

EDUARDO FERREIRA DA SILVA

**ESTUDO DA INTERAÇÃO DNA-HOECHST(33258) POR
PINÇAMENTO ÓTICO**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2013**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

S586i
2013
Silva, Eduardo Ferreira da, 1972-
Estudo da interação DNA-HOESCHT(33258) por
pinçamento ótico. / Eduardo Ferreira da Silva. – Viçosa, MG,
2013.
x, 68 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

.

Inclui apêndices.

Orientador: Márcio Santos Rocha.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.64-68.

1. Óptica. 2. Ácido desoxirribonucleico. I. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Física. Programa de
Pós-Graduação em Física Aplicada. II. Título.

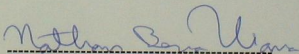
CDD 22. ed. 535.2

EDUARDO FERREIRA DA SILVA

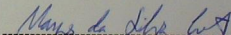
INTERAÇÃO DNA-HOESCHT (33258) POR PINÇAMENTO ÓTICO

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

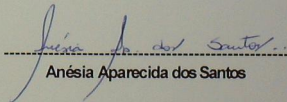
APROVADA: 25 de julho de 2013.



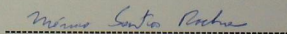
Nathan Bessa Viana



Marcos da Silva Couto



Anésia Aparecida dos Santos



Márcio Santos Rocha
(Orientador)

Aos meus pais José Ferreira da Silva e Maria da Conceição Lopes, à minha segunda mãe Sonia Maria Bernardes, aos meus irmãos, Jesusmar, Joilson, Joisceany, Ilcilayne e Josiemara e ao meu amor, Claudia Malheiros.

“A vida sem ciência é uma espécie de morte. ”
Sócrates

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais, José Ferreira da Silva e Maria da Conceição Lopes, à minha segunda mãe Sônia Maria Bernardes, aos meus irmãos: Jesusmar, Joilson, Joisceany, Ilcilayne e Josiemara, por todo o amor, pelo companheirismo, amizade e apoio. Em fim por ser uma prazerosa família. Ser cativo de vossos respeitos e de vossas considerações é o que realmente me honra e dignifica.

Aos professores e funcionários do Departamento de Física da Universidade Federal de Viçosa.

Um obrigado muito especial a todos os amigos da Física que desde a graduação estão unidos e dispostos a ajudarem uns aos outros. Aos estudantes da pós-graduação, pela ajuda, incentivo e amizade.

Ao meu orientador, Prof. Márcio Santos Rocha, pelos valorosos direcionamentos e pelo paciente acompanhamento. Por liderar com tanta dignidade, respeito e ética o laboratório de Física Biológica e ao Prof. José Ésio B. Ramos pela coorientação.

Aos companheiros do laboratório de Física Biológica que ajudaram muito na realização dos experimentos.

Ao meu amor Cláudia Malheiros, apoio inegável e paciência infinta nos meus momentos de descrença e insegurança. Sempre tinha um plano!

À CAPES pela bolsa concedida. À Universidade Federal de Viçosa, ao CNPq e à FAPEMIG pelo apoio e credibilidade.

Por fim agradeço o que de mais precioso me foi concedido, A VIDA.

Sumário

Lista de Figuras	vii
Resumo	ix
Abstract	x
1 Introdução	1
2 Pinças Óticas	3
2.1 Noções Históricas	3
2.2 Embasamento Teórico e Princípios de funcionamento	4
3 DNA: O Código Vital	10
3.1 Importância e Noções Históricas	10
3.2 A Estrutura do Ácido Desoxirribonucleico	12
3.3 Propriedades do Ácido Desoxirribonucleico	16
3.4 Tipos de DNA	18
3.5 O DNA do Bacteriófago λ	19
3.6 O DNA como Polímero	19
3.6.1 O modelo de Kratky-Porod	20
3.6.2 Elasticidade no Regime Entrópico	22
3.6.3 O Modelo da cadeia vermiforme (WLC)	24
3.7 Equilíbrio químico nas interações DNA-Ligantes	27
3.7.1 Modelo de Hill	28

4	Caracterização do complexo DNA-Hoechst com pinça ótica e videomicroscopia	32
4.1	O ligante Hoechst(33258)	32
4.2	Esquema de montagem da pinça e da videomicroscopia	34
4.3	Calibração da pinça ótica	35
4.4	Procedimento experimental	37
4.4.1	Obtendo dados do estiramento do DNA e do complexo DNA-ligante . .	37
4.4.2	Preparo das amostras	41
5	Resultados e discussões	43
5.1	Propriedades mecânicas e físico-químicas do complexo DNA-Hoechst(33258) .	43
5.1.1	Análise dos dados do comprimento de persistência	45
6	Conclusões e perspectivas	52
A	Cálculo da média quadrática da distância entre as extremidades $\langle r_{ee}^2 \rangle$	54
B	Artigo aceito para publicação	57
	Revista <i>The Journal of Physical Chemistry B</i>	57
	Referências Bibliográficas	64

Lista de Figuras

2.1	figura pressão de radiação.	7
2.2	figura pressão de gradiente.	8
3.1	Diagrama representando o nucleotídeo.	12
3.2	Bases nitrogenadas.	13
3.3	Esquema da unidade básica.	13
3.4	Esquema da direção de crescimento da cadeia.	14
3.5	Esquema da dupla hélice.	15
3.6	Esquema ilustrativo da replicação do DNA.	16
3.7	Temperatura de desnaturação em função de pares GC.	17
3.8	Tipos de DNA encontrados em condições fisiológicas.	18
3.9	Curvatura de haste	20
3.10	Curva aleatória	21
3.11	Aumento de entropia do DNA em solução	22
3.12	Forças no regime entropico	23
3.13	Gráfico modelo para o coeficiente de Hill	30
4.1	Estrutura planar da molécula Hoechst(33258)	33
4.2	Montagem experimental	34
4.3	Poço de potencial de aprisionamento da pinça ótica	35
4.4	Possíveis configurações da solução no porta amostra	38
4.5	Direção de estiramento para testar uniformidade	38
4.6	Estiramento do DNA ao longo de sua extensão	39

4.7	Curva de força típica de um DNA em sua forma nativa	40
4.8	Esquema do porta amostra e troca de alíquota	41
5.1	Média das curvas de força por extensão	44
5.2	Comprimento de contorno aparente L_{app} por concentração total C_T	45
5.3	Comprimento de persistência A em função da concentração total C_T	46
5.4	Probabilidade de dois sítios ocupados e desocupados	46
5.5	Curva de ajuste pelo modelo estatístico de desordem de dois sítios	49
5.6	Curvas individuais dos dois modos de ligação	50
A.1	Curva arbitrária de um polímero e seus vetores posição	54

Resumo

SILVA, Eduardo Ferreira da, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2013. **Estudo da Interação DNA-HOESCHT(33258) por pinçamento ótico.** Orientador: Marcio Santos Rocha. Coorientadores: Jose Ésio Bessa Ramos Júnior e Marcelo Lobato Martins.

Neste trabalho, fizemos experimentos de estiramentos em moléculas únicas com pinça ótica e estudamos a interação do DNA com o ligante Hoechst(33258). As propriedades mecânicas dos complexos formados como uma função da concentração do ligante, foram diretamente determinadas a partir destas medidas, por ajuste das curvas de força por extensão pelo modelo da cadeia vermiforme (WLC), de polímeros semiflexíveis. Além disso, os parâmetros físico-químicos da interação foram extraídos dos dados do comprimento de persistência usando um modelo estatístico de desordem de dois sítios previamente desenvolvido, permitindo a obtenção da isoterma de ligação. A aplicação do modelo nos permitiu decompor os dois modos de ligação presentes neste sistema. Em particular, encontramos que a isoterma de ligação consiste de dois processos tipo Hill, um não cooperativo e o outro fortemente cooperativo. Finalmente a condensação do DNA devido à interação com o ligante foi também verificada e caracterizada aqui por análise do comprimento de contorno aparente do complexo.

Abstract

SILVA, Eduardo Ferreira da, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2013. **Study of the Interaction DNA-Hoechst (33258) by optical tweezers.** Adviser: Marcio Santos Rocha. Co-Advisers: Jose Esio Bessa Ramos Júnior and Marcelo Lobato Martins.

By performing single molecule stretching experiments with optical tweezers, we have studied the DNA interaction with the ligand Hoechst(33258). The mechanical properties of the complexes as a function of ligand concentration were directly determined from these measurements by fitting the force versus extension curve to the WormLike Chain model of semiflexible polymers. In addition, the physico-chemical parameters of the interaction were extracted from the persistence length data by using a previously developed two-sites quenched disorder statistical model, allowing the determination of the binding isotherm. This model has allowed us to decouple the two different binding modes present in this system. In particular, it was found that the binding isotherm consists of two Hill-type processes, one non-cooperative and the other strongly cooperative. Finally, DNA condensation due to the interaction with the ligand was also verified and characterized here by analyzing the apparent contour length of the complexes.

Capítulo 1

Introdução

Desde as pesquisas com a pinça ótica por Arthur Ashkin a partir da década de 60, o estiramento da molécula de DNA é uma das vastas aplicações desta técnica, que integra duas grandes áreas da ciência, a Física e a Biologia. A pinça ótica permite o controle de uma parte do mundo que não podemos manipular diretamente, o controle do sensível mundo microscópico das partículas biológicas. Arthur Ashkin define de modo simples a pinça ótica como sendo um feixe laser fortemente focalizado através da lente objetiva de um microscópio [1]. De acordo com os argumentos que apresentaremos, a pinça ótica pode aprisionar e permitir a micromanipulação de partículas dielétricas e biológicas na região focal do feixe laser, possibilitando o estudo de sistemas biológicos por medir forças na escala de piconewtons. [2–9]

Após a descoberta da estrutura do DNA por Watson e Crick em 1953 [10, 11], o que incentivou inúmeras pesquisas na área, aprofundou-se muito o conhecimento sobre as atividades celulares através de estudos que abrangem as relações do DNA [12]. As interações do DNA com ligantes, tais como drogas ou proteínas, são tópicos de pesquisas de interesse para muitas áreas do conhecimento, desde processos intracelulares básicos até aplicações em ciências médicas, especialmente em tratamentos quimioterápicos e terapias gênicas [13, 14].

Neste trabalho estudamos a interação do DNA com o ligante Hoechst(33258), conhecido como corante marcador do DNA e potencialmente sugerido como fármaco, devido a sua forte interação com a molécula de DNA [15–17]. O estudo que fizemos utiliza-se da técnica do pinçamento ótico, fazendo estiramentos em moléculas únicas, visando extrair propriedades mecânicas do complexo DNA-Hoechst e a partir delas obter parâmetros físico-químicos presentes na formação deste complexo. De fato a partir destes experimentos de estiramentos, a curva de força por extensão pode ser medida e, então, propriedades mecânicas básicas, tais como comprimentos de contorno e de persistência, podem ser prontamente determinados. Usamos uma metodologia de análise de dados recentemente desenvolvida pelo nosso grupo, que

permite extrair parâmetros químicos, e consequentemente a isoterma de ligação, a partir de medidas puramente mecânicas [18–21]. Esta metodologia consiste do procedimento de ajuste dos dados do comprimento de persistência de um complexo DNA-ligante, usando um modelo estatístico de desordem de dois sítios [20, 21].

