesconetto, E. B. Ramos and M. S. Rocha, *Appl. Phys. Lett.*, 2012, **100**, 083701.
- 16 F. A. P. Crisafuli, E. C. Cesconetto, E. B. Ramos and M. S. Rocha, *Integr. Biol.*, 2012, **4**, 568–574.
- 17 L. Siman, I. S. S. Carrasco, J. K. L. da Silva, M. C. Oliveira, M. S. Rocha and O. N. Mesquita, *Phys. Rev. Lett.*, 2012, **109**, 248103.
- 18 G. V. Shivashankar, M. Feingold, O. Krichevsky and A. Libchaber, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1999, **96**, 7916–7921.

Apêndice: Artigos publicados

[View Article Online](#)

Paper

PCCP

- 19 P. S. Alves and M. S. Rocha, *Appl. Phys. B: Lasers Opt.*, 2012, **107**, 375–378.
- 20 J. F. Marko and E. D. Siggia, *Macromolecules*, 1995, **28**, 8759–8770.
- 21 T. Strick, J. F. Allemand, V. Croquette and D. Bensimon, *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 2000, **74**, 115–140.
- 22 M. D. Wang, H. Yin, R. Landick, J. Gelles and S. M. Block, *Biophys. J.*, 1997, **72**, 1335–1346.
- 23 I. D. Vladescu, M. J. McCauley, M. E. Nunez, I. Rouzina and M. C. Williams, *Nat. Methods*, 2007, **4**, 517–522.
- 24 R. Blossey and H. Schiessel, *FEBS J.*, 2011, **28**, 3619–3632.
- 25 M. Daune, *Molecular Biophysics*, Oxford University Press, Oxford, 1st edn, 1999.
- 26 M. S. Rocha, *Phys. Biol.*, 2009, **6**, 036013.
- 27 M. S. Rocha, A. D. Lúcio, S. S. Alexandre, R. W. Nunes and O. N. Mesquita, *Appl. Phys. Lett.*, 2009, **95**, 253703.
- 28 A. L. Galo, J. R. Neto, D. P. Brognaro, R. C. Caetano, F. P. Souza and M. F. Colombo, *J. Phys. Chem. B*, 2011, **115**, 8883–8890.
- 29 J. R. Neto and M. F. Colombo, *Biopolymers*, 2000, **53**, 46–59.
- 30 F. Sha and F. M. Chen, *Biophys. J.*, 2000, **79**, 2095–2104.
- 31 J. Goodisman, R. Rehfuss, B. Ward and J. C. Dabrowiak, *Biochemistry*, 1992, **31**, 1046–1058.
- 32 J. B. Chaires, N. Dattagupta and D. M. Crothers, *Biochemistry*, 1982, **21**, 3933–3940.
- 33 C. Rivetti, M. Guthold and C. Bustamante, *J. Mol. Biol.*, 1996, **264**, 919–932.

Characterizing the interaction between DNA and GelRed fluorescent stain

F. A. P. Crisafuli · E. B. Ramos · M. S. Rocha

Received: 8 August 2014 / Revised: 13 October 2014 / Accepted: 20 October 2014
© European Biophysical Societies' Association 2014

Abstract We have performed single-molecule stretching and dynamic light-scattering (DLS) experiments to characterize the interaction between the DNA molecule and the fluorescent stain GelRed. The results from single-molecule stretching show that the persistence length of DNA–GelRed complexes increases as the ligand concentration increases up to a critical concentration, then decreases for higher concentrations. The contour length of the complexes, on the other hand, increases monotonically as a function of GelRed concentration, suggesting that intercalation is the main binding mechanism. To characterize the physicochemical chemistry of the interaction, we used the McGhee–von Hippel binding isotherm to extract physicochemical data for the interaction from the contour length data. Such analysis enabled us to conclude that the GelRed stain is, in fact, a bis-intercalator. In addition, DLS experiments were performed to study the changes of the effective size of the DNA–GelRed complexes, measured as the hydrodynamic radius, as a function of ligand concentration. We observed qualitative agreement between the results obtained from the two techniques by comparing the behavior of the hydrodynamics radius and the radius of gyration, because the latter quantity can be expressed as a function of mechanical properties determined from the stretching experiments.

Keywords Intercalation · Single-molecule stretching · Dynamic light scattering · Binding isotherm

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00249-014-0995-4) contains supplementary material, which is available to authorized users.

F. A. P. Crisafuli · E. B. Ramos · M. S. Rocha (✉)
Laboratório de Física Biológica - Departamento de Física,
Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil
e-mail: marcos.rocha@ufv.br

Introduction

Rational drug design is a process in which a new compound is conceived and synthesized to attack a specific biological target and/or to perform specific functions. In the health sciences, for example, there is much interest in developing new drugs to treat human diseases such as cancer. In biochemistry and molecular biology, new compounds have been developed to stain DNA and proteins, enabling visualization by fluorescence microscopy and the possibility of following the routes of biological processes.

GelRed is a fluorescent nucleic acid stain designed with the purpose of replacing highly toxic ethidium bromide (EtBr) in gel electrophoresis and other experimental techniques which depend on the fluorescence of stained DNA. When bound to DNA, GelRed has the same absorption and emission spectra as EtBr and, according to its manufacturer (Biotium, Hayward, CA, USA), the compound can be used in electrophoresis with greater sensitivity than EtBr, with the advantage of being much less toxic and mutagenic (Biotium 2013; Huang et al. 2010). This last property, according to the manufacturer, is because the chemical structure of the dye was designed such that the dye is incapable of crossing cell membranes (Biotium 2013). The chemical structure of GelRed is proprietary and has not been officially reported by the manufacturer. Nevertheless, one can find unofficial information on the internet claiming that GelRed is synthesized by linking two EtBr molecules with a linear spacer (Wikipedia 2014), which suggests the dye may be a bis-intercalator.

Although the manufacturer states that GelRed binds to DNA by a combination of intercalation and electrostatic binding (Biotium 2013), most details of the interaction have not yet been reported in the literature. In this work

we performed single-molecule stretching and dynamic light scattering experiments to gain insight into this interaction. We recently developed a method that enables easy extraction of physicochemical data for DNA–ligand interactions from pure mechanical properties of DNA, which are readily obtained from single-molecule stretching. This method enables clarification of specific binding mechanism(s) (Siman et al. 2012; Cesconetto et al. 2013; Silva et al. 2013). The purpose of this work was to perform robust characterization of the DNA–GelRed interaction, by determining changes of the basic mechanical properties of the DNA molecule as GelRed binds, physicochemical data for the interaction, and the nature of the binding mechanism.

Materials and methods

Stretching experiments

In these experiments the samples were λ -DNA molecules end-labeled with biotin in phosphate-buffered saline (PBS) solution with $[\text{NaCl}] = 140 \text{ mM}$. One end of the DNA molecule was attached to a streptavidin-coated glass coverslip by use of the procedure reported by Amitani et al. (2010). The other end of the molecule was attached to a streptavidin-coated polystyrene bead of diameter $3 \mu\text{m}$ (Bangs Laboratories). As reported by Crisafuli et al. (2012) and Cesconetto et al. (2013), in this configuration one can easily trap the polystyrene bead with the optical tweezers and stretch the DNA molecule by moving the microscope stage by use of a piezoelectric actuator. The sample chamber consisted of an o-ring glued in the coverslip, such that one can exchange the buffer and consequently change the ligand concentration, without affecting the trapped DNA molecule, by use of micropipettes. The DNA base-pair concentration used in all stretching experiments was $C_{\text{bp}} = 2.4 \mu\text{M}$.

The optical tweezers consisted of a 1,064-nm ytterbium-doped fiber laser with a maximum output power of 5.8 W (IPG Photonics) mounted on a Nikon Ti-S inverted microscope with a $100 \times \text{N.A. } 1.4$ objective. The apparatus had previously been calibrated by use of two independent methods as described by Crisafuli et al. (2012). Once calibrated, the optical tweezers were used to trap the polystyrene bead attached to a DNA molecule, enabling DNA stretching to be performed with high resolution and consequently enabling force $\times$ extension curves of the DNA–ligand complexes to be obtained for each situation studied. These curves were fitted to the Marko–Siggia worm-like chain (WLC) model (Marko and Siggia 1995). One can, therefore, study how the persistence and contour lengths of the DNA molecule vary as a function of ligand concentration. Representative data for the force $\times$ extension curves

with the corresponding fitting can be found in Online Resource 1. To avoid enthalpic contributions to the values of the mechanical data, all stretching experiments were performed in the entropic low-force region ($\leq 2 \text{ pN}$) (Crisafuli et al. 2012; Cesconetto et al. 2013). All other experimental details can be found elsewhere (Crisafuli et al. 2012; Cesconetto et al. 2013; Silva et al. 2013; Reis et al. 2013).

Dynamic light scattering (DLS)

To confirm the results obtained from the stretching experiments by use of a second technique, we also performed DLS on the DNA–GelRed complexes. DLS performed at a fixed scattering angle enables evaluation of the hydrodynamic radius of the complexes, which is an estimate of the size of the complexes (Reis et al. 2013). The hydrodynamic radius was measured to enable investigation of the effect of the ligand on the effective size of the DNA molecule, which depends on its persistence and contour length. Thus, the results obtained from two very different experimental techniques can be compared (at least indirectly).

The DLS apparatus used was a ZetaSizer Nano-S (Malvern Instruments) with a low-volume cuvette (ZEN2112, Hellma Analytics). The backscattering angle used was 173° in all experiments. Particle size was determined using the non-negative least squares (NNLS) algorithm. Representative data of the intensity autocorrelation function of the scattered light can be found in Online Resource 1.

The DNA used in these experiments was a 3,000 bp molecule (Thermo Scientific) in the same buffer as used for the optical tweezers samples (it is difficult to use λ -DNA in DLS because of the long contour length). The DNA molecules are equilibrated with a specific concentration of GelRed directly in the cuvette used in the DLS apparatus. The DNA concentration used in all DLS experiments was the same as that used in the optical tweezers experiments ($2.4 \mu\text{M}$ of base-pairs). This concentration is sufficiently low to avoid entanglements and relevant interactions between different DNA molecules (Hur and Shaqfeh 2001).

Results

Stretching experiments

In Fig. 1 (red circles) we show the behavior of the persistence length A of DNA–GelRed complexes as a function of ligand total concentration in the sample C_T . Observe that it initially increases from the bare DNA value ($\sim 46 \text{ nm}$) until it reaches a maximum value of $\sim 86 \text{ nm}$ at $C_T = 4.0 \mu\text{M}$. For higher concentrations, it abruptly decays to $\sim 43 \text{ nm}$. For comparison purposes, we also show in Fig. 1 (blue squares) the persistence length of DNA–EtBr complexes.

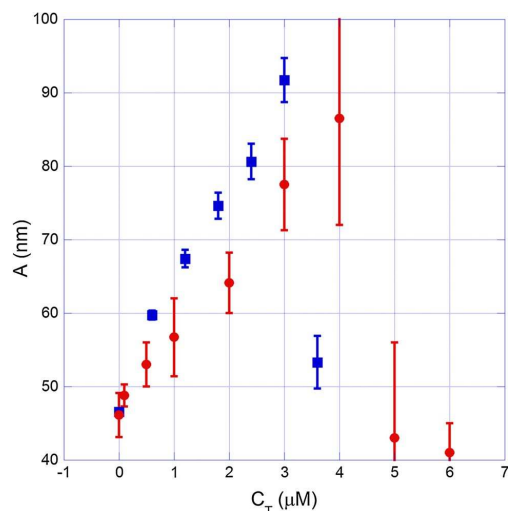


Fig. 1 Persistence length A as a function of ligand total concentration in the sample C_T for DNA–GelRed complexes (red circles) and DNA–EtBr complexes (blue squares). Observe that for both types of complex A initially increases from the bare DNA value (~ 46 nm) until it reaches a maximum value, then abruptly decreases

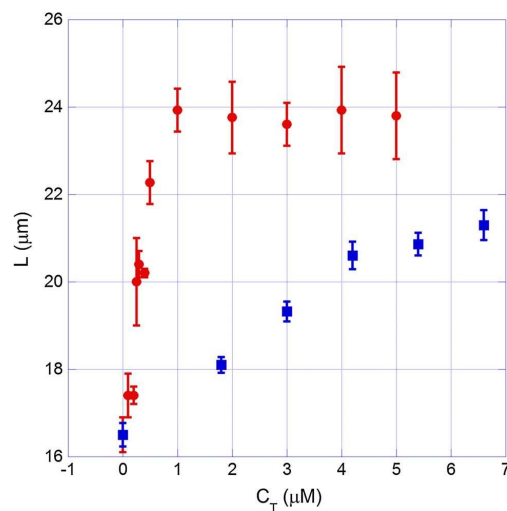


Fig. 2 Contour length L of DNA–GelRed complexes (red circles) and DNA–EtBr complexes (blue squares) as a function of ligand total concentration in the sample C_T . Observe that L increases monotonically from the bare DNA value (~ 16.5 μm) to a saturation value

Observe that the behavior of this mechanical property for the two drugs is quite similar, even quantitatively, which is the first evidence that the chemical structure and binding mode of the two compounds are somewhat similar.

In Fig. 2 (red circles) we show the behavior of the contour length L of DNA–GelRed complexes as a function of total ligand concentration in the sample C_T . Observe that L increases monotonically from the bare DNA value (~ 16.5 μm) to a saturation value of ~ 24 μm . For comparison purposes, we also show in Fig. 2 (blue squares) the same data for the DNA–EtBr complexes. Observe that the qualitative behavior is, again, similar but here there is a major difference: the contour length of the DNA–GelRed complexes saturates at a very low concentration (~ 1 μM) compared with results for the DNA–EtBr complexes, which saturate only at ~ 10 μM with a saturation value of ~ 23 μm , as shown by Rocha et al. (2007).

To obtain these results, the experiments were performed as follows. First, we chose a specific bare DNA molecule and stretched it five times, determining the mean values of the persistence and contour lengths. We then changed the ligand concentration in the sample by use of a micropipette. After changing the concentration, we waited ~ 20 minutes for the ligand to equilibrate with DNA. This time scale is sufficient for both GelRed and EtBr to equilibrate with DNA under our experimental conditions, as was verified by analyzing the reversibility of the stretching curves

and by performing some experiments after waiting longer, which resulted in no significant difference. We then performed another five stretching experiments, obtaining new values for the persistence and contour lengths for the chosen ligand concentration. This procedure was then repeated sequentially for each ligand concentration. We also repeated the entire procedure, scanning all the concentrations, for other DNA molecules using different samples. The error bars presented in Figs. 1 and 2 for each concentration are the standard errors obtained from this set of measurements.

The behavior of both persistence and contour lengths strongly suggests that the dominant mechanism of interaction between DNA and GelRed is intercalative binding, because the behavior is qualitatively identical to that shown in Figs. 1 and 2 for the well-known monointercalator EtBr. In fact, the general behavior of the persistence length A shown in Fig. 1 has previously been verified by our group for the intercalators daunomycin, psoralen, diaminobenzidine, and even EtBr under nearly similar experimental conditions (Rocha et al. 2007, 2009; Rocha 2009; Reis et al. 2013), by using optical tweezers in the low-force region (≤ 2 pN). Some authors have also reported the same qualitative behavior of the persistence length for intercalators, finding that the value increases for low ligand concentrations and decreases for higher concentrations (Tessmer et al. 2003; Cassina et al. 2010; Kaji et al. 2001). Rocha (2009) and Rocha et al. (2009) have proposed that the

abrupt decrease of the persistence length shown in Fig. 1 for $C_T > 4 \mu\text{M}$ is related to partial DNA denaturation, with the formation of denaturing bubbles, probably because of the pulling force.

It is also well established that intercalators always increase the DNA contour length when binding, by increasing the axial distance between two adjacent base-pairs in the intercalative site (Sischka et al. 2005; Fritzsche et al. 1982; Chaires et al. 1982). The other common types of interaction between DNA and ligands, for example groove binding, electrostatic interaction, or covalent binding, do not increase the DNA contour length. On the contrary, in some cases these types of interaction can cause compaction of the DNA with a decrease of the “apparent contour length” measured by force spectroscopy in the low-force region used in our experiments (Crisafulli et al. 2012; Silva et al. 2013). Therefore at least for $C_T \leq 1 \mu\text{M}$ (the concentration range in which the contour length L increases strongly) intercalation is the dominant binding mode in the DNA–GelRed complexes.

The physicochemical properties of the DNA–GelRed interaction can be extracted from the contour length data. First, we used the data of Fig. 2 to determine the fractional increase of the contour length, $\Theta = (L - L_0)/L_0$, where L_0 is the bare DNA contour length, as a function of ligand concentration C_T . These data were plotted in Fig. 3 (circles). For intercalators this fractional increase is proportional to the fraction of bound ligand $r = C_b/C_{bp}$, where C_b is the concentration of bound ligand and C_{bp} is the DNA base-pair concentration. In other words, $\Theta = \gamma r$, where γ is the ratio of the increase of the contour length because of a single intercalating molecule (δ) to the mean distance between two consecutive base pairs in the bare DNA ($\Delta \sim 0.34 \text{ nm}$) (Rocha et al. 2007; Rocha 2009; Daune 1999). For typical monointercalating molecules one has $\delta \sim 0.34 \text{ nm}$ and, consequently, $\gamma \sim 1$ (Sischka et al. 2005; Fritzsche et al. 1982). The bound fraction r (and consequently the mechanical variable Θ) can be linked to the physicochemical properties by use of a binding isotherm. The McGhee–von Hippel binding isotherm usually describes the physical chemistry of DNA interactions with intercalators very well, because it computes in detail the neighbor-exclusion effects which are usually associated with this type of interaction (McGhee and von Hippel 1974; Rocha 2010). The binding isotherm is:

$$\frac{r}{C_f} = K_i(1 - nr) \left[\frac{1 - nr}{1 - (n-1)r} \right]^{n-1}, \quad (1)$$

where n is the exclusion number (a measure of the effective number of base-pairs occupied by a single ligand molecule (McGhee and von Hippel 1974)), K_i is the intrinsic equilibrium association constant, and $C_f = C_T - C_b$ is the free (not bound) concentration of ligand in solution.

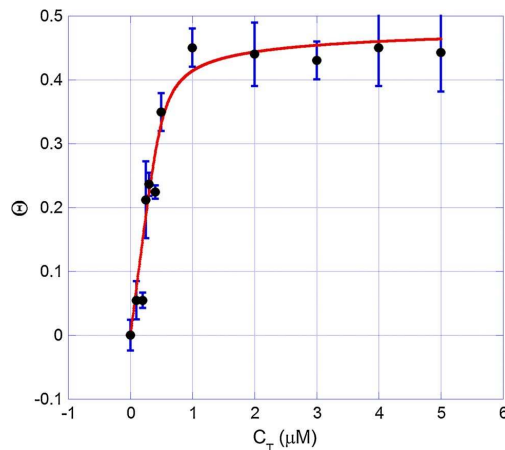


Fig. 3 Fractional increase of the contour length, $\Theta = (L - L_0)/L_0$ as a function of GelRed concentration C_T . Circles: experimental data. Solid line: a fitting to the McGhee–von Hippel binding isotherm. The fitting returns the physicochemical values $n = 3.7 \pm 0.4$, $K_i = (1.8 \pm 0.3) \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, and $\gamma = 1.9 \pm 0.1$

Figure 3 shows the fit of this binding isotherm to the experimental data (solid line), obtained by use of the computational method described in detail by Cesconetto et al. (2013). Observe that the model describes the experimental data well. Fitting returns the values $n = 3.7 \pm 0.4$, $K_i = (1.8 \pm 0.3) \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, and $\gamma = 1.9 \pm 0.1$. The same kind of analysis was performed by Rocha et al. (2007) for the DNA–EtBr complexes, and will not be repeated here. The results obtained from the fit shown in Fig. 3 strongly suggest that the GelRed dye is a DNA bis-intercalator. In fact, the exclusion number n indicates that each bound GelRed molecule effectively occupies 3.7 DNA base-pairs, a value substantially higher than the values obtained for most monointercalators, and approximately twice the value for EtBr (Rocha 2009; Chaires et al. 1982; Gaugain et al. 1978). The equilibrium constant is also higher than the result obtained for typical monointercalators ($\sim 10^5 \text{ M}^{-1}$) (Rocha et al. 2007; Rocha 2009; Chaires et al. 1982; Gaugain et al. 1978), and within the range found for most bis-intercalators (10^7 to 10^9 M^{-1}) (Günther et al. 2010; Berge et al. 2002; Murade et al. 2009; Maaloum et al. 2013; Garbay-Jaureguiberry et al. 1987). In particular, it is two orders of magnitude higher than the equilibrium constant for EtBr, a situation very similar to that for the bis-intercalator YOYO when compared with its precursor YO, a monointercalator, as is EtBr (Murade et al. 2009). Finally, the result $\gamma = 1.9 \pm 0.1$ is approximately twice the value obtained for typical monointercalators, suggesting that each bound GelRed molecule increases the DNA contour

length by ~ 0.65 nm, a result also typical of that for bis-intercalators (Günther et al. 2010; Maaloum et al. 2013). Observe that bis-intercalators should increase by a factor of approximately two the DNA contour length per bound molecule, because each ligand molecule contains two intercalating portions.

These results together are strong evidence that GelRed is, in fact, a bis-intercalator probably consisting of two EtBr molecules, as already claimed (Wikipedia 2014). In fact, if one supposes that GelRed is really a bis-intercalator formed by linking two EtBr molecules, it is straightforward to understand the statement of the dye manufacturer which claims that GelRed is more sensitive than EtBr in electrophoresis experiments (Biotium 2013). If one prepares two electrophoresis assays staining one with EtBr and the other with GelRed at the same molar concentrations, the GelRed assay will have approximately twice as many DNA-bound sites (at least for concentrations far from saturation), which implies in more fluorescence signal and consequently more contrast. In addition, the fact that the absorption and emission spectra of the two compounds are the same (Biotium 2013) is easily understood on the basis of the discussion above.

Finally, one can ask about the possibility of another binding mode for the DNA–GelRed interaction, in addition to intercalation. We believe electrostatic interactions may also be relevant in this system. Because EtBr is a monocationic ligand, GelRed is expected to have two positive charges, one in each intercalating portion. In principle it is expected that long-range electrostatic interactions may have two relevant physical effects. The first is stabilization of the double-helix structure because of screening of the strong electrostatic repulsion between the negatively charged phosphate groups (Fu et al. 2009), which is reflected by the abrupt transition of the persistence length of the DNA–GelRed complexes which occurs at high concentration compared with the DNA–EtBr complexes. The second effect is because the two positive charges of the GelRed molecule are distant by a fixed value, defined by the linear spacer used to link the two EtBr molecules; this results in positional correlation of the positive charges along the double helix. This positional correlation is probably reflected in the fact that the persistence length of the DNA–GelRed complexes is lower than the corresponding value for the DNA–EtBr complexes for the same ligand concentration.

DLS experiments

In Fig. 4 (circles) we show the behavior of the hydrodynamic radius R_H of DNA–GelRed complexes, obtained from DLS experiments, as a function of GelRed concentration. Observe that R_H increases monotonically with

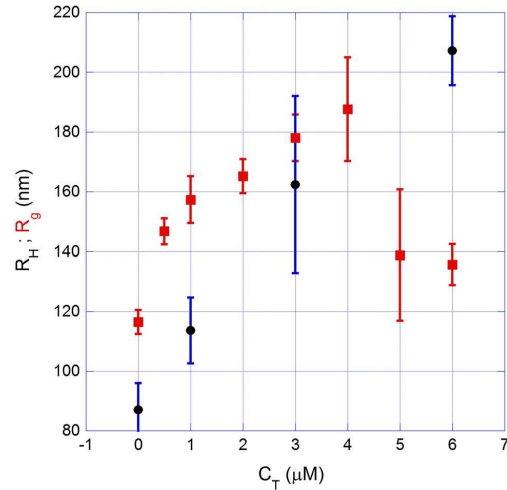


Fig. 4 Circles: hydrodynamic radius R_H of DNA–GelRed complexes, obtained from the DLS experiments, as a function of GelRed concentration C_T . Squares: estimates of the radius of gyration R_g for the DNA–GelRed complexes, obtained from the data from the stretching experiments. The fact that R_H increases monotonically with ligand concentration indicates that the abrupt transition of the persistence length does not occur for the samples used for the DLS experiments

GelRed concentration, from ~ 87 nm measured for bare DNA to ~ 207 nm obtained for $C_T = 6 \mu\text{M}$. Each experimental point is the mean value calculated from a set of ~ 100 measurements each 15 s long, and the error bars are the standard deviations. In the same figure, we show estimates of the radius of gyration R_g for the DNA–GelRed complexes (squares). R_g was calculated as a function of the mechanical properties obtained from the tweezers experiments as $R_g = \sqrt{\frac{1}{3}AL\left(1 - \frac{3A}{L} + \dots\right)}$ (Daune 1999). We used the values of the persistence length A shown in Fig. 1 and assumed that the contour length L of the 3000-bp DNA will increase with ligand concentration in the same ratio as shown in Fig. 3 for the λ -DNA. As remarked elsewhere (Reis et al. 2013), because the 3,000 bp DNA is sufficiently long (it contains ~ 20 persistence lengths), it is reasonable to expect base-pair sequence and other molecular details not to interfere with large-scale mechanical properties, for example persistence and contour lengths.