No capítulo 2 apresentamos uma discussão sobre os pontos principais de uma pinça ótica, englobando o embasamento teórico e um breve histórico.

No capítulo 3 discutimos os principais aspectos e importâncias da molécula do ácido desoxirribonucleico, junto com um apanhado histórico da construção coletiva de sua estrutura.

Já nos capítulos 4, 5 e 6, nos atemos à nossa metodologia experimental, aos nossos resultados e às nossas conclusões e perspectivas, respectivamente.

Capítulo 2

Pinças Óticas

Após o advento do laser, e a partir da década de 70, o pinçamento ótico vem sendo amplamente usado em aplicações físicas e biológicas, embora as teorias que generalizam sua compreensão e uso sejam bem mais recentes. Faremos uma inserção cronológica na evolução do conceito de forças óticas, dos princípios físicos envolvidos em sua formulação e um apanhado geral das teorias de pinças óticas. Neste capítulo desenvolveremos importantes noções do pinçamento ótico.

2.1 Noções Históricas

Desde tempos remotos já se supunha que a luz pudesse exercer algum tipo de força sobre meios nos quais incidisse. Johannes Kepler, Isaac Newton e outros defenderam esse argumento, mesmo que em fragmentos de seus trabalhos e ainda muito anteriores à compreensão efetiva sobre a luz.

Não é nada intuitivo a ação de força pela incidência da luz, pelo simples motivo de que essas forças são muito fracas. Por isso, demonstrações dessas forças ainda demorariam a surgir. Somente a partir do desenvolvimento da teoria eletromagnética no fim do século XIX, por James Clerk Maxwell, é que se pode de fato demonstrar, teoricamente, que a luz poderia exercer força sobre os meios ao transferir momento para eles. No campo experimental, é de se admitir ser surpreendente a obtenção de experimentos bem sucedidos da observação dessa pressão, anteriores à invenção do laser. Embora tais experimentos tenham ocorrido, eles apenas garantiam sua existência de forma qualitativa. Quantitativamente só foi demonstrada no século XX (1903) e

conhecida por força de Mawell-Bartoli [22].

Ao final da década de 60, surge o laser, um feixe de luz intenso e colimado, possibilitando o estudo da pressão de radiação, ou das forças óticas propriamente ditas. Admirado com a aceleração de partículas arrastadas na direção de propagação de um feixe laser, Arthur Ashkin [1], trabalhando simultaneamente com dois feixes laser, iniciou uma série de experimentos que aprisionavam partículas, levitando-as e arrastando-as [2, 3]. Com esta conveniência a favor, Arthur Ashkin foi o pioneiro na compreensão das inúmeras possibilidades que a pinça ótica viria a propiciar. Neste contexto, abriu-se um leque de trabalhos com a pinça ótica, demonstrando serem viáveis, através da adequação do comprimento de onda e intensidade do laser, manipulações de pequenas partículas dielétricas [4] e biológicas [5]. Em 1986, Ashkin, Dziedzic, Bjorkholm e Steven Chu conjugam o feixe laser com a lente objetiva de alta abertura numérica de um microscópio e demonstram um novo modo capaz de aprisionar partículas com um único feixe [6, 9]. Tal motivação surgiu depois de observarem que as partículas aprisionadas ficavam posicionadas no centro do feixe laser, onde ele é mais intenso. Este aparato estabiliza um poço de potencial tridimensional na região do foco da objetiva, permitindo o aprisionamento de partículas dielétricas num intervalo de 25 nm a $10\text{ }\mu\text{m}$ não só num plano transverso mas também numa direção axial à propagação do feixe [9]. Após esse salto, os trabalhos, bem como as aplicações, intensificaram-se muito. Fazendo uso de um laser infravermelho, que minimiza os danos às espécies biológicas, as pesquisas nessa área despontaram, possibilitando estudos de células, manipulações de vírus, bactérias e moléculas como o DNA [5, 7].

2.2 Embasamento Teórico e Princípios de funcionamento

Ao que concerne o poder de aprisionamento de partículas dielétricas (normalmente microesferas de poliestireno) pela pinça ótica, é de relevância fundamental o tamanho e as propriedades óticas (índice de refração) dessas partículas. Existem muitas teorias que abordam os princípios envolvidos nesse aprisionamento, citamos três delas, que de acordo com condições específicas preveem as constantes de força da pinça. Primeiramente tem-se a Teoria da Ótica Geométrica (OG), que trata das partículas cujo raio é muito maior que o comprimento de onda da luz ($a \gg \lambda$). Na outra ponta, como era de se esperar, temos partículas cujos raios são muito menores que o comprimento de onda ($a \ll \lambda$) e para tanto se adequa aqui a Teoria Rayleigh. Por fim, também naturalmente temos que contar as partículas de raios intermedários, que tem a mesma dimensão do comprimento de onda da luz incidente, temos então uma teoria que admite tal intervalo e que no entanto engloba os dois limites das teorias anteriores, é a chamada

Teoria MDSA [23], que é capaz de prever a constante de força para partículas de raios e índices de refração arbitrários. Essa teoria foi assim denominada por seus autores, Mazolli, Maia Neto e Moisés Nussenzveig, que por abranger o feixe de laser focalizado além da objetiva na representação de Debye, a interação do feixe com a microesfera pela teoria de espalhamento Mie e os efeitos da aberração esférica da luz devido à refração em interfaces, tem as iniciais de Mie-Debye Spherical Aberration.

Não é nosso objetivo aqui, pormenorizar nenhuma das teorias de pinças óticas, faremos sim um exercício teórico simplificado, mas com cuidados suficientes para que tenhamos uma boa percepção no entendimento de uma pinça ótica. Os cálculos detalhados podem ser acompanhados nas principais referências.

É de suma importância compreender que no pinçamento estão presentes muito fortemente dois fenômenos óticos, a reflexão e a refração. O primeiro, juntamente com alguma porção absorvida da radiação incidente, é responsável por gerar a pressão de radiação enquanto que o segundo, no caso a refração, irá gerar a pressão de gradiente para a qual a condição de pinçamento exige que o índice de refração da microesfera seja maior que o índice de refração do meio. Há ainda que se notar o perfil gaussiano da intensidade do feixe laser incidente, que acarretará numa força resultante na direção e sentido desejados e poderá ser percebido com facilidade nas figuras ilustrativas.

Na busca dessa compreensão iremos inicialmente fazer uma estimativa da ordem de grandeza da intensidade das forças óticas. Começaremos por imaginar que o feixe laser incidente seja composto por vários raios infinitesimais da radiação incidente e que estes se propagam de acordo com o princípio de propagação retilínea da luz, portanto no regime da ótica geométrica. Assim, estudando o efeito provocado por um único raio podemos intuir numa soma que nos revele o efeito geral do feixe.

Por questão de praticidade, vamos daqui para frente nos referir ao objeto pinçado sempre como sendo as microesferas de poliestireno. Começemos então por estimar a força que um único raio poderá empregar à microesfera. Visualizemos essa força à partir do ponto de vista da mecânica quântica, referindo o raio incidente como composto por fótons. Esses fótons, viajando com certa velocidade v , transferirão momento para a microesfera, que por possuir massa ficará sujeita à ação da força ótica. A transferência de momento à microesfera, exigência do teorema da conservação do momento linear, é a responsável pelas pressões de radiação e gradiente. A potência do laser nos informa sobre a quantidade de energia entregue no tempo à microesfera, logo esperamos que a força do raio seja dependente da potência e da velocidade do feixe, ou seja:

$$f \approx \frac{P_{raio}}{v}, \quad (2.1)$$

com:

$$v = \frac{c}{n}, \quad (2.2)$$

onde c é a velocidade da luz no vácuo e n é o índice de refração do meio de propagação.

Essa estimativa também pode ser feita considerando a transferência de momento, que é mais apropriada já que a origem da força ótica reside no fato dos fótons transportarem momento. Um fóton de luz possui momento $\vec{p} = \hbar \vec{k}$ em que $\hbar$ é a constante de Plank e $\vec{k}$ é o vetor de onda do fóton.

Para a pressão de radiação por exemplo, caso o fóton sofra reflexão total na superfície da microesfera conservando a direção, irá sofrer uma variação de momento dada por $\Delta \vec{p} = \hbar \vec{k} - (-\hbar \vec{k}) = 2\hbar \vec{k}$ que será o momento transferido. Com o módulo do vetor de onda, $k = \omega/c$, onde ω é a frequência angular da radiação incidente, reescrevemos a equação acima também em módulo e ela nos levará a:

$$\Delta p = 2\hbar k = 2 \frac{\hbar \omega}{c} = 2 \frac{E}{c}, \quad (2.3)$$

sendo $E = \hbar \omega$ a energia do fóton. Então podemos somar a energia de cada raio incidente até que tenhamos a energia de todo o feixe, que pelo fato do laser ser monocromático e composto de fótons coerentes, basta então multiplicar a energia de um fóton pelo número total N de fótons contidos no feixe para obtermos a energia total $E_{tot} = NE$. Assim o momento total transferido será $\Delta p_{tot} = 2E_{tot}/c$. Agora, aplicando a segunda lei de Newton, teremos:

$$F = \frac{dp}{dt} = \frac{2}{c} \frac{dE_{tot}}{dt} = \frac{2P_{tot}}{c}. \quad (2.4)$$

Normalmente, para experimentos que envolvem material biológico como nosso caso, a potência total do feixe é da ordem de uns poucos mW . Tomando os valores conhecidos das grandezas envolvidas, podemos finalmente chegar ao valor estimado para a força:

$$F \approx \frac{2 \cdot 10^{-3} W}{3 \cdot 10^8 m/s} \approx 10^{-11} N \approx 10 pN. \quad (2.5)$$

Esta é de fato a magnitude típica das forças num experimento de pinça ótica, na escala de pico-Newtons. Apesar da magnitude correta, estimamos a força baseados somente na pressão de radiação e temos também atuante a força de gradiente, conforme discutimos acima. No entanto, para nossa estimativa, a variação contabilizada do momento supunha toda a radiação incidindo perpendicularmente à superfície da microesfera ($\Delta p_{tot} = 2E_{tot}/c$), suposição que, no

caso mais geral, não procede. Parte da radiação é dispersada, parte da energia é absorvida pelo meio, etc. A combinação das duas pressões é que resulta na força dessa ordem de grandeza. Na verdade há uma competição das pressões e uma compensação pela força de gradiente é que origina o pinçamento [1, 5].

A ótica geométrica será nosso esteio para compreendermos qualitativamente o aprisionamento da microesfera na região focal [8, 24].

Vamos, com auxílio da figura 2.1, inicialmente estudar a pressão de radiação visualizando dois raios que partem das extremidades opostas do feixe de perfil gaussiano e que são parcialmente absorvidos e refletidos na microesfera, transferindo momento a ela e gerando forças, $\vec{F}_1$ pelo raio da esquerda (1) e $\vec{F}_2$ pelo raio da direita (2), cuja resultante tende a deslocá-la na direção de propagação do feixe. Tratamos assim, da pressão de radiação.