The radius of gyration R_g increases with both A and L . Thus, as shown in Fig. 4, R_g decreases for the two largest concentrations used, because of the abrupt decrease of the persistence length, shown in Fig. 1. A similar decrease was not verified for the hydrodynamic radius R_H , indicating that the abrupt transition of the persistence length does

not occur for the samples used for the DLS experiments. The same result was previously verified by our group for the intercalator diaminobenzidine (Reis et al. 2013). As discussed in this previous work, this result was expected because the abrupt transition of the persistence length is probably related to the pulling force exerted in the stretching experiments, which may locally denature the previously deformed double-helix structure of the DNA–intercalator complex (Rocha 2009; Rocha et al. 2009). In this way, one can say that the behavior of R_H obtained in DLS experiments agrees qualitatively with the results from the optical tweezers experiments. Our DLS results also agree with the results obtained by most authors who have measured the persistence length of DNA–intercalator complexes with non-stretching techniques (fluorescence microscopy, electron microscopy, viscosimetry, among others; Yoshikawa et al. 1992; Quake et al. 1997). These authors found that intercalators, in addition to increasing the DNA contour length, usually also increase DNA persistence length under these conditions, thus increasing the effective size of the DNA–ligand complexes. Nevertheless, it is important to mention that some of the work performed by use of typical DNA-stretching techniques (optical or magnetic tweezers) have found a monotonic decrease of DNA persistence length as a function of intercalator concentration (Murade et al. 2009; Sischka et al. 2005; Lipfert et al. 2010). In our opinion such results are because of the range of forces used to perform the measurements, because, as the force used to stretch the DNA is increased, the probability of forming denaturation bubbles in the highly distorted double helix of the DNA–intercalator complexes increases accordingly, thus leading to a reduction in persistence length. Other factors which can certainly affect the results of such measurements are the salt concentration used in the buffers, the model used to fit force–extension data (which may include DNA stretch modulus if forces are ≥ 10 pN), and the ratio of ligand concentration to DNA base pair concentration (Rocha et al. 2007).

Conclusion

By using two very different experimental techniques (single-molecule stretching and dynamic light scattering) we have characterized the interaction of the DNA molecule with the fluorescent stain GelRed, by determining changes of the mechanical properties of DNA–GelRed complexes as a function of ligand concentration and extracting the physical chemistry of the interaction from these data. It was found that GelRed binds strongly to DNA ($K_i \sim 10^7$ M $^{-1}$). We also found that each bound GelRed molecule effectively occupies ~ 3.7 DNA base-pairs and increases the contour length by ~ 0.65 nm. These values, which are

compatible with results expected for bis-intercalating molecules, enabled us to determine the main binding mechanism of the GelRed dye and to understand the higher sensitivity of this compound than ethidium bromide in electrophoresis experiments.

Acknowledgments This work was supported by the Brazilian agencies: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). The DLS experiments were performed in the “Laboratório de Microfluídica e Fluidos Complexos (LMFFC)” of Universidade Federal de Viçosa.

References

- Amitani I, Liu B, Dombrowski CC, Baskin RJ, Kowalczykowski SC (2010) Watching individual proteins acting on single molecules of dna. *Methods Enzymol* 472:261–291
- Berge T, Jenkins NS, Hopkirk RB, Waring MJ, Edwardson JM, Henderson RM (2002) Structural perturbations in dna caused by bis-intercalation of ditercalinium visualised by atomic force microscopy. *Nucl Acids Res* 30(13):2980–2986
- Biotium (2013) Safety report of gelred and gelgreen. Nucleic acid detection technologies. <http://www.biotium.com>. Accessed Oct 2014
- Cassina V, Seruggia D, Beretta GL, Salerno D, Brogioli D, Manzini S, Zunino F, Mantegazza F (2010) Atomic force microscopy study of dna conformation in the presence of drugs. *Eur Biophys J* 40(1):59–68
- Cesconetto EC, Junior FSA, Crisafuli FAP, Mesquita ON, Ramos EB, Rocha MS (2013) DNA interaction with actinomycin d: mechanical measurements reveal the details of the binding data. *Phys Chem Chem Phys* 15(26):11070–11077
- Chaires JB, Dattagupta N, Crothers DM (1982) Studies on interaction of anthracycline antibiotics and deoxyribonucleic-acid—equilibrium binding-studies on interaction of daunomycin with deoxyribonucleic-acid. *Biochemistry* 21(17):3933–3940
- Crisafuli FAP, Cesconetto EC, Ramos EB, Rocha MS (2012) Dna-cis-platin interaction studied with single-molecule stretching experiments. *Integr Biol* 4:568–574
- Daune M (1999) *Molecular biophysics*, 1st edn. Oxford University Press, Oxford
- Fritzsche H, Triebel H, Chaires JB, Dattagupta N, Crothers DM (1982) Interaction of anthracycline antibiotics with bio-polymers. 6. studies on interaction of anthracycline antibiotics and deoxyribonucleic-acid—geometry of intercalation of iremycin and daunomycin. *Biochemistry* 21(17):3940–3946
- Fu H, Chen H, Koh CG, Lim CT (2009) Effects of magnesium salt concentrations on b-dna overstretching transition. *Eur Phys J E* 29:45–49
- Garbay-Jaureguiberry C, Laugaa P, Delepierre M, Laalami S, Muzard G, Pecq JBL, Roques BP (1987) Dna bis-intercalators as new anti-tumour agents: Modulation of the anti-tumour activity by the linking chain rigidity in the ditercalinium series. *Anticancer Drug Des* 1(4):323–335
- Gaugain B, Barbet J, Capelle N, Roques BP, Pecq JL (1978) Dna bifunctional intercalators.2. fluorescence properties and DNA binding interaction of an ethidium homodimer and an acridine ethidium heterodimer. *Biochemistry* 17(24):5078–5088
- Günther K, Mertig M, Seidel R (2010) Mechanical and structural properties of yoyo-1 complexed DNA. *Nucl Acids Res* 38(19):6526–6532
- Huang Q, Baum L, Fu WL (2010) Simple and practical staining of dna with gelred in agarose gel electrophoresis. *Clin Lab* 56:149–152

Apêndice: Artigos publicados

Eur Biophys J

- Hur JS, Shaqfeh ESG (2001) Dynamics of dilute and semidilute dna solutions in the start-up of shear flow. *J Rheol* 45(2):421–450
- Kaji N, Ueda M, Baba Y (2001) Direct measurement of conformational changes on dna molecule intercalating with a fluorescence dye in an electrophoretic buffer solution by means of atomic force microscopy. *Electrophoresis* 22(16):3357–3364
- Lipfert J, Klijnhout S, Dekker NH (2010) Torsional sensing of small-molecule binding using magnetic tweezers. *Nucl Acids Res* 38(20):7122–7132
- Maaloum M, Mullera P, Harlepp S (2013) DNA–intercalator interactions: structural and physical analysis using atomic force microscopy in solution. *Soft Matter* 9:11233
- Marko JF, Siggia ED (1995) Stretching DNA. *Macromolecules* 28(26):8759–8770
- McGhee JD, von Hippel PH (1974) Theoretical aspects of DNA–protein interactions—cooperative and non-cooperative binding of large ligands to a one-dimensional homogeneous lattice. *J Mol Biol* 86(2):469–489
- Murade CU, Subramaniam V, Otto C, Bennink ML (2009) Interaction of oxazole yellow dyes with dna studied with hybrid optical tweezers and fluorescence microscopy. *Biophys J* 97:835–843
- Quake SR, Babcock H, Chu S (1997) The dynamics of partially extended single molecules of dna. *Nature* 388(10):151–154
- Reis LA, Ramos EB, Rocha MS (2013) DNA interaction with diamino-benzidine studied with optical tweezers and dynamic light scattering. *J Phys Chem B* 117(46):14345–14350
- Rocha MS (2009) Modeling the entropic structural transition of dna complexes formed with intercalating drugs. *Phys Biol* 6:036013
- Rocha MS (2010) Revisiting the neighbor exclusion model and its applications. *Biopolymers* 93:1–7
- Rocha MS, Ferreira MC, Mesquita ON (2007) Transition on the entropic elasticity of DNA induced by intercalating molecules. *J Chem Phys* 127(10), Art. 105108
- Rocha MS, Lúcio AD, Alexandre SS, Nunes RW, Mesquita ON (2009) DNA-psoralen: single-molecule experiments and first principles calculations. *Appl Phys Lett* 95:253703
- Silva EF, Ramos EB, Rocha MS (2013) Dna interaction with hoechst 33258: stretching experiments decouple the different binding modes. *J Phys Chem B* 117(24):7292–7296
- Siman L, Carrasco ISS, da Silva JKL, Oliveira MC, Rocha MS, Mesquita ON (2012) Quantitative assessment of the interplay between dna-elasticity and cooperative binding of ligands. *Phys Rev Lett* 109(24):248103
- Sischka A, Toensing K, Eckel R, Wilking SD, Sewald N, Rios R, Anselmetti D (2005) Molecular mechanisms and kinetics between dna and dna binding ligands. *Biophys J* 88(1):404–411
- Tessmer I, Baumann CG, Skinner GM, Molloy JE, Hoggett JG, Tendler SJB, Allen S (2003) Mode of drug binding to dna determined by optical tweezers force spectroscopy. *J Mod Opt* 50(10):1627–1636
- Wikipedia (2014) Gelred. <http://en.wikipedia.org/wiki/GelRed>. Accessed Oct 2014
- Yoshikawa K, Matsuzawa Y, Minagawa K, Doi M, Matsumoto M (1992) Opposite effect between intercalator and minor groove binding drug on the higher order structure of dna as is visualized by fluorescence microscopy. *Biochem Biophys Res Commun* 188(3):1274–1279

Depletion Interactions and Modulation of DNA–Intercalators Binding: Opposite Behavior of the “Neutral” Polymer Poly(Ethylene–Glycol)

F. A. P. Crisafuli,¹ L. H. M. da Silva,² G. M. D. Ferreira,² E. B. Ramos,¹ M. S. Rocha¹

¹ Departamento de Física, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil

² Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil

Received 5 October 2015; revised 17 November 2015; accepted 22 November 2015

Published online 30 November 2015 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI 10.1002/bip.22789

ABSTRACT:

In this work we have investigated the role of high molecular weight poly(ethylene-glycol) 8000 (PEG 8000) in modulating the interactions of the DNA molecule with two hydrophobic compounds: Ethidium Bromide (EtBr) and GelRed (GR). Both compounds are DNA intercalators and are used here to mimic the behavior of more complex DNA ligands such as chemotherapeutic drugs and proteins whose domains intercalate DNA. By means of single-molecule stretching experiments, we have been able to show that PEG 8000 strongly shifts the binding equilibrium between the intercalators and the DNA even at very low concentrations (1% in mass). Additionally, microcalorimetry experiments were performed to estimate the strength of the interaction between PEG and the DNA ligands. Our results suggest that PEG, depending on the system under study, may act as an “inert polymer” with no enthalpic contribution in some processes but, on the other hand, it may as well be an active (non-neutral) osmolyte in the context of modulating the activity of the reactants and products involved in DNA–ligand interactions. © 2015 Wiley Periodicals, Inc. *Biopolymers* 105: 227–233, 2016.

Keywords: polyethylene-glycol (PEG); depletion interactions; intercalation; optical tweezers; microcalorimetry

This article was originally published online as an accepted preprint. The “Published Online” date corresponds to the preprint version. You can request a copy of any preprints from the past two calendar years by emailing the Biopolymers editorial office at biopolymers@wiley.com.

INTRODUCTION

The investigation of DNA interactions with drugs is an important topic to many areas of knowledge and, in particular, to health sciences, since there is much interest in the efficiency of such drugs for treating human diseases. The most common examples are the cancer chemotherapies, in which the drug administered to the patient can, for instance, interact with DNA of the cancer cells, inhibiting its replication and thus stopping tumor growth. Despite the importance of the topic, the majority of work done in the field is performed with DNA molecules disperse in ordinary buffer solutions, a situation far from that found in vivo, in which the DNA molecules are always, to some extent, compacted/complexed with basic proteins inside cell nucleus, and the surrounding medium contains many other macromolecules such as proteins, sugars, small charged molecules and others.¹ These macromolecules act changing the volume occupancy (up to ~30%),² e.g., imposing both steric constraints on each other and changes on the thermodynamic activity of all other molecules, including the solvent itself.³ Therefore, an intriguing question arises from the above discussion: how added osmolytes affect the chemotherapeutic drugs–DNA interactions? In this work, we investigate this question by using the “neutral polymer”

Correspondence to: M. S. Rocha; e-mail: marcios.rocha@ufv.br
Contract grant sponsor: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

© 2015 Wiley Periodicals, Inc.

poly(ethylene-glycol) 8000 (PEG 8000) as osmolyte (or crowding agent) and the intercalators Ethidium Bromide (EtBr) and GelRed (GR) as the DNA binding drugs.

Poly(ethylene-glycol) (PEG) of several different molecular weights is often used in vitro as an osmolyte to modulate the binding of small ligands and proteins to DNA. It is also used to produce conformational changes on macromolecules either as a crowder (depletion interactions) or by changing the thermodynamic activity of all solutes in solution.⁴ EtBr and GR, on the other hand, are well known intercalators and the physical chemistry of their interactions with disperse DNA molecules was recently characterized.^{5,6}

Here we use high molecular weight PEG 8000 at low concentrations in mass (up to ~10%) to study the changes on the mechanical behavior of bare DNA molecules. Next, we study the effects of this neutral polymer on the DNA interactions with the two intercalators used, by monitoring the changes of the mechanical parameters of the DNA-drug complexes. To perform such measurements, we have used optical tweezers to stretch DNA, determining the mechanical quantities for each situation studied. All experiments were performed in nearly physiological conditions ([NaCl] = 140 mM, pH = 7.4). We have found that PEG concentrations as low as 10% in mass (so, much below the crowding occupancy inside the cell) only slightly change the mechanical parameters of bare DNA molecules, measured in the low-force entropic regime ($F < 2$ pN), due to depletion interactions.^{7,8} Depletion interactions take place in mixtures containing asymmetric molecules such as DNA segments and flexible polymer coils such as PEG and arise when there is an overlap between the flexible polymer exclusion zones.⁹ In a first approximation, its range scales with the polymer radius of gyration ($R_g \sim N^{1/2}$ in a θ solvent, being N the number of monomers comprising the polymer chain) and its strength is proportional to the solution osmotic pressure.

For DNA complexes formed with the two intercalators, we have found that the presence of PEG even at lower concentrations (~1% in mass) is sufficient to strongly shift the DNA-drug equilibrium. Microcalorimetric experiments were performed to confirm and estimate the interaction strength between PEG and intercalators. An average attractive interaction of at most 0.08 $K_B T$ was found between an intercalator molecule and an ethylene-glycol group. Although it is known that low molecular weight PEG (e.g., triethylene glycol) does not interact with EtBr,¹⁰ our results suggest that caution is needed when using high molecular weight PEG to study DNA-ligand binding equilibria, or biochemical experiments in general, since the entropy loss due to monomer connectivity may increase locally the number of contacts among the ligand and

the osmolyte units (monomers), and thus, the interaction between them.

MATERIALS AND METHODS

Optical Tweezers Experiments

The samples used in this work consist of λ -DNA molecules (New England Biolabs) end-labeled with biotin in a Phosphate Buffered Saline (PBS) solution with pH = 7.4 and [NaCl] = 140 mM. One end of the DNA molecules is attached to a streptavidin coated glass coverslip, while the other end of the molecule is attached to a streptavidin-coated polystyrene bead with 3 μ m diameter (Bangs Labs). In this configuration, one can easily trap the polystyrene bead with the optical tweezers and stretch the DNA molecule by moving the microscope stage with an attached piezoelectric actuator.

The sample chamber consists of an O-ring glued in the coverslip surface, and the buffer solution can be exchanged by using micropipettes. We have used PEG 8000 (Sigma-Aldrich Cat. 89510) without any further purification in all experiments. Various solutions containing the PBS buffer and chosen concentrations of PEG and the intercalators were previously prepared such that one can exchange the solution in the sample chamber to obtain the required concentrations of PEG and intercalator. We have used two intercalators to perform the stretching experiments: Ethidium Bromide (EtBr) (Sigma-Aldrich Cat. E8751) and GelRed (GR) (Biotium Cat. 41003), which are nucleic acids stains commonly used in electrophoresis experiments. The DNA base-pair concentration used in all stretching experiments was $C_{bp} = 2.43 \mu M$.

By fitting the experimental force-extension curves obtained from the stretching experiments to the Marko-Siggia WormLike Chain (WLC) model,¹¹ we can extract the mechanical parameters that characterize the DNA molecule: the persistence length A and the contour length L . The average values and the error bars of these parameters were determined by repeating 5 to 7 stretching experiments for each different situation. The error bars of the mechanical properties presented in the results are the standard deviations obtained from these sets of measurements. All the technical details about the sample preparation and the stretching procedure were discussed previously.^{12,13}

Microcalorimetry Experiments

Isothermal Titration Calorimetry (ITC) was used for providing thermodynamic information about the PEG-EtBr and DNA-EtBr systems, in order to evaluate if the PEG-EtBr affinity can change the quantity of EtBr bound to DNA for our experimental conditions. ITC measures the enthalpy change of the mixture upon addition of EtBr+PBS aqueous aliquots (50 μ L) in the DNA+PBS (or PEG+PBS) solutions. The apparent enthalpy of interaction $\Delta H_{ap - int}$ for PEG-EtBr or for DNA-EtBr complexes formation was measured as a function of the EtBr concentration at a microcalorimetric cell containing a fixed concentration of DNA (21.3 μM) or PEG (1% in mass). The DNA concentration used in the microcalorimetry was considerably higher than the one used in the tweezers' experiments in order to obtain accurate results with this technique. The fact that PEG is in much excess as compared to DNA (1% in mass corresponds to 1.5 mM of PEG 8000 coils) justifies the use of the different DNA concentrations in the two experimental techniques. For ITC analysis, we considered the enthalpy

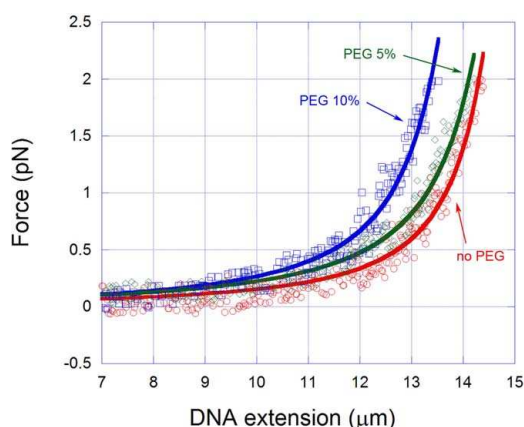


FIGURE 1 Typical force-extension curves for single bare DNA molecules for various PEG concentrations, obtained in the entropic regime ($F \leq 2$ pN), along with the fittings to the WLC model (solid lines). Observe that the curves are slightly different as PEG concentration increases, indicating that weak attractive DNA segment-segment interaction are present even before the onset of DNA ψ condensation⁷.

change observed (ΔH_{obs}) as the difference between the measured heat of EtBr titration in the DNA (or PEG) solution and in PBS solution. $\Delta H_{\text{ap}} - \text{int}$ was obtained by dividing ΔH_{obs} by the mole number of EtBr added in each injection. As the exact EtBr mole number binding to DNA or PEG is not known, we cannot calculate the exact molar enthalpy change of interaction, but only an apparent molar enthalpy change. Thus, $\Delta H_{\text{ap}} - \text{int}$ represents the enthalpy of complex formation, since the effect of EtBr dilution is excluded. If $\Delta H > 0$ for a complex formation, the process is endothermic and an enthalpically unfavorable interaction occur. On the other hand, $\Delta H < 0$, exothermic interaction, means that the complex formation is enthalpically favorable. The ITC experiments were performed with a CSC-4200 calorimeter (Calorimeter Science Corp.), and further instrumental details can be found in Ref. 14. The typical uncertainty in ΔH is ~ 0.2 $K_B T$ / molecule.

Results and Discussion

In this section we present and discuss the results obtained for bare DNA and DNA-intercalator complexes.

Single Bare DNA Molecules

Before adding any intercalator, it is fundamental to study the mechanical behavior of bare DNA when stretched in diluted PEG solutions, due to possible depletion-induced interactions and/or solvent thermodynamic activities changes.² We have performed measurements in the low force entropic regime in order to verify the influence of PEG on the contour and persistence lengths of the DNA molecule, as explained before.

In Figure 1 we show some force-extension curves for the bare DNA molecule under increasing PEG concentrations, measured in the

entropic regime ($F \leq 2$ pN), along with the fittings to the WLC model (solid lines).¹¹ Observe that the curves are slightly different as the PEG concentrations increases. This is evidenced by the apparent slight shortening of the DNA molecule, produced by the depletion-induced attractive DNA segment-segment interaction. This is of particular importance in our context since, so far, few works have focused on the early stages of polymer and salt induced (ψ or ψ) DNA condensation,^{15,16} which usually happens in a mixture containing DNA, low amounts of a high molecular weight flexible polymer and high ionic strength (simple salt): the DNA molecule undergoes a drastic reduction of its segment-spanned volume and turns into a dense, liquid-crystalline ordered structure. Moreover and mainly, this result suggests that, as far as volume exclusion interactions are concerned, PEG may be regarded as a neutral polymer, since depletion-induced attraction has an entropic origin.⁸ Further increase in the PEG amount in solution results in DNA ψ condensation.¹⁷ Since intercalation on monomolecular condensed DNA has already been reported,¹⁸ the experiments performed here are restricted to uncondensed DNA.

Figure 2 shows the typical behavior of the persistence (A) and contour (L) lengths as a function of PEG concentration (C_{PEG} , expressed by the mass fraction of PEG in the buffer solution), obtained for the same DNA molecule by changing the PEG concentration in the buffer solution. For convenience, the contour length data was normalized by the value obtained in the PBS buffer without any PEG ($L_0 \sim 16.5$ μm for λ -DNA). The persistence length A is constant within the experimental error bars, and the contour length L appears to exhibit a slight decrease as the PEG concentration increases. Since PEG is a neutral polymer that does not directly interact with DNA (as discussed above), the slight decrease of the contour length should be carefully interpreted. In fact, what we measure in DNA stretching experiments is the apparent value of the contour length, which in general, is different from the full contour length of the DNA chain if condensing agents are not present in solution.^{12,19} This is the case of PEG 8000, which strongly condenses the DNA molecules for sufficiently high concentrations ($>18\%$) in solutions with $[\text{NaCl}] = 150$ mM.^{17,20} For lower concentrations, such as those shown in Figure 2, albeit DNA condensation does not in fact occur, the stretching of the single molecule is performed in a crowded environment, where depletion interactions already started to play a role and therefore, higher forces are needed to fully stretch the DNA chain. Since we have used maximum forces of ~ 2 pN in the entropic regime, it is expected that the apparent contour length obtained by fitting our force curves decreases as the PEG concentration increases.