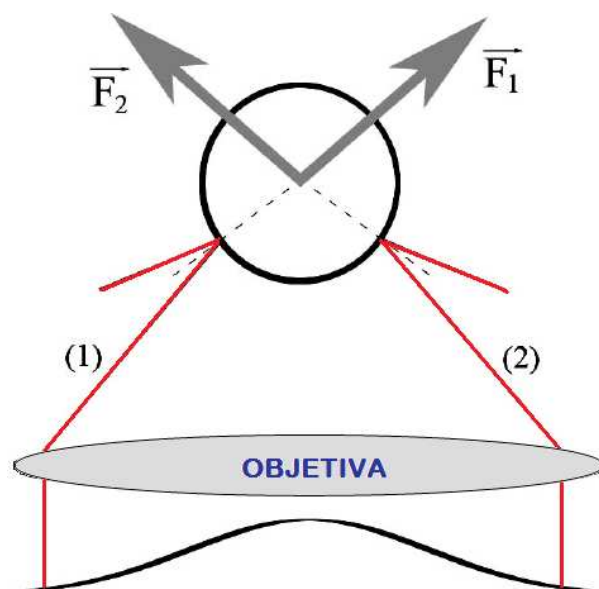


Figura 2.1: **Pressão de radiação:** A fração refletida dos raios geram uma força resultante que desloca a microesfera na direção de propagação do feixe. Adaptada da referência [25].

Analisando agora a figura 2.2 estudaremos a pressão de gradiente, assim como antes, visualizando dois raios particulares para a microesfera posicionada em duas posições distintas, abaixo (a) e acima (b) do foco. Na situação da figura 2.2 (a) os dois raios encontram a microesfera antes do foco e mais à direita da objetiva, sofrem refração e são desviados com consequentes variações em seus momentos lineares. O raio (1) está no centro do perfil gaussiano do feixe, portanto é mais intenso e pela conservação do momento linear gera uma variação de momento na microesfera que tem como consequência uma força $\vec{F}_1$ que somada à força $\vec{F}_2$ do raio (2) de causa semelhante a do raio (1), mas de menor intensidade por estar na extremidade do perfil gaussiano, irá gerar uma força resultante que tenderá deslocar a microesfera para cima, na direção do foco do laser. Já na figura 2.2(b), os dois raios, que agora partem das extremidades

opostas do perfil gaussiano do laser e encontram a microesfera depois de terem passado pelo foco, também sofrerão refração e por motivos idênticos ao caso da figura 2.2(a) gerarão uma força resultante que tenderá deslocar a microesfera agora para baixo, também na direção do foco. Observe ainda que os desvios sofridos pelos raios só ocorreram nas condições mostradas devido ao maior índice de refração da microesfera em relação ao meio, caso contrário as forças resultantes não originariam o pinçamento.

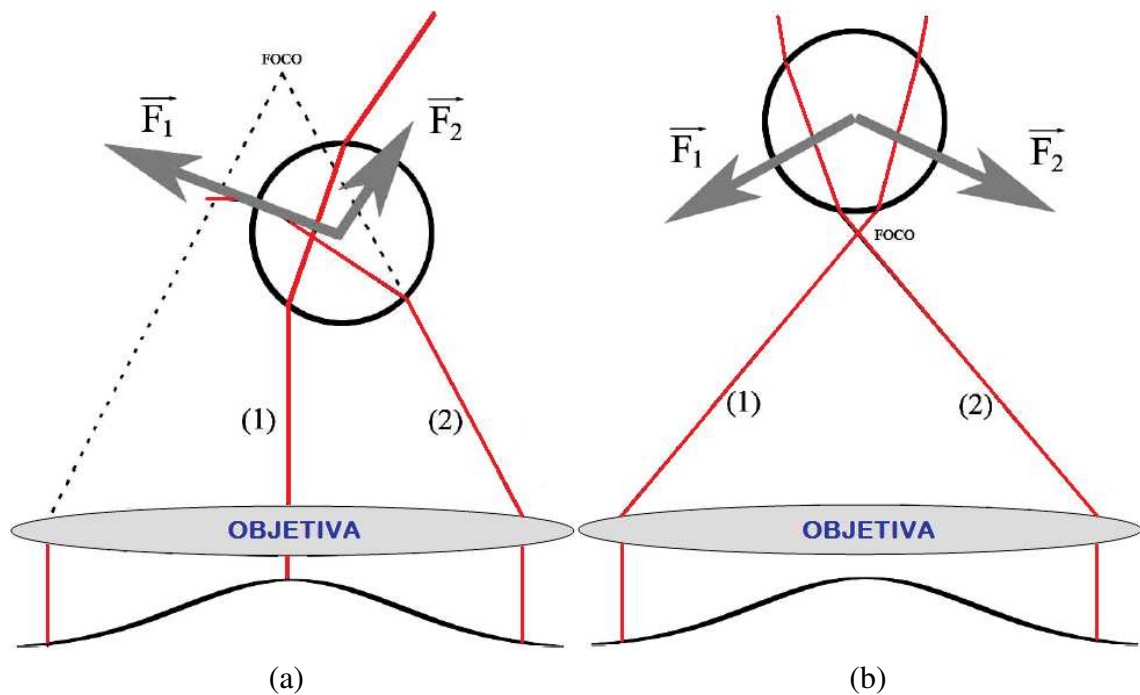


Figura 2.2: **Pressão de gradiente:** A fração refratada dos raios geram uma força resultante que desloca a microesfera para a região do foco do laser. (a) A força resultante desloca a esfera para cima. (b) A força resultante desloca a esfera para baixo. Figura adaptada da referência [26]

Há que se ficar nítido que toda a análise construída foi feita nos limites da ótica geométrica, que se dá quando o raio da microesfera é muito maior que o comprimento de onda da radiação incidente ($a \gg \lambda$). Na referencia [26] foi calculada detalhadamente a constante de força da pinça para o caso em que vale o limite Rayleigh, no qual o raio da microesfera é muito menor que o comprimento de onda da radiação incidente ($a \ll \lambda$). Nestas condições a microesfera torna-se um dipolo induzido e a força é proporcional ao gradiente da intensidade do campo elétrico associado à onda eletromagnética [24,27]. Como resultado, tal força repete a tendência vista acima, deslocar a microesfera para a região do foco, agora devido ser essa a região onde o campo elétrico é mais intenso e o confinamento é novamente possível. Para análises mais completas, inclusive com precisões quantitativas, seria necessário um estudo aprofundado da Teoria MDSA+, que é a mais completa e geral de pinças óticas atualmente, abrangendo inclu-

sive correções de astigmatismo [23, 26, 27].

Como vimos, a pinça ótica é um instrumento poderoso para a manipulação de objetos em escalas nano e micrométrica, tendo um alcance importantíssimo em várias áreas do conhecimento e vastas possibilidades de aplicação.

Capítulo 3

DNA: O Código Vital

Nesse capítulo, mais uma vez teremos uma rápida passagem pela busca da compreensão do código da vida, da história do DNA. Descreveremos alguns dos principais conteúdos a se saber sobre a molécula do DNA, tais como a importância de seu estudo, principais aspectos biológicos, estrutura biológica e alguns modelos matemáticos que descrevem sua estrutura e energia.

3.1 Importância e Noções Históricas

Estão contidas na molécula de DNA (ou ADN: Ácido Desoxirribonucleico) informações de armazenamento e transmissão dos caracteres hereditários de uma geração, que irão designar as funções, a produção e o controle das proteínas, portanto, de importância crucial na designação da estrutura e funcionalidade das células. Para que não destrinchemos uma lista interminável de suas ações, essas compreensões já são capazes de nos mostrar a relevância do estudo do DNA e o fascínio que exerce no homem moderno.

Durante um amplo período de evolução do conhecimento humano eram dadas às proteínas o papel que hoje se sabe desempenhar o DNA. De uma maneira geral, pode-se dizer que o primeiro reconhecimento de que haviam unidades específicas responsáveis pela hereditariedade foi do monge Gregor J. Mendel, em meados do século XIX, mas a descoberta do DNA é atribuída aos trabalhos do então jovem Médico, fisiólogo e químico orgânico suíço Friedrich Miescher em 1869 [12, 28], que isolou do material genético de leucócitos uma substância que ele chamou inicialmente de “nucleína” por ter sido precipitada a partir do núcleo celular. Até

então as proteínas ainda eram consideradas as responsáveis pelas funções genicas, tendo ele um árduo trabalho na identificação do material componente dessa substância para diferenciá-la das proteínas, reconhecendo compostos que distinguiam essa substância de qualquer grupo de proteínas conhecidas até aquele momento.

Desde então, do final do século XIX até o início da primeira metade do século XX, vários trabalhos contribuíram para alavancar os fundamentos que levariam a uma maior compreensão do assunto: a identificação dos cromossomos e de algumas de suas teorias, a alcunha de alguns termos que ficaram característicos da área, como cromatina, genes, genótipos e fenótipos e inclusive a emergência de um trabalho que demonstrou que o DNA era composto por moléculas de açúcar e por quatro bases nitrogenadas. Mesmo diante desses avanços, a parte mais conservadora da comunidade científica ainda creditava às proteínas a responsabilidade pelo código genético sob a alegação de que a nucleína era simples demais, com somente quatro nucleotídeos, para conter tantas informações e funções, ao passo que as proteínas eram formadas por vinte diferentes aminoácidos. Apesar de Friedrich Miescher ter descoberto a base molecular da vida celular, ninguém à época compreendeu seus resultados, tendo ele falecido no esquecimento e raramente é atribuída a ele a descoberta do DNA. Quase um século após a descoberta do DNA e com um número muito pequeno de contribuições para seu conhecimento nesse intervalo, em meados do século XX reascendeu-se o interesse generalizado pelo DNA e novas contribuições significativas surgiram. Erwin Chargaff conseguiu elaborar algumas regras, que ficaram conhecidas como as “regras de Chargaff”, que formalizavam as quantidades das bases nitrogenadas na molécula de DNA. Paralelamente, outros pesquisadores, como a biofísica britânica Rosalind Franklin e o fisiologista neozelandês Maurice Wilkins, obtiveram imagens de difração de raios-x da molécula de DNA. Esses dois trabalhos, em especial, serviram de suporte para que finalmente em abril de 1953, dois cientistas, James Watson (Biólogo) e Francis Crick (Físico), conseguissem desvendar a estrutura da molécula de DNA, tendo suas pesquisas se tornado uma das descobertas de maior impacto da história da ciência moderna [10, 11]. Desde então as pesquisas na área da genética, com base na estrutura da molécula do DNA, se intensificaram e também se diversificaram bastante, alcançando resultados em vários campos da ciência e da tecnologia moderna. O alcance abrange polícia investigativa, clonagens, prevenções de doenças e mais uma série de aplicações. Além disso, como no nosso caso, ajuda a compreender a interação da célula com fármacos conhecidos no tratamento de muitas doenças, como anti-neoplásicos por exemplo [12, 28].