DNA-Intercalator Complexes

We have also investigated the interaction of the DNA molecule with two intercalators, Ethidium Bromide (EtBr) and GelRed (GR) in PEG solutions. Both compounds are largely used in molecular biology, especially in gel electrophoresis. Nevertheless, while most of the EtBr properties are well studied, the chemical structure of the GR dye is proprietary and has not officially been reported by the manufacturer yet. There are, however, strong experimental evidences that GR is a bis-intercalator synthesized by linking two EtBr molecules together.⁴

Investigating DNA interactions with intercalators in osmolyte-rich solutions in principle can give insights on how intercalators interact with DNA in the crowded intracellular environment. More important in our case, the results presented here show that intercalators can

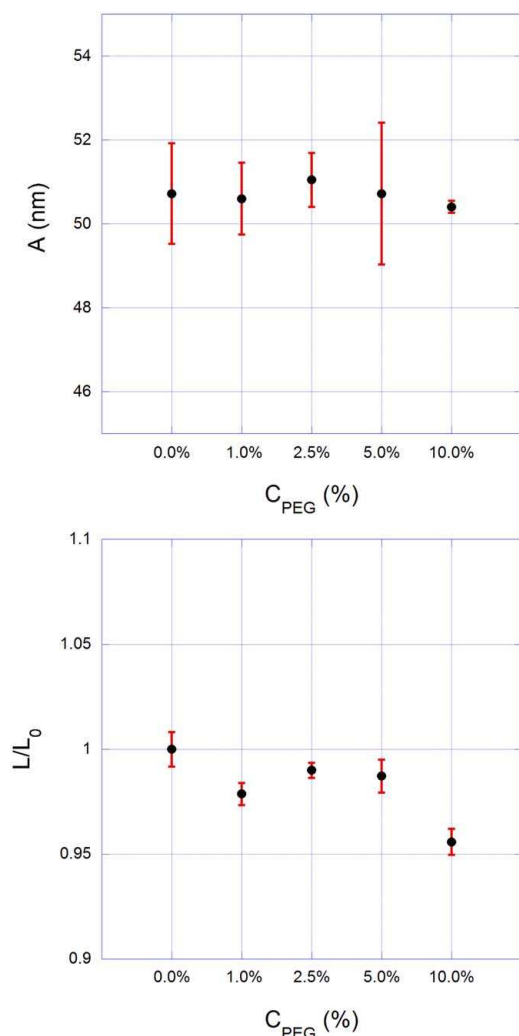


FIGURE 2 Persistence length A and relative contour length L/L_0 of a bare DNA molecule as a function of PEG 8000 concentration in the buffer. The persistence length is constant within the experimental error bars, and the measured apparent contour length appears to exhibit a slight decrease as the PEG concentration increases.

significantly interact with high molecular weight PEG, which interfere with the intercalation process.

The mechanical parameters of the DNA complexes formed with both EtBr and GR as a function of intercalator concentration in the PBS buffer without PEG were recently obtained.⁴ Figure 3 (black circles) shows the results for the DNA-EtBr complexes, while Figure 4 (black circles) shows the results for the DNA-GR complexes. Observe that, for our experimental conditions, the qualitative effect of the two

intercalators is the same: the persistence length increases until a certain critical concentration of the ligand is reached and then, decays abruptly, whereas the contour length increases monotonically as a function of the ligand concentration until a saturation value is reached. This behavior of the mechanical parameters were previously verified by us for other intercalators under similar experimental conditions.^{5,21} In particular, the behavior of the contour length is very well established and was reported by many different authors.^{22–25} The

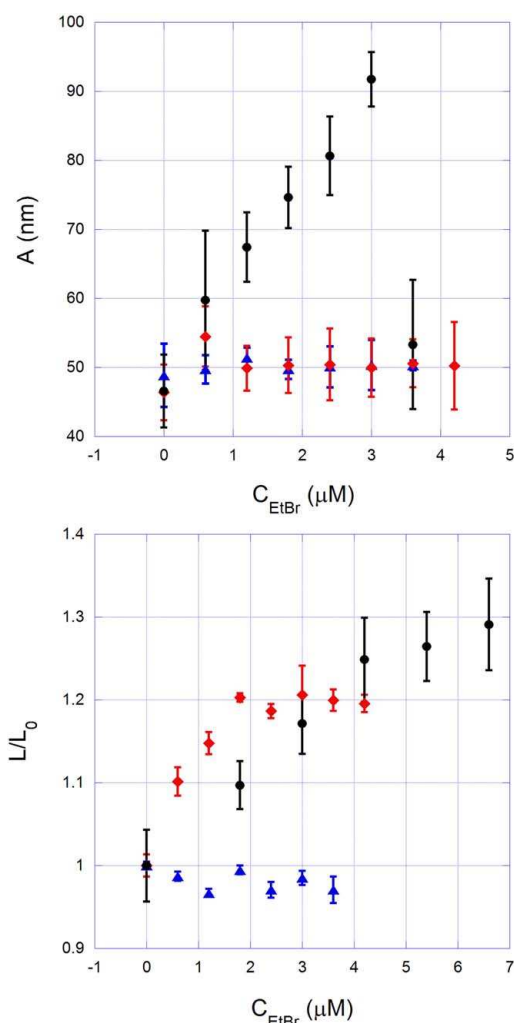


FIGURE 3 Persistence length A and relative contour length L/L_0 of DNA-EtBr complexes as a function of ligand concentration in the sample. Black circles: PBS buffer without PEG; red diamonds: PBS buffer with PEG at 1% in mass; blue triangles: PBS buffer with PEG at 5% in mass.

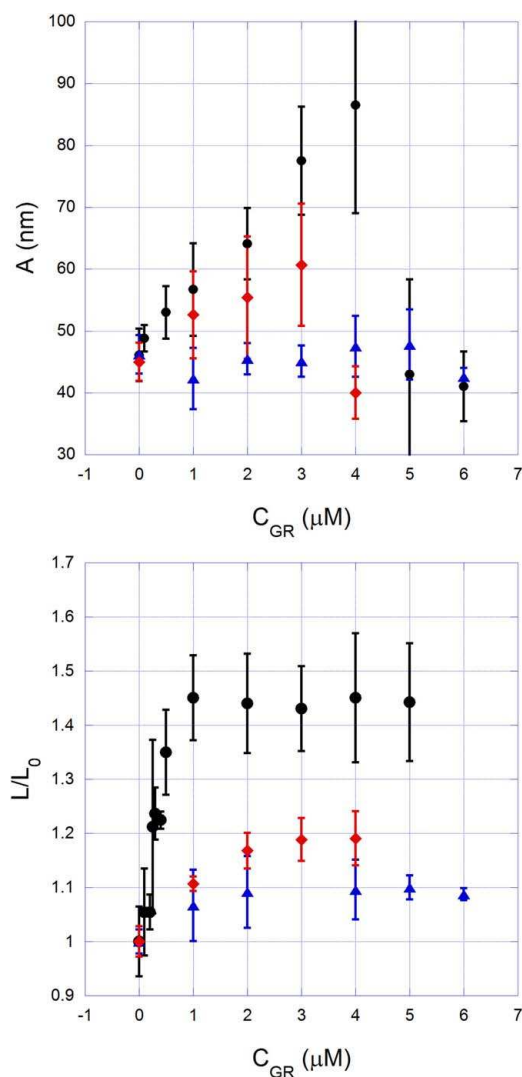


FIGURE 4 Persistence length A and relative contour length L/L_0 of DNA-GR complexes as a function of ligand concentration in the sample. Black circles: PBS buffer without PEG; red diamonds: PBS buffer with PEG at 1% in mass; blue triangles: PBS buffer with PEG at 5% in mass.

behavior of the persistence length, otherwise, is in general dependent on the experimental conditions and even on the technique used to perform the experiments, since the abrupt decrease of this parameter is related to partial DNA melting due to the pulling force.²⁶ In the present work, however, our aim is nothing but to use the changes in the DNA mechanical parameters obtained in the low force (entropic)

regime once low amounts of high molecular weight PEG are added to the buffer solution and then, infer changes in the biochemical equilibrium under study.

Figure 3 (red diamonds) also shows the results for DNA-EtBr complexes when adding a PEG concentration of 1% in mass in the buffer solution. This PEG concentration was maintained constant during the entire experiment, while changing the EtBr concentration. Figure 4 (red diamonds) shows the equivalent results for DNA-GR complexes. Observe that the addition of tiny amounts of PEG (1% in mass) to the buffer changes quantitatively the mechanical behavior of the DNA-intercalator complexes: both the persistence and contour lengths vary much less as compared to the situation without PEG (black circles), although the qualitative behavior appears to remain approximately the same one, especially in the case of GR. At such low concentration (1% in mass), we should not expect, in principle, PEG to have any direct or indirect effect on the intercalator binding, provided that this polymer is really a neutral one. In fact, volume exclusion and water effects are, in practice, negligible at such low concentration.^{2,27}

Finally, it is also shown in Figure 3 (blue triangles) and Figure 4 (blue triangles) the equivalent results for DNA-EtBr and DNA-GR complexes, respectively, when adding a PEG concentration of 5% in mass in the buffer solution. Observe now that the persistence length of both complexes remain constant within the error bars, and the contour lengths vary even less as compared to the situation when we had 1% of PEG in the buffer solution.

All these results were obtained by the following procedure. We start the experiments with bare DNA molecules in the PBS buffer. The first step is then to choose a particular bare DNA and stretch it a few times (5 to 7 times) in order to determine the mean values of the persistence and contour length by fitting the stretching curves to the WLC model, as detailed in Refs. 12 and 13. Then, we change the buffer solution in the sample, adding simultaneously the desired concentrations of both PEG and intercalator. After waiting the time necessary for the system to equilibrate (~ 20 minutes),^{4,18} we stretch again the same DNA molecule, obtaining the new values of the mechanical parameters which are presented in Figures 3 and 4.

We have also investigated the role of the order of addition of the ligands and co-solute in the results. To perform this task, we have repeated the same procedure used to obtain the results shown in Figures 3 and 4 for some DNA molecules under a few intercalator concentrations, but now adding firstly the intercalator and then PEG at 1% in mass in the sample. The purpose of such measurements was to investigate the effects of PEG on previously intercalated DNA. We have measured the mechanical properties of the DNA-intercalator complexes in this intermediate step before adding PEG, finding the same behavior suggested in Figures 3 and 4. For low concentrations, in fact, we found an increase of both persistence and contour lengths after adding the intercalator, and then a decrease of these parameters after adding PEG. For $C_{EtBr} = 1.2 \mu M$, for example, the persistence length of one of the complexes tested has increased from the bare DNA value (49 nm) to 65.3 nm when adding EtBr, and then decreased to 55 nm after adding PEG (maintaining the EtBr concentration in the buffer). For the same DNA molecule, the contour length has increased from $16.4 \mu m$ to $18.5 \mu m$ when adding EtBr, and then has decreased to $16.2 \mu m$ after the addition of PEG. For another DNA molecule tested and $C_{EtBr} = 2.4 \mu M$ the qualitative behavior is exactly the same: the persistence length has increased from 50.3 nm to

70.6 nm after adding EtBr, and then has decreased to 49.6 nm after adding PEG (at 1% in mass). The contour length of this molecule has increased from 16.8 μm to 18.9 μm when adding EtBr, and then has decreased to 16.9 μm after the addition of PEG. These results strongly suggest that the order of mixing of the two compounds (intercalator and PEG) does not change the general behavior of the mechanical properties shown in Figures 3 and 4.

The results synthesized in Figures 3 and 4, together with the discussion exposed in the above paragraph, can be readily explained on the basis of a significant interaction between PEG and the two intercalators. In fact, the physicochemical changes introduced by PEG in the DNA solution (macromolecular crowding and lowered water activity compared to diluted solutions) are not relevant for the PEG concentrations used in this work ($\leq 5\%$),^{3,27} and on the other hand, PEG notoriously enhances the solubility of hydrophobic amino-acids.²⁷ These results, taken together, leave no room to exclude the interaction between high molecular weight PEG and intercalator as the origin of the results observed in the stretching experiments. In order to clarify this issue we have performed microcalorimetry experiments to verify the PEG-EtBr and DNA-EtBr interactions as well as to determine the relative competition between DNA and PEG for the EtBr molecules under our experimental conditions. Since GR is composed basically by two EtBr molecules,⁴ it is expected that it interacts with PEG as well.

Figure 5 shows the apparent enthalpy of interaction $\Delta H_{\text{ap-int}}$ for the PEG-EtBr complexes formed in the absence (squares) and in the presence of DNA at 21.3 μM (circles). $\Delta H_{\text{ap-int}}$ is plotted against the total EtBr concentration in the microcalorimetric cell.

It was not possible to determine $\Delta H_{\text{ap-int}}$ for DNA-EtBr interaction because the heat measured was in the order of the microcalorimetric noise (0.2 K_BT/molecule). On the other hand, for the EtBr concentration range studied here, the PEG-EtBr interaction was exothermic, becoming less negative as the EtBr concentration increases, due to a decrease in the number of free PEG interaction sites. $\Delta H_{\text{ap-int}}$ for the PEG-EtBr complex formation process (without DNA presence) changes from -40 kJ/mol (-0.08 K_BT/monomer in average) at low EtBr concentrations to -28 kJ/mol (-0.05 K_BT/monomer in average) for higher EtBr concentrations, suggesting that molecular dispersive interactions (and not only hydrophobic interactions) are the driving power for PEG-EtBr interaction.

In order to determine quantitatively the competition between DNA and PEG for EtBr molecules, $\Delta H_{\text{ap-int}}$ for the PEG-EtBr interaction was also determined in the presence of DNA at 21.3 μM and compared with the result obtained in the absence of the biopolymer (see Figure 5). The idea is that the addition of EtBr molecules in the DNA/PEG mixture will make less intercalator molecules disposable to interact with PEG because some of them will intercalate in the DNA molecules. As the heat released in the DNA-EtBr binding at the concentrations used in the experiment is negligible ($\Delta H_{\text{ap-int}} = 0$) we can propose that the ratio $f = \Delta H_{\text{ap-int}}(\text{DNA presence})/\Delta H_{\text{ap-int}}(\text{DNA absence})$ express the fraction of EtBr molecules that remains interacting with PEG when DNA is present. Independent of the EtBr concentration, we found that $f \sim 0.16$, which shows that around 84% of the EtBr molecules which were interacting with PEG in DNA absence are released to bind DNA when this biopolymer is present in solution.

In addition, the fraction $f = \Delta H_{\text{ap-int}}(\text{DNA presence})/\Delta H_{\text{ap-int}}(\text{DNA absence})$ can be directly compared to the optical tweezers data, since the ratio between the saturation values of the normalized contour length should give the same fraction. In fact, at saturation

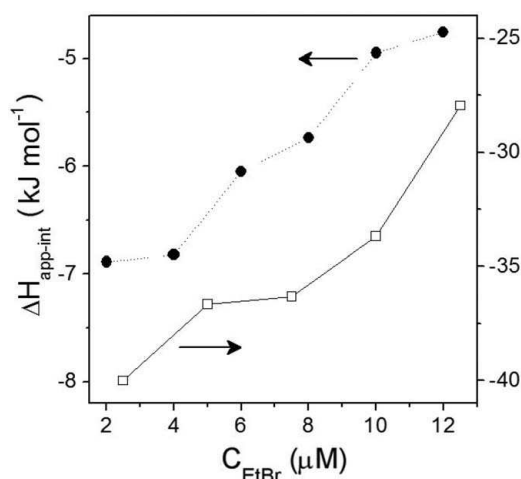


FIGURE 5 Apparent enthalpy of interaction $\Delta H_{\text{ap-int}}$ for the PEG-EtBr complexes formed in the absence (squares, vertical axis at right position) and in the presence of DNA at 21.3 μM (circles, vertical axis at left position). The ratio $f = \Delta H_{\text{ap-int}}(\text{DNA presence})/\Delta H_{\text{ap-int}}(\text{DNA absence})$ express the fraction of EtBr molecules that remains interacting with PEG when DNA is present. Independent of the EtBr concentration, we found that $f \sim 0.16$, which shows that around 84% of EtBr molecules which were initially interacting with PEG in DNA absence are released to intercalate into DNA when the biopolymer is present in the solution.

EtBr increases the contour length of λ -DNA by 39% for our experimental conditions.⁵ When PEG 1% is present, however, the data of Figure 3 shows that such increase is only $\sim 20\%$ at saturation. Therefore, at saturation we have $[L/L_0](\text{PEG } 1.0\%)/[L/L_0](\text{PEG } 0.0\%) \sim 1.20/1.39 = 86\%$, which means that $\sim 14\%$ of the EtBr molecules previously bound to DNA are released to bind PEG when this polymer is added at a concentration of 1% in mass in the solution. Such estimation is in excellent agreement with the result obtained from the microcalorimetry ($f \sim 16\%$).

Finally, we wish to suggest the following physical picture for the interaction of hydrophobic molecules such as the intercalators used in this work and high molecular weight PEG: the entropy of the monomers comprising the PEG coil is lower than the entropy of the unconnected (free) monomers in solution and so, interactions dominate the phase behavior of polymer solution.²⁸ Thus, notwithstanding ethylene-glycol oligomers have little or negligible interaction with the intercalators, the same collection of monomers now gathered together in a bigger polymer coil can interact significantly. We can also reformulate what was said above taking into account that the monomers volume fraction ϕ inside an isolated polymer coil in a θ solvent scales with the number of monomers (N) as $\phi \sim 1/N^{1/2}$.²⁹

Therefore, although the average concentration of PEG monomers in solution may be as low as 1%, the (local) monomers volume fraction inside an isolate coil may be much higher than the global average concentration due to chain connectivity. In our case, $N = 181$ and ϕ

is roughly one order of magnitude higher than the overall average monomers concentration in solution. Furthermore, taking into account the nondirectional and near-additive³⁰ behavior of dispersion forces, a very weak attraction at the single monomer level may appear much stronger at the polymer level and, to a certain extent, the small hydrophobic ligands may remain “trapped inside the polymer coil”. This hypothesis would fully explain our experimental results.

CONCLUSIONS

We have investigated the mechanical behavior of single bare DNA molecules and single DNA-intercalator complexes in PEG solutions. For bare DNA, it was found that PEG concentrations as high as 10% in mass just slightly change the basic mechanical properties (persistence and contour lengths) measured in the low-force entropic regime. Such data reveals the occurrence of weak (but measurable) depletion interactions among the DNA segments induced by the flexible polymer, whose behavior concerning the polyelectrolyte may be assumed as “neutral”, since depletion interactions are essentially entropic. On the other hand, as long as the DNA-intercalator binding equilibrium is concerned, we have found both by optical tweezers and microcalorimetry experiments that high molecular weight PEG 8000 significantly interacts with EtBr even at concentrations as low as 1% in mass and, therefore, its usage as a “neutral osmolyte” to modulate DNA-intercalators binding through the activity of solution components must be done with caution.

REFERENCES

1. Ellis, R. *Trends Biochem Sci* 2001, 26, 3940–3946.
2. Parsegian, V. A.; Rand, R. P.; Rau, D. C. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, 97, 3987–3992.
3. Nakano, S. D.; Miyoshi, Sugimoto, N. *Chem Rev* 2014, 114, 2733–2758.
4. Crisafuli, F. A. P.; Ramos, E. B.; Rocha, M. S. *Eur Biophys J* 2015, 44, 1–7.
5. Rocha, M. S.; Ferreira, M. C.; Mesquita, O. N. *J Chem Phys* 2007, 127, 105108.
6. Castelnovo, M.; Gelbart, W. M. *Macromolecules* 2004, 37, 3510–3517.
7. de Vries, R. *Biophys J* 2001, 80, 1186–1194.
8. Asakura, S.; Oosawa, F. *J Chem Phys* 1954, 22, 1255–1256.
9. Chaires, J. B.; Dattagupta, N.; Crothers, D. M. *Biochemistry* 1982, 21, 3933–3940.
10. Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. *Molecular Biology of the Cell*, 5th ed.; Garland Science: New York, 2008.
11. Marko, J. F.; Siggia, E. D. *Macromolecules* 1995, 28, 8759–8770.
12. Crisafuli, F. A. P.; Cesconetto, E. C.; Ramos, E. B.; Rocha, M. S. *Integr Biol* 2012, 2012, 568–574.
13. Cesconetto, E. C.; Junior, F. S. A.; Crisafuli, F. A. P.; Mesquita, O. N.; Ramos, E. B.; Rocha, M. S. *Phys Chem Chem Phys* 2013, 15, 11070–11077.
14. Barbosa, A. M.; Santos, I. J. B.; Ferreira, G. M. D.; Silva, M. C. H.; Teixeira, A. V. N.; Silva, L. H. M. *J Phys Chem B* 2010, 114, 11967–11974.
15. Ojala, H.; Ziedaite, G.; Wallin, A. E.; Bamford, D. H.; Hægström, E. *Eur Biophys J* 2014, 43, 71–79.
16. Cheng, C.; Jia, J. L.; Ran, S. Y. *Soft Matt* 2015, 11, 3927–3935.
17. Ramos, E. B.; de Vries, R.; Neto, J. R. *J Phys Chem B* 2005, 109, 23661–23665.
18. Rocha, M. S.; Cavalcante, A. G.; Silva, R.; Ramos, E. B. *J Phys Chem B* 2014, 118, 4832–4839.
19. Silva, E. F.; Ramos, E. B.; Rocha, M. S. *J Phys Chem B* 2013, 117, 7292–7296.
20. Vasilevskaya, V. V.; Khokhlov, A. R.; Matsuzawa, Y.; Yoshikawa, K. *J Chem Phys* 1995, 102, 6595–6602.
21. Reis, L. A.; Ramos, E. B.; Rocha, M. S. *J Phys Chem B* 2013, 117, 14345–14350.
22. Sischka, A.; Toensing, K.; Eckel, R.; Wilking, S. D.; Sewald, N.; Rios, R.; Anselmetti, D. *Biophys J* 2005, 88, 404–411.
23. Fritzsche, H.; Triebel, H.; Chaires, J. B.; Dattagupta, N.; Crothers, D. M. *Biochemistry* 1982, 21, 3940–3946.
24. Qu, X.; Chaires, J. B. *J Am. Chem. Soc* 2001, 123, 1–6.
25. Nardo, L.; Bondani, M.; Andreoni, A. *Photochem Photobiol* 2008, 84, 101–111.
26. Bazoni, R. F.; Lima, C. H. M.; Ramos, E. B.; Rocha, M. S. *Soft Matt* 2015, 11, 4306–4314.
27. Minton, A. P. *Mol Cell Biochem* 1983, 55, 119–140.
28. Hill, T. L. *An Introduction to Statistical Thermodynamics*, 1st ed.; Addison-Wesley Educational Publishers Inc, 1960.
29. de Gennes, P. G. *Scaling Concepts in Polymer Physics*, 1st ed.; Cornell University Press: Oxford, 1979.
30. Israelachvili, J. *Intermolecular and Surface Forces*, 3rd ed.; Academic Press Limited: Oxford, 1992.

Reviewing Editor: Nils Walter

Referências Bibliográficas

- [1] A. Ashkin, “*Acceleration and trapping of particles by radiation pressure*”, Phys. Rev. Lett. **24** (4), 156-159 (1970).
- [2] A. Ashkin, “*Atomic-beam deflection by resonance-radiation pressure*”, Phys. Rev. Lett. **25** (19), 1321-1324 (1970).
- [3] A. Ashkin, J. M. Dziedzic, J. E. Bjorkholm, and S. Chu, “*Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles*”, Optics Letters **11** (5), 288-290 (1986).
- [4] A. Ashkin and J. M. Dziedzic, “*Optical trapping and manipulation of viruses and bacterias*”, Science **235** (4795), 1517-1520 (1987).
- [5] A. Ashkin, J. M. Dziedzic and T. Yamane, “*Optical trapping and manipulation of single cells using infrared laser beams*”, Nature **330** (6150), 769-771 (1987).
- [6] J. Sleep, D. Wilson, R. Simmons and W. Gratzner, “*Elasticity of the red cell membrane and its relation to hemolytic disorders: an optical tweezers study*”, Biophys. J., **77**, 3085-3095 (1999).
- [7] J. Dai and M. P. Sheetz, “*Membrane Tether Formation from Blebbing Cells*”, Biophys. J., **77**, 3363-3370 (1999).
- [8] R. W. Steubing, S. Cheng, W. H. Wright, Y. Numajiri and M. W. Berns, “*Laser induced cell fusion in combination with optical tweezers: the laser cell fusion trap*”, Cytometry **12** (6), 505-510 (1991).