3.2 A Estrutura do Ácido Desoxirribonucleico

O modelo da estrutura molecular do ácido desoxirribonucleico foi proposto por Watson e Crick em 1953. Ele ficou conhecido como o modelo de dupla hélice. Foi inspirado em um número enorme de estudos e tão substancialmente investigado e sequencialmente pesquisado que rendeu a Watson, Crick e Maurice Wilkins o prêmio nobel de medicina em 1962. O DNA foi constatado ser uma molécula em dupla fita constituída de unidades básicas que se repetem uma infinidade de vezes de acordo com o ser ao qual ela é pertencente. Em bactérias por exemplo as repetições atingem uma ordem de grandeza de 10^7 vezes enquanto em seres eucariotas a ordem é de 10^{10} . O DNA humano forma um fio de aproximadamente 2 nm de diâmetro e 1,5 m de comprimento, que na escala do visível seria comparável a um fio de aço de 2 mm de diâmetro e de 1500 Km de extensão [29]. Devido às repetições dessas unidades básicas a molécula é considerada um longo e complexo polímero cujos monômeros são chamados nucleotídeos e que consistem de três grupos ligados entre si, um fosfato (PO_4^-), um açúcar do tipo pentose (monossacarídeo com cinco átomos de carbono) e uma base nitrogenada, conforme esquematizado na figura 3.1.

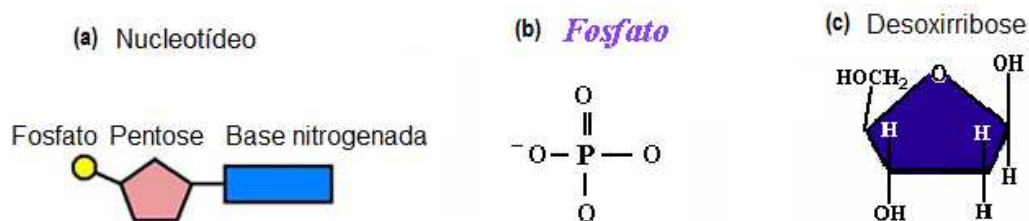


Figura 3.1: **Diagrama representando o nucleotídeo.** (a) esquema do nucleotídeo, (b) grupo fosfato e (c) desoxirribose.

As bases nitrogenadas são constituídas de quatro tipos diferentes, a saber: as purinas, adenina (A) e guanina (G) e as pirimidinas, timina (T) e citosina (C). Assim, ao longo do polímero os nucleotídeos são diferenciados por suas bases nitrogenadas, enquanto as bases diferem entre si devido a suas estruturas químicas e tamanhos, as purinas com dois anéis aromáticos e as pirimidinas com apenas um anel aromático, como representado na figura 3.2 [14, 29].

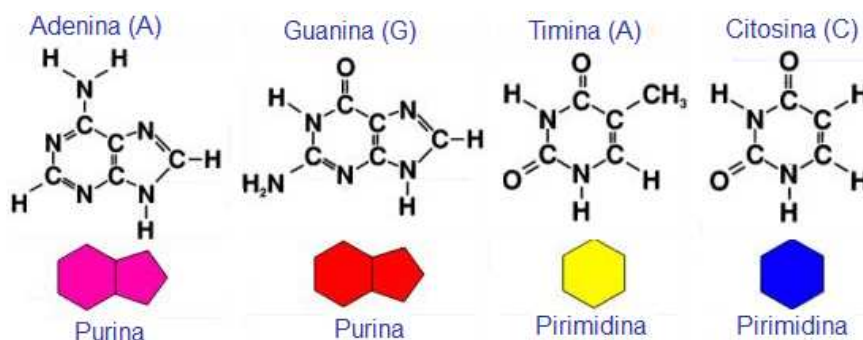


Figura 3.2: **Bases nitrogenadas** e suas estruturas em anéis.

De maneira generalizada, todas as moléculas de ácidos nucleicos são formadas por uma repetição sistemática de suas unidades básicas que podem ser ilustradas como na figura 3.3, na qual podemos ver que o grupo fosfato pode se ligar ao carbono do grupo açúcar pelo átomo de carbono 3' ou pelo 5'. No caso do DNA o grupo fosfato se liga ao carbono 5' do grupo açúcar (desoxirribose) por uma ligação fosfoéster.

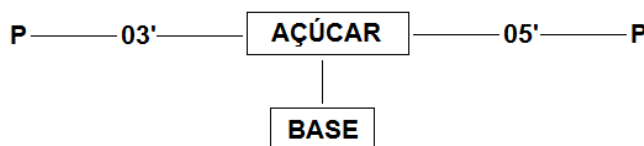


Figura 3.3: **Esquema da unidade básica.**

Para que a cadeia polinucleotídica seja formada, ou seja, para que se forme uma fita do DNA, é preciso que os nucleotídeos se unam. Essa ligação sempre ocorre entre o grupo fosfato de um nucleotídeo e a desoxirribose do nucleotídeo seguinte, através de ligações covalentes fosfodiéster. No entanto, caso o carbono 5' da pentose do primeiro nucleotídeo estiver voltado para cima, todos os demais nucleotídeos da cadeia estarão na mesma posição, definindo a direção da cadeia como sendo 5' → 3' e determinando o crescimento da cadeia, como visto na figura 3.4. Observa-se ainda as bases nitrogenadas ligadas ao carbono 1' da desoxirribose, na chamada ligação glicosídica e livres em um lado da cadeia de fita simples já formada.

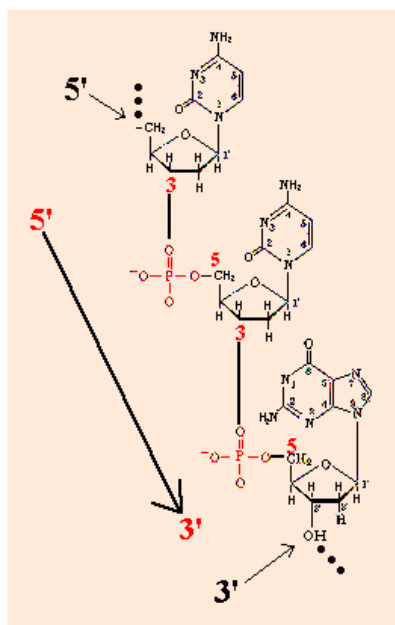


Figura 3.4: **Esquema da direção de crescimento da cadeia.** Observe as extremidades contendo livre o carbono 5' da primeira pentose e na outra temos livre a hidroxila do carbono 3' da última pentose. Extraída do trabalho “DNA – Estrutura e Replicação”, UFSC disponível no site [http : //www.enq.ufsc.br/labs/probiolisc-eng-bioq/trabalhos-pos2003/genetica/DNA.html](http://www.enq.ufsc.br/labs/probiolisc-eng-bioq/trabalhos-pos2003/genetica/DNA.html).

Para uma representação desse tipo de cadeia somente as letras das bases são representadas com as extremidades preenchidas com o número dos carbonos envolvidos na ligação, como por exemplo;



Esse tipo de cadeia é flexível e pode se conformar de acordo com torções necessárias para o caso de novas ligações e até possíveis empacotamentos, porém os maiores graus de torção ocorrem na ligação fosfodiéster entre o oxigênio e o fósforo e também na ligação glicosídica entre a pentose e a base nitrogenada. Entretanto, para formar o DNA com sua estrutura secundária em dupla-hélice, necessita-se ainda de uma segunda fita. Cada uma dessas duas fitas complementarão uma à outra em relações que foram apresentadas por Chargaff em 1951. Ele teria, através do estudo de vários organismos, empiricamente chegado a conclusões sobre as quantidades de bases presentes nos DNA's. A primeira relação fundamental diz que a quantidade de bases purinas é sempre igual à quantidade de bases pirimidinas, ou seja, $(A + G) = (T + C)$. A segunda diz que a quantidade de timina é igual à quantidade de adenina ($T = A$) e também que a quantidade de guanina é igual à quantidade de citosina ($G = C$), mas aqui com observação de que a quantidade de $A + T$ não é necessariamente igual a de $C + G$. Essas observações foram fundamentais para a obtenção do modelo de dupla hélice. Neste modelo as fitas estão unidas antiparalelamente,

isto é, no encaixe das duas fitas as ligações fosfodiéster ficam em sentidos opostos, uma de $5' \rightarrow 3'$ e a outra de $3' \rightarrow 5'$. Como visto anteriormente, as bases ficam livres em cada uma das fitas e é exatamente por elas que se fará a união das duas fitas. Elas serão ligadas formando pares entre uma base purina e uma pirimidina por ligações de hidrogênio, sendo duas ligações entre A e T e três entre G e C. Os pares de base do DNA possuem semelhantes tamanhos e dimensões e disso resulta uniformidade no diâmetro da dupla hélice [14, 29, 30]. Para que esse pareamento seja feito, a molécula sofrerá torções se conformando na dupla hélice. Os pares de base serão dirigidos ao interior da hélice mantendo a ligação entre as fitas pelas ligações de hidrogênio, enquanto as ligações fosfodiéster manterão os grupos fosfatos unidos aos grupos pentose do lado externo. Essa formação dará ao DNA aspecto de escada com as bases no papel dos degraus e os grupos fosfatos e desoxirribose no corrimão da escada, como podemos ver na figura 3.5. Em 3.5(a) vemos a direção de crescimento da cadeia. Em 3.5(b) temos a molécula conformada em hélice, como proposto por Watson e Crick. Há um distanciamento padrão entre as bases de $0,334 \text{ nm}$ e para que se dê um giro completo é necessário percorrer 10,1 pares de base. Em cada volta completa surgirão duas fendas (sulcos), conhecidas por fendas maiores e menores que são geradas pelas posições de rotação das bases em torno do eixo da hélice. Essas fendas serão fundamentais nos processos de interação entre o DNA e as respectivas substâncias interagentes, objetos de nosso estudo, como veremos em capítulos posteriores. [14, 26, 29, 30]

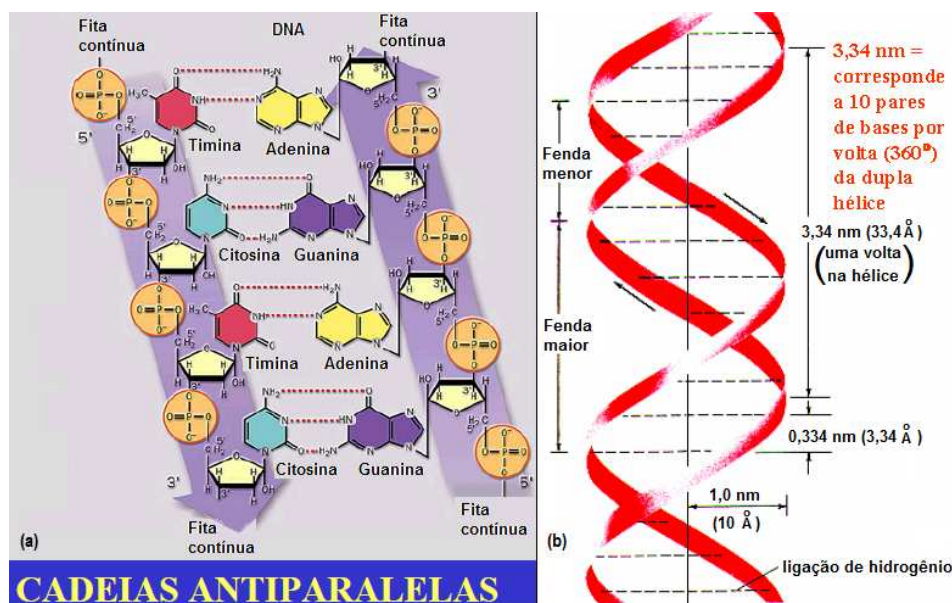


Figura 3.5: **Esquema da dupla hélice.** Em (a) temos ressaltadas as direções de crescimento da cadeia e seus sentidos antiparalelos. Em (b) podemos ver a conformação em dupla hélice, com os sulcos menor e maior e as distâncias entre as bases. Adaptada do trabalho “*Estrutura Molecular dos Ácidos Nucleicos e Replicação do DNA*” visualizado em [http : //www.ebah.com.br/content/ABAAAAYTsAF/estrutura-replicacao-dna](http://www.ebah.com.br/content/ABAAAAYTsAF/estrutura-replicacao-dna).