Referências Bibliográficas

- [9] H. Liang, W. H. Wright, S. Cheng, W. He and M. W. Berns, “*Micromanipulation of chromosomes in PtK2 cells using laser microsurgery (optical scalpel) in combination with laser-induced*”, Exp. Cell. Res. **204** (1), 110-120 (1993).
- [10] L. Bai, T. J. Santangelo and M. D. Wang, “*Single-molecule analysis of RNA polymerase transcription*”, Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. **35**, 343-360 (2006).
- [11] A. Ashkin, “*Optical trapping and manipulation of neutral particles using lasers*”, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**, 4853-4860 (1997).
- [12] D. G. Grier, “*A revolution in optical manipulation*”, Nature **424** (6950), 810-816 (2003).
- [13] F. Ritort, “*Single-molecule experiments in biological physics: methods and applications*”, J. Phys. Condens. Matter **18**, R531-R583 (2006).
- [14] J. R. Moffitt, Y. R. Chemla, S. B. Smith and C. Bustamante, “*Recent advances in optical tweezers*”, Annu. Rev. Biochem. **77**, 205-228 (2008).
- [15] K. Nakamoto, M. Tsuboi and G. D. Strahan, “*Drug-DNA interactions: structure and spectra*”, 1st ed., John Wiley & Sons, New Jersey (2008).
- [16] M. L. Kopka, D. S. Goodsell, I. Baikalov, K. Grzeskowiak, D. Cascio and Richard E. Dickerson, “*Crystal structure of a covalent DNA-drug adduct: anthramycin bound to C-C-A-A-C-G-T-T-G-G and a molecular explanation of specificity*”, Biochemistry **33** (46), 13593-13610 (1994).
- [17] A. S. Biebricher, I. Heller, R. F. H. Roijmans, T. P. Hoekstra, E. J. G. Peterman and G. J. L. Wuite, “*The impact of DNA intercalators on DNA and DNA-processing enzymes elucidated through force-dependent binding kinetics*”, Nature Commun. **6** (7304), 1-12 (2015).
- [18] J. C. Soler, M. Manosas, S. Frutos, J. T. Puche, F. Albericio and F. Ritort, “*Single-molecule kinetics and footprinting of DNA bis-intercalation: the paradigmatic case of Thiocoraline*”, Nucl. Acids Res. **43** (5), 2767-2779 (2015).

Referências Bibliográficas

- [19] R. Osathanondh, D. P. Goldstein and G. B. Pastorfide, “*Actinomycin D as the primary agent for gestational trophoblastic disease*”, *Cancer* **36**, 863-866 (1975).
- [20] G. J. D’Angio, A. E. Evans, N. Breslow, B. Beckwith, H. Bishop, P. Feigl, W. Goodwin, L. L. Leape, L. F. Sinks, W. Sutow, M. Tefft and J. Wolff, “*The treatment of Wilms’ tumor*”, *Cancer* **38**, 633-646 (1976).
- [21] D. Pinkel and J. Pickren, “*Rhabdomyosarcoma in Children*”, *J. Am. Med. Assoc.*, **175** (4), 293-298 (1961).
- [22] C. Aaij, P. Borst, “*The gel electrophoresis of DNA*”, *BBA - Nucleic Acids and Protein Synthesis* **269** (2), 192-200 (1972).
- [23] Q. Huang, L. Baum and W. L. Fu, “*Simple and practical staining of DNA with gelred in agarose gel electrophoresis*”, *Clin. Lab.* **56**, 149-152 (2010).
- [24] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, D. Morgan, M. Raff, K. Roberts and P. Walter, “*Molecular Biology of the Cell*”, 6th ed., Garland Science, New York (2014).
- [25] S. B. Smith, Y. Cui, C. Bustamante, “*Overstretching B-DNA: the elastic response of individual double-stranded and single-stranded DNA molecules*”, *Science* **271** (5250), 795-799 (1996).
- [26] J. F. Marko and E. D. Siggia, “*Stretching DNA*”, *Macromolecules* **28** (26), 8759-8770 (1995).
- [27] M. S. Rocha, “*Pinças ópticas: experimento e teoria*”, Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil (2004).
- [28] M. S. Rocha, “*Pinças ópticas: experimento, teoria e aplicações no estudo das interações DNA-fármacos*”, Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil (2008).
- [29] A. Mazolli, P. A. M. Neto and H. M. Nussenzveig, “*Theory of trapping forces in optical tweezers*”, *Proc. R. Soc. Lon. A* **459** (2040), 3021-3041 (2003).

Referências Bibliográficas

- [30] P. A. M. Neto and H. M. Nussenzveig, “*Theory of optical tweezers*”, Europhys. Lett. **50** (5), 702-708 (2000).
- [31] R. S. Dutra, N. B. Viana, P. A. Maia Neto, and H. M. Nussenzveig, “*Absolute calibration of optical tweezers including aberrations*”, Appl. Phys. Lett. **100**, 131115 (2012).
- [32] R. S. Dutra, N. B. Viana, P. A. Maia Neto, and H. M. Nussenzveig, “*Absolute calibration of forces in optical tweezers*”, Phys. Rev. A **90**, 013825 (2014).
- [33] H. Faxen, “*The resistance against the movement of a rigour sphere in viscous fluids, which is embedded between two parallel layered barriers*”, Ann. Phys. **68** (10), 89-119 (1922).
- [34] N. B. Vianna, “*Pinças ópticas e aplicações*”, Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil (2002).
- [35] I. D. Vladescu, M. J. McCauley, M. E. Nuñez, I. Rouzina and M. C. Williams, “*Quantifying force-dependent and zero force DNA intercalation by single - molecule stretching*” Nat. Methods **4**, 517-522 (2007).
- [36] W. Anderson, D. Kozak, V. A. Coleman, Å. K. Jämting and M. Trau “*A comparative study of submicron particle sizing platforms: accuracy, precision and resolution analysis of polydisperse particle size distributions*” J. Colloid Interface Sci. **405** 322-330 (2013).
- [37] R. Pecora, “*Dynamic light scattering: applications of photon correlation spectroscopy*”, Plenum Press, New York (1985).
- [38] J. B. Berne and R. Pecora, “*Dynamic light scattering with applications to Chemistry, Biology and Physics*”, John Wiley & Sons, New York (2000).
- [39] <http://mathworld.wolfram.com/LorentzianFunction.html>
- [40] N. A. Clark, J. H. Lunacek and G. B. Benedek, “*A study of brownian motion using light scattering*”, Am. J. Phys. **38** (5), 575-585 (1970).

Referências Bibliográficas

- [41] D. E. Koppel, “*Analysis of macromolecular polydispersity in intensity correlation spectroscopy: the method of cumulants*”, J. Chem. Phys. **57** (11), 4814-4820 (1972).
- [42] J. E. Ladbury and B. Z. Chowdhry, “*Sensing the heat: the application of isothermal titration calorimetry to thermodynamic studies of biomolecular interactions*”, Chem. Biol. **3** (10), 791-801 (1996).
- [43] P. C. Weber and F. R. Salemme, “*Applications of calorimetric methods to drug discovery and the study of protein interactions*”, Curr. Opin. Struct. Biol. **13** (1), 115-121 (2003).
- [44] J. E. Ladbury and M. L. Doyle, “*Biocalorimetry 2: applications of calorimetry in the biological sciences*”, John Wiley & Sons, New York (2004).
- [45] A. Kessler, B. Zeeb, B. Kranz, O. Menéndez-Aguirre, L. Fischer, J. Hinrichs and J. Weiss, “*Isothermal titration calorimetry as a tool to determine the thermodynamics of demicellization processes*”, Rev. Sci. Instrum. **83** (105104), 1-5 (2012).
- [46] T. Wiseman, S. Williston, J. F. Brandts and L. N. Lin, “*Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter*”, Anal. Biochem. **179** (1), 131-137 (1989).
- [47] F. W. Sears and G. L. Salinger, “*Thermodynamics, Kinetic Theory and Statistical Thermodynamics*”, 3rd ed., Addison-Wesley, Reading (1982).
- [48] H. B. Callen, “*Thermodynamics and an Introduction to Themostatistics*”, 2nd ed., John Wiley & Sons, Singapore (1985).
- [49] U. Hollstein, “*Actinomycin. Chemistry and mechanism of action*”, Chemical Reviews **74** (6), 625-652 (1974).
- [50] H. B. Woodruff and S. A. Waksman, “*Bacteriostatic and bacteriocidal substances produced by soil actinomycetes*”, Proc. Soc. Exper. Biol. **45**, 609-614 (1940).

Referências Bibliográficas

- [51] D. J. Patel, S. A. Kozlowski, J. A. Rice, C. Broka and K. Itakura, “*Mutual interaction between adjacent dG.dC actinomycin binding sites and dA.dT netropsin binding sites on the self-complementary d(C-G-C-G-A-A-T-T-C-G-C-G) duplex in solution*”, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **78**, 7281-7284 (1981).
- [52] W. Müller and D. M. Crothers, “*Studies of the binding of Actinomycin and related compounds to DNA*”, J. Mol. Biol. **35**, 251-290 (1968).
- [53] H. M. Sobell, S. C. Jain, T. D. Sakore and C. E. Nordman, “*Stereochemistry of Actinomycin-DNA binding*”, Nat. New Biol. **231**, 200-205 (1971).
- [54] F. Takusagawa, M. Dabrow, S. Neidle and H. M. Berman, “*The structure of a pseudo intercalated complex between Actinomycin and the DNA binding sequence d(GpC)*”, Nature **296**, 466-469 (1982).
- [55] H. Fritzsche, H. Triebel, J. B. Chaires, N. Dattagupta and D. 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).
- [56] D. Reha, M. Kabelac, F. Ryjacek, J. Sponer, J. E. Sponer, M. Elstner, S. Suhai and P. Hobza, “*Intercalators. 1. Nature of stacking interactions between intercalators (Ethidium, Daunomycin, Ellipticine, and 4',6-Diaminide-2-phenylindole) and DNA base Pairs. Ab initio Quantum Chemical, Density Functional Theory, and Empirical Potential Study*”, J. Am. Chem. Soc., **124** (13), 3366-3376 (2002).
- [57] A. Sischka, K. Toensing, R. Eckel, S. D. Wilking, N. Sewald, R. Ros and D. Anselmetti, “*Molecular mechanisms and kinetics between DNA and DNA binding ligands*”, Biophys. J., **88**, 404-411 (2005).
- [58] C. Zimmer and U. Wähnert, “*Nonintercalating DNA-binding ligands: specificity of the interaction and their use as tools in biophysical, biochemical and biological investigations of the genetic material*”, Prog. Biophys. Mol. Biol., **47** (1), 31-112 (1986).

Referências Bibliográficas

- [59] T. D. Schneider, “*Strong minor groove base conservation in sequence logos implies DNA distortion or base flipping during replication and transcription initiation*”, Nucleic Acids Res. **29** (23), 4881-4891 (2001).
- [60] I. Amitani, B. Liu, C. C. Dombrowski, R. J. Baskin and S. C. Kowalczykowski, “*Watching individual proteins acting on single molecules of DNA*”, Methods Enzymol. **472**, 261-291 (2010).
- [61] J. D. Watson, T. A. Baker, S. P. Bell, A. Gann, M. Levine and R. Losick, “*Molecular Biology of the Gene*”, 5^a Ed., Person Education, (2004).
- [62] M. D. Wang, H. Yin, R. Landick, J. Gelles and S. M. Block, “*Stretching DNA with optical tweezers*”, Biophys. J. **72** (3), 1335-1346 (1997).
- [63] T. Strick, J. F. Allemand, V. Croquette and D. Bensimon, “*Twisting and stretching single DNA molecules*”, Prog. in Biophys. and Mol. Biol. **74**, 115-140 (2000).
- [64] L. Siman, I. S. S. Carrasco, J. K. L. da Silva, M. C. de Oliveira, M. S. Rocha and O. N. Mesquita, “*Quantitative assessment of the interplay between DNA elasticity and cooperative binding of ligands*”, Phys. Rev. Lett., **109**, 248103 (2012).
- [65] A. V. Hill, “*The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves*”, J. Physiol. **40**, 4-7 (1910).
- [66] M. Daune, “*Molecular Biophysics*”, 1st ed., Oxford University Press, Oxford (1999).
- [67] M. S. Rocha, A. D. Lúcio, S. S. Alexandre, R. W. Nunes, and O. N. Mesquita, “*DNA-psoralen: Single-molecule experiments and first principles calculations*”, Appl.Phys. Lett. **95**, 253703 (2009).
- [68] M. S. Rocha, “*Modeling the entropic structural transition of DNA complexes formed with intercalating drugs*”, Phys. Biol. **6**, 036013 (2009).