3.3 Propriedades do Ácido Desoxirribonucleico

O ácido desoxirribonucleico, assim como todos os ácidos nucleicos, é passível de sofrer dissociação e associação através de processos físicos e químicos. No caso do DNA, estes termos são mais conhecidos por desnaturação (melting) e renaturação (annealing) significando fusão e reanelamento, respectivamente. São processos naturais, importantíssimos para que o DNA possa passar pelos processos de replicação, transcrição e recombinação. Em condições fisiológicas, a estrutura de dupla hélice do DNA é bastante estável e esses processos são realizados pela ação de enzimas específicas (DNA-polimerases, DNA-helicases) de acordo com cada propósito, como pode ser visto na figura 3.6.

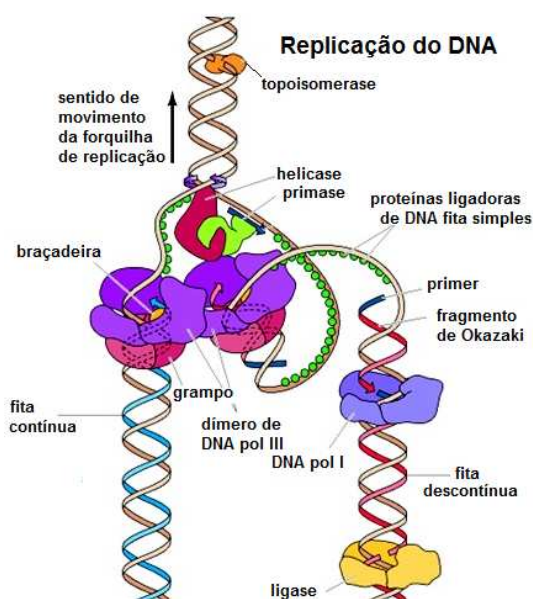


Figura 3.6: **Esquema ilustrativo da replicação do DNA.** Note a atuação de várias enzimas e ainda as novas duplas-fitas contendo uma fita da molécula mãe e uma nova. Extraída do trabalho “DNA – Estrutura e Replicação”, UFSC disponível no site <http://www.enq.ufsc.br/labs/probiolisc-eng-bioq/trabalhos-pos2003/genetica/DNA.html>.

No entanto, a molécula pode ser induzida à desnaturação se for submetida a elevações de temperatura ou a titulações com substâncias ácidas e/ou álcalis em pH extremos. Nela a dupla fita se separa em duas fitas simples pelo rompimento das pontes de hidrogênio que unem as bases. Da mesma forma, submetendo-se essas fitas simples a condições de associação por

algumas horas, elas podem se reconstituir formando a dupla fita novamente, obedecendo sempre a uma lei de complementariedade; ou seja a dupla fita somente se reassocia se as bases forem exatamente complementares. Este fato faz com que na replicação cada nova molécula formada possua uma fita da molécula original e uma recém formada, implicando que o processo de replicação receba a denominação de semiconservativa. Esses processos de desnaturação e renaturação são essenciais para manipulação dos ácidos nucleicos *in vitro*, principalmente do DNA, contribuindo enormemente para o isolamento, comparação e identificação desses compostos. Às vezes com cuidado para que eles não ocorram com risco de comprometimento de dados experimentais. Como a desnaturação ocorre com o rompimento das pontes de hidrogênio é natural pensarmos que um número maior de pontes na ligação entre as bases torna os processos físicos e químicos mais difíceis de serem executados, é o que ocorre por exemplo com a temperatura de fusão, ela é mais elevada quando a dupla fita tem uma concentração maior de pareamento GC do que de pares AT, que pode ser visto na figura 3.7.

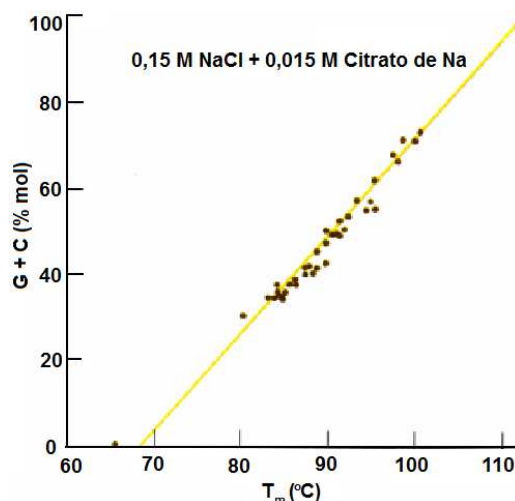


Figura 3.7: **Temperatura de desnaturação em função de pares GC.** Adaptada do trabalho “*Estrutura Molecular dos Ácidos Nucleicos e Replicação do DNA*” visualizado em [http : //www.ebah.com.br/content/ABAAAAYTsAF/estrutura – replicacao – dna](http://www.ebah.com.br/content/ABAAAAYTsAF/estrutura-replicacao-dna).

A desnaturação do DNA pode ser medida através de uma outra propriedade física muito importante dos ácidos nucleicos, que é a sua capacidade de absorver energia na região do ultravioleta. Quando a dupla-fita se encontra em sua forma nativa, o DNA apresenta pico de absorbância máxima em 260 nm e durante o processo de desnaturação esse pico se altera chegando a ter um valor 37% maior que com as fitas completamente separadas. Fato que se deve a serem as bases as maiores responsáveis pela absorção. Esta propriedade é útil tanto para a quantificação quanto para avaliar a pureza dessas substâncias. A medição da absorbância pode ser feita em paralelo com tomadas de temperatura até se alcançar uma temperatura na qual o DNA esteja totalmente desnaturado, denominada T_m , que será particularidade de cada tipo de

DNA de acordo com o número de pares de base GC contidos no mesmo.

3.4 Tipos de DNA

Embora o modelo da dupla hélice de Watson e Crick seja o mais amplamente divulgado e aceito, nos mais refinados exames de difração, Wilkins e seus colegas demonstraram que, dependendo das condições (meio em que se encontram) e da composição das bases, há outras estruturas possíveis. Essas estruturas possíveis encontradas em condições fisiológicas são conhecidas como A-DNA, B-DNA e Z-DNA e irão diferir no passo da hélice e até no sentido de giro da hélice, como podemos ver na figura 3.8. O tipo descrito por Watson e Crick e também usado em nossos experimentos é o B-DNA. Existem certos tipos de solventes orgânicos e até proteínas que podem forçar o DNA a estar nas formas A e Z e também induzir conformação da forma B em outras.

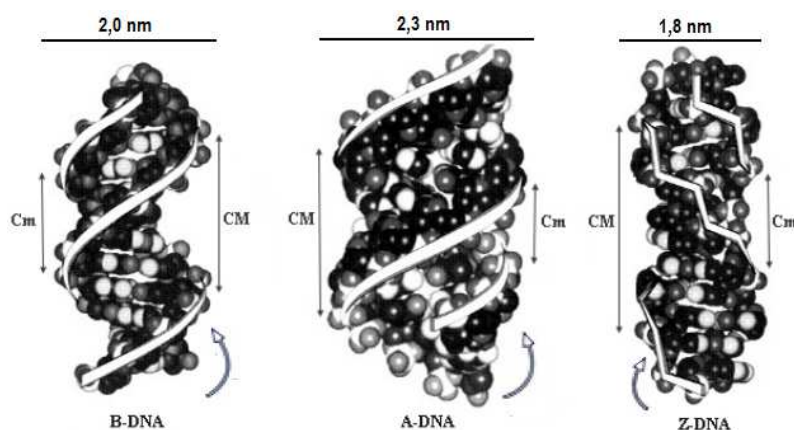


Figura 3.8: **Tipos de DNA encontrados em condições fisiológicas.** Vemos os tamanhos diferentes de cavidades entre as duas hélices para cada tipo de DNA. *Cm* representa a cavidade menor e *CM* a cavidade maior. Notemos ainda os diâmetros de cada tipo. Adaptada da referência [34]

Nas formas A-DNA e B-DNA os giros da hélice são para a direita. Nelas há uma diferença nas distâncias necessárias para se percorrer uma volta completa na hélice e também no ângulo que as bases fazem com o eixo da hélice. No B-DNA a dupla hélice é mais longa e mais fina e percorre-se 10,1 pares de bases para completar a volta na hélice. No A-DNA a dupla hélice é mais curta e mais grossa. Para completar uma volta na hélice são necessários 11 pares de

bases. Na terceira forma de se encontrar o DNA, forma Z-DNA, o sentido de rotação é para a esquerda. Nessa conformação, mais alongada e mais fina do que o B-DNA, para completar uma volta na hélice são necessários 12 pares de bases. Em solução, geralmente o DNA assume a conformação B. Em ambientes desidratados, a falta de água para interagir com a dupla hélice, conforma a dupla hélice no tipo A-DNA. Se o DNA for submetido a soluções altamente catiônicas ele se conforma no tipo Z-DNA. Além dessas formas possíveis do DNA de dupla fita, em organismos mais primitivos, caso de uma grande parte dos bacteriófagos e de alguns vírus animais e vegetais, o DNA ainda pode ser encontrado em fita simples.

3.5 O DNA do Bacteriófago λ

Como vimos no final do tópico anterior, em boa parte dos bacteriófagos, chamados apenas de fagos, o material genético está geralmente guardado em fita simples. Usamos como DNA de trabalho o DNA do bacteriófago λ que, no entanto, é encontrado em dupla fita e na forma B. Ele é um vírus que infecta a bactéria *Escherichia Coli* e será usado em nossos experimentos por se adequar bem aos estiramentos por causa de seu tamanho. Ele possui o comprimento médio ponta a ponta, chamado comprimento de contorno (L_c), da ordem de $L_c = 16,5 \times 10^{-6} m$, embora seja possível encontrar L_c com variações de até 30% maiores ou menores. Este fato reside na crença da variabilidade genética destes seres. Como polímero e cada par de base como seu respectivo monômero, ele possui 48.500 pares de base. Além dessas características, será de relevância em capítulos posteriores o comprimento de persistência (também definido a posteriori) como $A \cong 50 nm$ [13, 26, 31–33].

3.6 O DNA como Polímero

Como já dito anteriormente o DNA é um polímero biológico (biopolímero) cujas unidades repetitivas (monômeros) são os nucleotídeos, em DNA de fitas simples, e os pares de bases nas duplas fitas. No estudo da conformação do DNA é demonstrado que há somente uma faixa limitada de ângulos permitidos na conformação da cadeia nucleotídica. Levando em consideração a repulsão coulombiana dos grupos fosfatos, a molécula torna-se rígida. No entanto, considerando que o DNA exhibe polimorfismos (tipos A, B e Z-DNA's), a molécula exhibe plasticidade. Logo, o DNA é de fato uma cadeia que pode se dobrar de muitas maneiras [29]. Assim como

o DNA, existem inúmeros polímeros biológicos e todos eles quando submetidos a forças se comportarão de maneiras diferentes. Estas forças poderão ocasionar distensões, compressões ou ainda rotações na molécula polimérica. De qualquer forma, essas forças carecem do gasto de energia para retirar a molécula de sua forma inicial [26]. Nessa seção veremos alguns meios de se entender e contabilizar a flexibilidade do DNA como uma cadeia biopolimérica, desenvolvendo uma visão generalizada dos princípios de mecânica de polímeros em um dado meio.

3.6.1 O modelo de Kratky-Porod

Em 1949 dois cientistas, Otto Kratky and Günther Porod, físicos austríacos, desenvolveram um modelo que era capaz de descrever estados intermediários entre dois extremos de cadeia. Em um deles está a forma de uma haste rígida e no outro uma cadeia perfeitamente flexível de rotação livre (cadeia Gaussiana) [29, 34]. O DNA está nessa faixa intermediária, se encaixando na descrição de cadeia semiflexível. Para compreensão matemática do modelo, iniciemos contabilizando a energia envolvida na deformação de uma haste rígida, tal qual na figura 3.9. Essa energia tem dependência diretamente proporcional à intensidade da rigidez flexional da haste, que denotaremos k_f , do tamanho da haste, L_c , e do quadrado da curvatura à qual a haste será induzida, C^2 :

$$E_{curv} = \frac{1}{2} k_f L_c C^2. \quad (3.1)$$



Figura 3.9: **Curvatura de haste rígida.** A haste inicialmente retilínea é deformada em um semicírculo. Extraída da referência [34].

Agora podemos desenvolver a matemática do modelo de Kratky-Porod, estendendo o conceito da equação 3.1 para uma longa curva aleatória δ , cujo comprimento total é L_c , mas sendo formada por N segmentos de comprimento s e com a restrição de que $0 < s < L_c$. Na figura 3.10 podemos ver os vetores posição, $\vec{r}(s)$, que localizam pontos quaisquer da curva e também os vetores unitários, $\hat{t}(s)$, tangentes à curva nos mesmos pontos localizados. O vetor unitário

$\hat{t}(s)$ é definido no cálculo diferencial como;

$$\hat{t}(s) = \frac{\partial \vec{r}}{\partial s}. \quad (3.2)$$

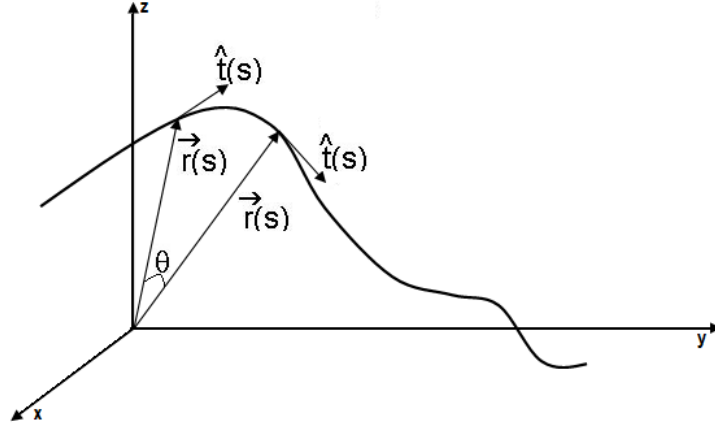


Figura 3.10: **Curva arbitrária.** Curva aleatória δ mostrando a mudança dos vetores posição no espaço, dados por $\vec{r}(s)$.

Todo segmento delimitado pelos vetores $\vec{r}(s)$ que possa ser construído ao longo da curva δ , define um elemento de arco que é dado por $ds = R d\theta$. A curvatura desse arco pode ser calculada por:

$$C = \left| \frac{1}{R} \hat{n} \right|, \quad (3.3)$$

onde $\hat{n}$ é o vetor unitário na direção do raio do elemento de arco gerado pela deformação da haste rígida (vista na figura 3.9). Assim, podemos construir a relação entre a curvatura C e os vetores posição $\vec{r}(s)$ da seguinte forma:

$$C = \left| \frac{1}{R} \hat{n} \right| = \left| \frac{\partial \theta}{\partial s} \frac{\partial \hat{t}}{\partial \theta} \right| = \left| \frac{\partial^2 \vec{r}}{\partial s^2} \right|, \quad (3.4)$$

e essa relação finalmente nos conduzirá à previsão de energia de curvatura desse modelo. Substituiremos a equação 3.4 na equação 3.1 e lembrando que na construção acima tomamos um pequeno arco de tamanho s na longa curva δ , faremos s de tamanho infinitesimal e integraremos ao tamanho L_c de toda a curva, obtendo:

$$E_{KP} = \frac{1}{2} k_f \int_0^{L_c} \left| \frac{\partial^2 \vec{r}}{\partial s^2} \right|^2 ds, \quad (3.5)$$

que é o modelo de Kratky-Porod.

3.6.2 Elasticidade no Regime Entrópico

Uma cadeia formada por pequenas partes sujeitas a diferentes rotações e conformações pode estar em diferentes formatos no transcorrer do tempo. Esses modos de conformação (configurações possíveis), dependerão muito da constituição da cadeia e do meio ao qual a cadeia está imersa, em outras palavras, dependerão da rigidez flexional da cadeia e de sua constante agitação no referido meio. O DNA é uma cadeia biopolimérica flexível de comprimento de contorno (L_c) fixo e bem definido [35]. Em solução o estresse torsional levará a cadeia a buscar uma conformação de equilíbrio termodinâmico com o meio. Ao contarmos o número de configurações possíveis para essa cadeia, estaremos na verdade medindo sua entropia. Analisando a figura 3.11 notaremos que a entropia tende a zero para o caso em que a curvatura tem raio infinito (conformação de haste rígida) e tenderá a uma maximização quanto maior for o número de dobras que o DNA vier a sofrer (conformação flexível).

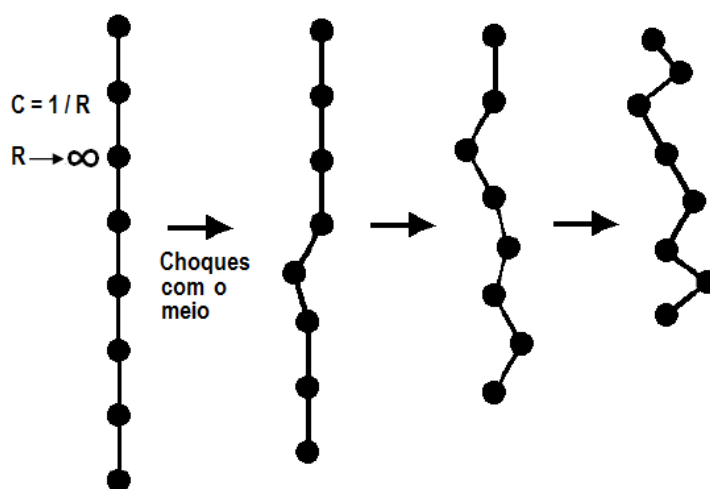


Figura 3.11: **Aumento de entropia do DNA em solução.** A molécula inicialmente estirada sofre colisões com o meio e atinge uma configuração de equilíbrio de maior entropia. Adaptado da referencia [35]

A molécula estará em configuração de equilíbrio no meio quando a entropia for maximizada. A partir da equação da entropia, $S = k_B \ln \Omega$, onde Ω é o número de estados possíveis e k_B a constante de Boltzman comprovaremos que com a haste rígida, a distância ponta a ponta do biopolímero é o próprio comprimento de contorno L_c e a entropia é nula pois $\Omega = 1$. Mas em função dos choques com as partículas do meio, o biopolímero sofre aumento em Ω e consequentemente na entropia. No entanto esses choques não interferem nas propriedades estruturais da molécula e devido às várias formas possíveis nas quais pode se conformar a molécula, dizemos que ela está dotada de elasticidade. Como essa elasticidade apenas resulta em diferentes valores de entropia, ela é dita a elasticidade entrópica da molécula. Nosso interesse nesse trabalho é

testar a interação da molécula de DNA com um fármaco sem no entanto provocar deformações estruturais na mesma, sendo assim trabalhamos dentro do chamado regime entrópico de forças. Quando em solução, se aplicarmos forças às extremidades do DNA iremos forçá-lo até que fique totalmente estirado, como na figura 3.12, no qual o comprimento é o próprio comprimento de contorno (L_c) da molécula.

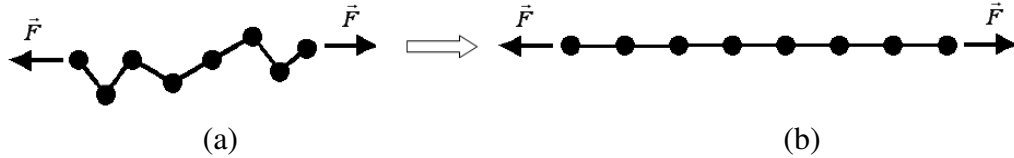


Figura 3.12: **Forças no regime entrópico.** Para estirar e manter o DNA estirado sem desestruturá-lo precisamos aplicar forças dentro do regime entrópico. (a) O DNA começando a ser estirado, (b) DNA mantido estirado. Adaptado da referencia [35]

Uma informação interessante e útil que nos falta até aqui é a medida da rigidez ou da flexibilidade de moléculas poliméricas. A grandeza que mede essas propriedades é o comprimento de persistência (A) da molécula. Retornando a uma análise na figura 3.10, consideremos um pequeno arco s , de ângulo θ , formado entre dois valores consecutivos de $\hat{t}(s)$ para posições arbitrárias quaisquer ao longo da curva δ , lembrando do valor do elemento de arco $s = R\theta$ a energia de curvatura deste arco é dada por:

$$E_{arc} = \frac{k_f s}{2R^2} = \frac{k_f \theta^2}{2s}. \quad (3.6)$$

O intervalo de valores possíveis para o ângulo θ mostra a variação das flutuações na curvatura desse arco e a média dessas flutuações pode ser obtida através do valor quadrático médio de θ , que é definido como:

$$\langle \theta^2 \rangle = \frac{\int \theta^2 \exp(-\beta E) d\Omega}{\int \exp(-\beta E) d\Omega}, \quad (3.7)$$

onde $d\Omega = \sin \theta d\theta d\phi$ é o elemento de ângulo sólido e $\beta = 1/k_B T$, em que T é a temperatura absoluta. Com pequenos valores para s e por meio de técnicas adequadas de integração tem-se como resultado:

$$\langle \theta^2 \rangle = \frac{2s}{\beta k_f}, \quad (3.8)$$

de onde extraímos que a medida do comprimento de persistência do polímero pode ser definida como:

$$A = \beta k_f. \quad (3.9)$$

O comprimento de persistência é, portanto, uma grandeza diretamente proporcional à rigidez flexional do polímero e inversamente proporcional à temperatura absoluta. Quanto maior T mais choques o meio proporciona à molécula, requisitando dela maiores torções, mas se k_f

for de alto valor a molécula admite apenas pequenas torções. Dessa compreensão vemos que quanto maior o valor de A , mais rígida é a molécula e em contrário, mais flexível.