Referências Bibliográficas

- [69] T. Paramanathan, I. Vladescu, M. J. McCauley, I. Rouzina and M. C. Williams, “*Force spectroscopy reveals the DNA structural dynamics that govern the slow binding of Actinomycin D*”, Nucleic Acids Res. **40** (11), 4925-4932 (2012).
- [70] A. L. Galo, J. R. Neto, D. P. Brognaro, R. C. Caetano, F. P. Souza and M. F. Colombo, “*The influence of solutes on the enthalpy/entropy change of the Actinomycin D binding to DNA: hydration, energy compensation and long-range deformation on DNA*”, J. Phys. Chem. B **115** (28), 8883-8890 (2011).
- [71] J. R. Neto and M. F. Colombo, “*Water regulation of Actinomycin-D binding to DNA: the interplay among drug affinity, DNA long-range conformation and hydration*”, Biopolymers **53**, 46-59 (2000).
- [72] F. Sha and F. M. Chen, “*Actinomycin D binds strongly to d(CGACGACG) and d(CGTCTGTCG)*”, Biophys. J. **79** (4), 2095-2104 (2000).
- [73] J. Goodisman, R. Reh fuss, B. Ward and J. C. Dabrowiak, “*Site-specific binding constants for Actinomycin D on DNA determined from footprinting studies*”, Biochemistry **31** (4), 1046-1058 (1992).
- [74] J. B. Chaires, N. Dattagupta, and D. M. Crothers, “*Studies on Interaction of Anthracycline Antibiotics and Deoxyribonucleic Acid: Equilibrium Binding Studies on Interaction of Daunomycin with Deoxyribonucleic Acid*”, Biochemistry **21** (17), 3933-3940 (1982).
- [75] F. A. P. Crisafuli, E. C. Cesconetto, E. B. Ramos and M. S. Rocha, “*DNA - cisplatin interaction studied with single molecule stretching experiments*”, Integr. Biol. **4**, 568-574 (2012).
- [76] S. G. Chaney, S. L. Campbell, B. Temple, E. Bassett, Y. Wu and M. Faldu, “*Protein interactions with platinum-DNA adducts: from structure to function*”, J. Inorg. Biochem. **98**, 1551-1559 (2004).

Referências Bibliográficas

- [77] F. A. P. Crisafuli, E. C. Cesconetto, E. B. Ramos and M. S. Rocha, “*DNA - cisplatin binding mechanism peculiarities studied with single molecule stretching experiments*”, Appl. Phys. Lett. **100**, 083701 (2012).
- [78] Biotium, “*Safety Report of GelRed and GelGreen. Nucleic Acid Detection Technologies*”, <http://www.biotium.com> (2013).
- [79] J. S. Hur, E. S. G. Shaqfeh, H. P. Babcock, D. E. Smith, and S. Chu, “*Dynamics of dilute and semidilute DNA solutions in the start-up of shear flow*”, Journal of Rheology **45** (421), (2001).
- [80] M. S. Rocha, M. C. Ferreira, and O. N. Mesquita, “*Transition on the entropic elasticity of DNA induced by intercalating molecules*”, J. Chem. Phys. **127**, 105108 (2007).
- [81] L. A. Reis, E. B. Ramos, and M. S. Rocha, “*DNA Interaction with Diaminobenzidine Studied with Optical Tweezers and Dynamic Light Scattering*”, J. Phys. Chem. B **117** (46), 14345-14350 (2013).
- [82] I. Tessmer, C. G. Baumann, G. M. Skinner, J. E. Molloy, J. G. Hoggett, S. J. B. Tendler and S. Allen, “*Mode of drug binding to DNA determined by optical tweezers force spectroscopy*”, J. of Mod. Opt. **50** (10), 1627-1636 (2003).
- [83] V. Cassina, D. Seruggia, G. L. Beretta, D. Salerno, D. Brogioli, S. Manzini, F. Zunino and F. Mantegazza, “*Atomic force microscopy study of DNA conformation in the presence of drugs*”, Eur. Biophys. J. **40** (1), 59-68 (2010).
- [84] N. Kaji, M. Ueda and Y. Baba, “*Direct measurement of conformational changes on DNA molecule intercalating with a fluorescence dye in an electrophoretic buffer solution by means of atomic force microscopy*”, Electrophoresis **22** (16), 3357-3364 (2001).
- [85] C. U. Murade, V. Subramaniam, C. Otto, and Martin L. Bennink, “*Interaction of Oxazole Yellow Dyes with DNA Studied with Hybrid Optical Tweezers and Fluorescence Microscopy*”, Biophys. J. **97**, 835-843 (2009).

Referências Bibliográficas

- [86] J. Lipfert, S. Klijnhout and N. H. Dekker, “*Torsional sensing of small-molecule binding using magnetic tweezers*”, Nucl. Acids Res. **38** (20), 7122-7132 (2010).
- [87] R. F. Bazoni, C. H. M. Lima, E. B. Ramos and M. S. Rocha, “*Force-dependent persistence length of DNA-intercalator complexes measured in single molecule stretching experiments*”, Soft Matter **11**, 4306-4312 (2015).
- [88] E. F. Silva, E. B. Ramos, and M. S. Rocha, “*DNA interaction with Hoechst 33258: stretching experiments decouple the different binding modes*”, J. Phys. Chem. B **117**, 37292-7296 (2013).
- [89] J. D. McGhee and P. 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*”, J. Mol. Biol. **86**, 469-489 (1974).
- [90] B. Gaugain, J. Barbet, N. Capelle, B. P. Roques and J. B. L. Pecq “*DNA Bifunctional Intercalators. 2. Fluorescence Properties and DNA Binding Interaction of an Ethidium Homodimer and an Acridine Ethidium Heterodimer*”, Biochemistry **17** (24), 5078-5088 (1978).
- [91] K. Günther, M. Mertig and R. Seidel “*Mechanical and structural properties of YOYO-1 complexed DNA*”, Nucleic Acids Res. **38** (19), 6526-6532 (2010).
- [92] T. Berge, N. S. Jenkins, R. B. Hopkirk, M. J. Waring, J. M. Edwardson and R. M. Henderson “*Structural perturbations in DNA caused by bis-intercalation of ditercalinium visualised by atomic force microscopy*”, Nucleic Acids Res. **30** (13), 2980-2986 (2002).
- [93] M. Maaloum, P. Muller and S. Harlepp “*DNA-intercalator interactions: structural and physical analysis using atomic force microscopy in solution*”, Soft Matter **9**, 11233-11240 (2013).
- [94] C. Garbay-Jaureguiberry , P. Laugâa, M. Delepierre, S. Laalami, G. Muzard, J. B. L. Pecq and B. P. Roques “*DNA bis-intercalators as new anti-tumour agents:*

Referências Bibliográficas

- modulation of the anti-tumour activity by the linking chain rigidity in the ditercalinium series*", Anticancer Drug Des. **1** (4), 323-335 (1987).
- [95] H. Fu , H. Chen, C.G. Koh and C.T. Lim "*Effects of magnesium salt concentrations on B-DNA overstretching transition*", Eur. Phys. J. E **29**,45-49 (2009).
- [96] K. Yoshikawa, Y. Matsuzawa, K. Minagawa, M. Doi and M. Matsumoto, "*Opposite effect between intercalator and minor groove binding drug on the higher order structure of DNA as is visualized by fluorescence microscopy*", Biochem. Biophys. Res. Commun. **188** (3), 1274-1279 (1992).
- [97] S. R. Quake, H. Babcock and S. Chu, "*The dynamics of partially extended single molecules of DNA*", Nature **388** (10), 151-154 (1997).
- [98] J. M. Harris, "*Poly(Ethylene Glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications*", Springer, New York.
- [99] V. A. Parsegian, R. P. Rand, and D. C. Rau, "*Osmotic stress for the direct measurement of intermolecular forces*", Meth. Enzymol. **127**, 400-416 (1986).
- [100] A. Eliassi and H. Modarress, "*Measurement of activity of water in aqueous Poly(ethylene glycol) solutions (effect of excess volume on the Flory-Huggins χ -Parameter)*", J. Chem. Eng. Data **44**, 52-55 (1999).
- [101] V. V. Vasilevskaya, A. R. Khokhlov, Y. Matsuzawa, and K. Yoshikawa, "*Collapse of single DNA molecule in poly(ethylene glycol) solutions*", J. Chem. Phys. **102** (16), 6595-6602 (1995).
- [102] E. B. Ramos, R. de Vries and J. R. Neto, "*DNA ψ -condensation and reentrant decondensation: effect of the PEG degree of polymerization*", J. Phys. Chem. B **109** (49), 23661-23665 (2005).
- [103] M. S. Rocha, A. G. Cavalcante, R. Silva, and E. B. Ramos, "*On the effects of intercalators in DNA condensation: a force spectroscopy and gel electrophoresis study*", J. Phys. Chem. B **118** (18), 4832-4839 (2014).

Referências Bibliográficas

- [104] S. I. Nakano, D. Miyoshi and N. Sugimoto, “*Effects of molecular crowding on the structures, interactions and functions of nucleic acids*”, Chem. Rev. **114** (5), 2733-2758 (2014).
- [105] V. A. Parsegian, R. P. Rand, and D. C. Rau, “*Osmotic stress, crowding, preferential hydration, and binding: a comparison of perspectives*”, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **97**, 3987-3992 (2000).
- [106] S. Asakura and F. Oosawa, “*On interaction between two bodies immersed in a solution of macromolecules*”, J. Chem. Phys. **22**, 1255-1256 (1954).
- [107] F. A. P. Crisafuli, E. B. Ramos and M. S. Rocha, “*Characterizing the interaction between DNA and GelRed fluorescent stain*”, Eur. Biophys. J. **44** (1), 1-7 (2015).
- [108] W. D. Wilson, F. A. Tanious, H. J. Barton, R. L. Jones, K. Fox, R. L. Wydra, L. Strekowski, “*DNA sequence dependent binding modes of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)*”, Biochemistry **29** (36), 8452-8461 (1990).
- [109] L. Nardo, M. Bondani, A. Andreoni, “*DNA-ligand binding mode discrimination by characterizing fluorescence resonance energy transfer through lifetime measurements with picosecond resolution*”, Photochem. Photobiol. **84** (1), 101-110 (2008).
- [110] A. P. Minton, “*The effect of volume occupancy upon the thermodynamic activity of proteins: some biochemical consequences*”, Mol. Cell. Biochem. **55** (2), 119-140 (1983).
- [111] T. L. Hill, “*An Introduction to Statistical Thermodynamics*”, 1st ed., Addison-Wesley Education Publishers Inc., New York (1960).
- [112] P. G. de Gennes, “*Scaling Concepts in Polymer Physics*”, 1st ed., Cornell University Press, Oxford (1979).
- [113] E. C. Cesconetto, F. S. A. Junior, F. A. P. Crisafuli, O. N. Mesquita, E. B. Ramos and M. S. Rocha, “*DNA interaction with Actinomycin D: mechanical*

Referências Bibliográficas

- measurements reveal the details of the binding data*", Phys. Chem. Chem. Phys. **15**, 11070-11077 (2013).
- [114] F. A. P. Crisafuli, L. H. M. da Silva, G. M. D. Ferreira, E. B. Ramos and M. S. Rocha, "*Depletion interactions and modulation of DNA-intercalators binding: opposite behavior of the "neutral" polymer poly(ethylene-glycol)*", Biopolymers **105** (4), 227-233 (2016).