3.6.3 O Modelo da cadeia vermiforme (WLC)

O modelo da cadeia vermiforme (worm-like chain) é uma aplicação do modelo de Kratky-Porod pelo qual nos serão disponibilizadas as intensidades das forças de estiramento do DNA, tanto próximo quanto longe da conformação de equilíbrio. O modelo descreve satisfatoriamente forças dentro do regime entrópico, que está na ordem de $\sim 5 \text{ pN}$ e apesar de ser um excelente modelo (alta precisão), tem limite máximo de aplicabilidade para quando o DNA está estirado a $0,99L_c$ devido a uma divergência quando $z = L_c$. Nossas análises de interação do DNA abrangem valores de forças até $\sim 2,5 \text{ pN}$ e, portanto, adequadas a análises pelo WLC. Veremos, por partes, o desenvolvimento da análise do WLC, começando para estiramentos próximos da conformação de equilíbrio, depois para próximo do limite máximo e finalizando numa expressão generalizada que atende aos dois casos.

Pequenos Estiramentos no WLC

Quando em pequenos estiramentos a lei de Hooke é uma boa aproximação das forças, também pequenas, logo:

$$F = -kz. \quad (3.10)$$

Nesta etapa temos, então, que estimar a constante de força k e a extensão do estiramento z . A extensão do polímero é estimada através da média quadrática da distância entre as extremidades $\langle r_{ee}^2 \rangle$ (vide apêndice A). O valor usado aqui é adequado para quando $A \ll L$ e é dado por:

$$z \cong \sqrt{2AL_c}. \quad (3.11)$$

A partir da equipartição da energia próximo da conformação de equilíbrio temos:

$$\frac{3}{2}k_B T = \frac{1}{2}kz^2. \quad (3.12)$$

Podemos obter a constante de mola k fundindo as equações 3.11 e 3.12, e substituindo o resultado em 3.10 obtemos a expressão da força nessas condições:

$$F = -\frac{3k_B T}{2A} \frac{z}{L_c}. \quad (3.13)$$

Estiramentos próximos ao limite no WLC

Para a condição de maiores estiramentos da molécula, estaremos longe da conformação de equilíbrio e a Lei de Hooke não mais se adequa. Precisamos recorrer à expressão de energia do modelo de Kratky-Porod fazendo uma correção ao retirar o trabalho da força necessária para manter a molécula totalmente estirada, assim:

$$E_{WLC} = \frac{1}{2} k_f \int_0^{L_c} \left| \frac{\partial \hat{t}}{\partial s} \right|^2 ds - Fz, \quad (3.14)$$

onde os parâmetros são todos já definidos e F é a força que mantém a molécula estirada. Aqui também faremos uso da média quadrática da distância entre as extremidades $\langle r_{ee}^2 \rangle$ (*vide apêndice A*) que nos fornece $z \sim L_c$. Como o DNA estará totalmente estirado o vetor $\hat{t}(s)$ é praticamente paralelo à curva $\vec{r}(s)$ que descreve a conformação da molécula e sua componente t_z se mantém praticamente constante e é muito maior que suas componentes t_x e t_y .

Uma vez que o módulo do vetor $\hat{t}(s)$ é $t^2 = t_z^2 + t_x^2 + t_y^2 = 1$ e as componentes x e y são pequenas e praticamente perpendiculares a $\vec{r}(s)$, temos que $t_x^2 + t_y^2 = t_\perp^2$ e assim $t_z = \sqrt{1 - t_\perp^2}$. No entanto $t_\perp^2 \ll 1$ sendo razoável uma aproximação de primeira ordem que nos fornece dois resultados;

$$t_z \cong 1 - \frac{t_\perp^2}{2} \quad \text{e} \quad z \cong \int_0^{L_c} t_z(s) ds. \quad (3.15)$$

Devido ainda à consideração acerca da constância de t_z podemos substituir $\partial t / \partial s$ por $\partial t_\perp / \partial s$ na equação 3.14, que junto com as proposições em 3.15 fornece:

$$\begin{aligned} E_{WLC} &= \frac{1}{2} k_B T A \int_0^{L_c} \left| \frac{\partial \hat{t}_\perp}{\partial s} \right|^2 ds - F \int_0^{L_c} \left(1 - \frac{t_\perp^2}{2} \right) ds = \\ &= \frac{1}{2} k_B T \int_0^{L_c} \left[A \left| \frac{\partial t_\perp}{\partial s} \right|^2 + \frac{F}{k_B T} |t_\perp|^2 \right] ds - F L_c. \end{aligned} \quad (3.16)$$

A transformada de Fourier pode decompôr a energia em modos normais fazendo:

$$\tilde{t}_\perp(q) = \int \exp(iqs) t_\perp(s) ds, \quad (3.17)$$

que substituída em 3.16 fornece como resultado final,

$$E_{WLC} = \frac{1}{2} k_B T \int \frac{1}{2\pi} \left[Aq^2 + \frac{F}{k_B T} \right] |\tilde{t}_\perp|^2 dq - F L_c. \quad (3.18)$$

Este resultado é particularmente importante, pois ele permite calcular o valor quadrático médio de $t_\perp$ que nos levará à expressão que estamos procurando para a força no regime de estiramentos longe do equilíbrio. No entanto os procedimentos deste cálculo não nos é de extrema relevância para mostrar aqui e pode ser acompanhado em detalhes na referência [26]. Vamos, então, usar diretamente o valor encontrado nesses cálculos:

$$\langle t_\perp^2 \rangle = \sqrt{\frac{k_B T}{F A}}. \quad (3.19)$$

Neste ponto precisaremos lançar mão de uma aproximação mais, que é bastante razoável pois se dividirmos o estiramento z pelo valor do comprimento de contorno do DNA é natural esperarmos encontrar a componente escalar ao longo de z do vetor unitário, ou seja, $z/L_c \cong t_z$ que por sua vez leva a,

$$\frac{z}{L_c} \cong 1 - \frac{t_\perp^2}{2} \implies \frac{z}{L_c} \cong 1 - \frac{1}{2} \sqrt{\frac{k_B T}{F A}}, \quad (3.20)$$

que do rearranjo de termos finalmente podemos retirar o valor procurado para a força de estiramentos no limite máximo do WLC,

$$F = \frac{1}{4} \frac{k_B T}{A} \left[\frac{1}{\left(1 - \frac{z}{L_c}\right)^2} \right]. \quad (3.21)$$

Expressão para Estiramentos Arbitrários

Obtemos, então, expressões com validades apenas nos extremos do estiramento do biopolímero DNA. Seria natural esperarmos que a expressão de forças para grandes estiramentos contivesse de alguma forma a expressão para pequenos estiramentos. Se no entanto tentarmos uma expansão em primeira ordem da última expressão encontrada, veremos que não é possível encontrar diretamente a primeira expressão. Para resolver esse problema, Marko e Siggia [36] propuseram uma interpolação de dois termos que fossem insignificantes na expressão de grandes forças ($z \sim L_c$), mas que na expansão em primeira ordem nos levasse à obtenção da expressão da força para pequenos estiramentos. Estes dois termos, z/L_c e $-1/4$, são somados à

expressão de forças de estiramentos longe do equilíbrio, resultando:

$$F = \frac{k_B T}{A} \left[\frac{z}{L_c} + \frac{1}{4(1 - \frac{z}{L_c})^2} - \frac{1}{4} \right], \quad (3.22)$$

e, assim, chegamos à expressão que pode ser usada para estiramentos arbitrários para uma cadeia de polímeros semiflexíveis. Cabe aqui uma ressalva para lembrar de um limite geral, que já foi citado, mas devido a sua importância devemos enfatizá-lo. Essa equação está dentro de um limite de aplicabilidade para o regime entrópico, que permite estiramentos sem desestruturar quimicamente a molécula. Ultrapassar esse regime seria adentrar no regime entálpico, que não é nosso interesse aqui [25, 26, 34, 36].

3.7 Equilíbrio químico nas interações DNA-Ligantes

Neste item estudaremos o equilíbrio químico da interação do DNA com os chamados ligantes do DNA, visando a posterior compreensão da interação do DNA com o ligante Hoechst(33258). As interações do DNA tem sido amplamente estudadas nos últimos anos com o intuito de caracterizá-las a partir de cada ligante interagente. É muito comum que um único ligante seja estudado através de uma gama enorme de técnicas de observação, devido sempre à importância do uso desses ligantes no combate a doenças, como por exemplo o câncer. O uso de muitas técnicas se deve ao avanço que cada uma consegue proporcionar e também às suas limitações, uma ampliando os horizontes da outra.

O DNA interage com várias substâncias e com muitos propósitos diferentes, em ambientes totalmente dinâmicos. A interação do DNA com enzimas e proteínas é um processo natural e espontâneo no interior das células, cumprindo funções específicas que visam a promoção e manutenção da vida, em escalas micro e macroscópicas, sem necessidade de quaisquer manipulações ou controles externos. As reações obedecem a leis de equilíbrios em processos químicos, físicos e termodinâmicos.

Os ligantes podem se associar à molécula do DNA de muitas formas diferentes, podendo intercalar entre os pares de base, interagir através da fenda menor e também da fenda maior e ligar-se covalentemente com as bases. Geralmente, nessas ligações os ligantes, mesmo que interagindo da mesma forma se associa a sítios específicos dos pares de base, como AATT ou CGCG, etc.

Para nossos objetivos, estaremos interessados nos parâmetros físico-químicos que regulam a interação da molécula de DNA com ligantes. Em geral, o equilíbrio químico é alcançado ao se igualar o fluxo médio entre partículas de partes distintas de um sistema. Neste trabalho

tomaremos como sistema a solução contendo as moléculas de DNA e as moléculas do ligante, sendo estas duas últimas distintas partes do sistema. As associações dessas moléculas podem ser representadas pela seguinte reação química:



onde K_i e K_d são, respectivamente, as constantes químicas intrínsecas de associação e dissociação da reação, também conhecidas como constantes termodinâmicas ou macroscópicas, e A,B e C são as substâncias distintas do sistema. As constantes são definidas em termos das concentrações molares das substâncias envolvidas, ou seja,

$$k_i = \frac{[C]}{[A][B]} \quad \text{e} \quad k_d = \frac{[A][B]}{[C]} = k_i^{-1}. \quad (3.24)$$

3.7.1 Modelo de Hill

Para tratar apropriadamente essas reações, renomearemos os termos. Seja $[A] \equiv C_f$ a concentração de ligantes livres em solução, $[C] \equiv C_b$ a concentração de ligantes ligados ao DNA e $[B] \equiv C_{bp} - C_b$, onde C_{bp} é a concentração de pares de base do DNA (uma constante do sistema).

Uma reação simples como a 3.23 formula diretamente o modelo conhecido como Modelo de Scatchard, no qual não se considera a possibilidade de uma associação influenciar em novas formações, ou seja, as associações são independentes umas das outras. No entanto, no sistema em que trabalhamos, associações podem sofrer influências umas das outras, vindo a favorecer ou atrapalhar as próximas associações, sendo esta a origem da cooperatividade de Hill.

A. V. Hill propôs esse modelo para explicar a interação do oxigênio com a hemoglobina, pois essa reação, de acordo com observações empíricas, obviamente não se adequava à cinética dos modelos anteriores. Hill passa a considerar a possibilidade dos sítios de ligação admitirem dois ou mais ligantes e ainda, que após o primeiro ligante se associar ele poderá cooperar positiva ou negativamente com a associação de outros ligantes no sítio em questão. Para ilustrar, imaginemos a seguinte reação:



onde o produto final representa a molécula B associada com n moléculas de A. Essas reações químicas são representadas por uma constante de associação aparente k_A , que é definida como:

$$k_A = \frac{[B(A)_n]}{[B][A]^n}. \quad (3.26)$$

A constante aparente representa a reação global, quando n moléculas do ligante interagem com uma única molécula do substrato, enquanto a constante intrínseca definida anteriormente representa a reação de uma única molécula de ligante com um único sítio de ligação do substrato. Quando o substrato possui apenas um sítio de ligação, estas duas constantes são idênticas. No entanto o processo de ligação pode se dar com uma molécula associando após a outra, se todas as associações disporem de constantes intrínsecas iguais, podemos facilmente ver que é válida a relação:

$$k_A = k_i^n. \quad (3.27)$$

Reescrevendo a equação para k_A de acordo com os termos definidos inicialmente, temos:

$$k_A = \frac{C_b}{C_f^n(C_{bp} - C_b)} \quad (3.28)$$

e se dividirmos a equação por C_{bp} veremos que aparece um termo de C_b/C_{bp} que denotaremos por r . Esse termo representa a fração de sítios ligados e inserindo-o junto com a relação 3.27 na equação 3.28 acima teremos:

$$k_i^n = \frac{r}{C_f^n(1 - r)} \quad (3.29)$$

e rearranjando a equação para r temos,

$$r = \frac{(k_i C_f)^n}{1 + (k_i C_f)^n}. \quad (3.30)$$

Essa equação é conhecida como *equação de Hill* ou *isoterma de ligação de Hill* e o parâmetro n é o *coeficiente de Hill*. A isoterma de ligação recebe esse nome por descrever experimentos que devem ser realizados a temperatura constante, uma vez que grandezas químicas importantes como por exemplo k_i podem apresentar variações com a temperatura. Ela é uma curva que

relaciona a fração ligada de ligante por substrato (r) com a concentração de ligante livre em solução (C_f). Uma vez determinada, seja experimentalmente ou teoricamente, esta curva permite o conhecimento de diversas propriedades físico-químicas do sistema.

Para completar essa equação temos que levar em conta um fato a mais, que é a possibilidade do ligante ocupar mais que um par de base, nesse caso a fração ligada estaria limitada a um valor máximo. Caso tivéssemos um ligante por par de base, no equilíbrio e com a solução saturada teríamos $r = 1$. Então, para o caso de um ligante ocupando mais que um par de base o valor de r seria menor que a unidade. Da forma como foi elaborada, essa equação não prevê essa possibilidade. Podemos remover a limitação introduzindo um termo que estabelece a fração ligada máxima, ou seja, r_{max} . Assim, a equação se torna

$$r = \frac{r_{max}(k_i C_f)^n}{1 + (k_i C_f)^n}. \quad (3.31)$$

O coeficiente de Hill possui interpretações de enorme relevância na análise dos modos de formação do complexo DNA-ligante. A figura 3.13 evidencia alguns valores de n em curvas típicas da fração de sítios ligados (r) em função da concentração de ligantes livres (C_f), com valores fixos da constante de associação $k_i = 10^4 M^{-1}$ e da fração máxima ligada $r_{max} = 1$.

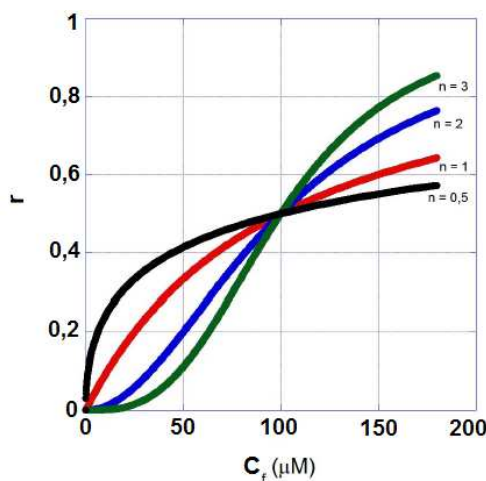


Figura 3.13: **Gráfico modelo para o coeficiente de Hill.** Alguns valores de n com valores fixos de $r_{max} = 1$ e $k_i = 10^4 M^{-1}$. Extraída das notas de aula do curso “Interação entre biomoléculas” de Márcio S. Rocha.

Observamos que um maior valor do coeficiente de Hill implica numa saturação da curva para menores valores da concentração de ligantes ($r_{max} = 1$), sugerindo uma maior afinidade química do ligante pelo substrato quanto maior for n . Então, podemos concluir a ideia da

cooperatividade do modelo de Hill relacionando-a ao parâmetro n . Em resumo,

- i-* Se $n > 1$, aumenta a afinidade do ligante pelo substrato depois da ocorrência das primeiras associações. **Cooperatividade positiva,**
- ii-* Se $n < 1$, diminui a afinidade do ligante pelo substrato depois da ocorrência das primeiras associações. **Cooperatividade negativa,**
- iii-* Se $n = 1$, a afinidade é independente do número prévio de ligantes ligados ao substrato. **Interação não-cooperativa.**

Esta é de fato a interpretação mais aceita e usada na literatura sobre o coeficiente de Hill. Mais apropriadamente podemos interpretá-lo como um limite inferior para o número de sítios que cooperam efetivamente.

Capítulo 4

Caracterização do complexo DNA-Hoechst com pinça ótica e videomicroscopia

Neste capítulo apresentaremos algumas das principais características biológicas do ligante conhecido como Hoechst(33258) que justificam suas aplicações clínicas. Veremos também todo o processo de preparação das amostras de trabalho junto com a metodologia de trabalho de análise das propriedades mecânicas do DNA e dos complexos DNA-Hoechst(33258).

4.1 O ligante Hoechst(33258)

O Hoechst(33258) tem essa designação por pertencer a um lote de produtos desenvolvidos pela empresa Hoechst Pharmaceutical Company que tem por costume enumerar os fármacos elaborados em seus laboratórios. Ele é um derivado sintético de N-metilpiperazine e é o composto precursor de uma família de corantes conhecida como bisbenzimidides ou bisbenzimidazoles. É uma molécula longa e flexível com uma de suas extremidades carregada positivamente. Possui um grupo doador e um grupo receptor com possível ligação de hidrogênio entre eles e em solução é uma molécula mono catiônica com grande atividade eletroquímica. Esse comportamento eletroquímico tem sido amplamente estudado através de sua interação com o DNA [15–17, 37–43]. Uma designação citada como sinônimo para ele é $2' - (4\text{hydroxyphenyl}) - 5 - [5 - (4 - \text{methylpiperazine} - 1 - \text{yl})\text{benzimidazo} - 2 - \text{yl}] - \text{benzimidazole}$ ou ainda *phenol – benzimidazole – benzimidazole – piperazine*, sendo uma molécula muito bem descrita e amplamente usada em aplicações bioquímicas. É um composto com dois anéis de

benzeno, um anel piperazine e um grupo fenol de fórmula molecular $C_{25}H_{24}N_6O$ e de estrutura planar como mostrado na figura 4.1.

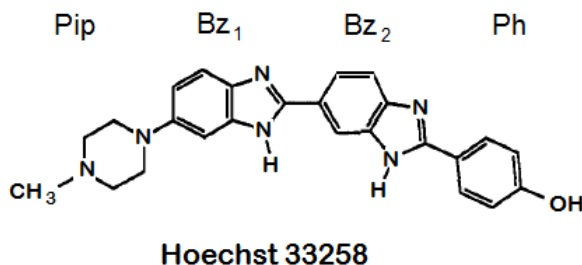


Figura 4.1: **Estrutura planar da molécula Hoechst(33258).** Este ligante possui quatro unidades estruturais; um anel fenol (*Ph*), dois anéis benzimidazole (*Bz₁* e *Bz₂*) e um anel piperazine (*Pip*). Adaptada do trabalho “*Mitochondrial DNA topoisomerase I is involved in organello RNA synthesis*” de autoria de Konstantinov, YM, Subota, IY, Tarasenko, VI, Grokhovsky, SL, Zhuze, AL da universidade de Oslo.

O Hoechst(33258) é um ligante que possui aplicações clínicas sendo um fármaco eficaz anti-helmíntico, mas tem tido como função principal ser um potente marcador fluorescente citológico para a molécula do DNA. Em soluções de pH neutro, as moléculas de Hoescht(33258) são excitadas com radiação cujo comprimento de onda é $\sim 360nm$ e exibe fraca fluorescência por volta de $\sim 510nm$ quando livres, mas tem sua eficiência fluorescente aumentada emitindo em $\sim 460nm$ quando associadas a uma molécula de DNA. Além disso, o Hoechst(33258) tem grande potencial para uso em tratamentos anticancerígenos em função de sua forte interação com o DNA. Há trabalhos que acusam uma ação inibidora de enzimas (topoisomerase e a helicase) pelo Hoechst(33258), nos processos de transcrição e replicação do DNA, indicando que esta molécula pode ser muito útil para a concepção de novos fármacos para a regulação gênica [15, 17].

Na interação, o Hoechst tem preferência em se associar à fenda menor do DNA, especificamente em regiões ricas de pares de base Adenina-Timina (AT) e com grande afinidade por sítios sequenciais AATT. No entanto, diversos trabalhos apontam para uma possibilidade a mais de formação dos complexos Hoechst-DNA mostrando que o Hoechst pode intercalar em regiões ricas em pares GC, embora essa última tenha fraca afinidade. Sendo assim, podemos dizer que o Hoechst possui dois modos de ligação ao DNA, atuando fortemente como ligante de fenda menor e fracamente como intercalante [15–17, 37–39, 43].

4.2 Esquema de montagem da pinça e da videomicroscopia

Representamos na figura 4.2 os equipamentos usados em nossos experimentos. A emissão do laser de fibra dopada com itérbio (IV) é estimulada pelo aparelho IPG Photonics que o envia em perfil gaussiano e formato cilíndrico com um comprimento de onda $\lambda = 1064 \text{ nm}$, potência máxima de $5,8 \text{ W}$ e operando no modo TEM_{00} . A radiação emitida passa por um conjunto de espelhos que possibilitam seu alinhamento. Entre as linhas pontilhadas esquematizamos o microscópio invertido Nikon Ti-S, com objetiva de ótica corrigida no infinito, aumento de $100X$ e abertura numérica $NA = 1,4$. O laser chega ao microscópio pelo espelho dicroico E_3 de alta transmitância para a luz visível e alta reflectância para a radiação infravermelha. Deste espelho temos uma saída para duas câmeras CCD que por sua vez possuem saídas para o monitor de visualização do experimento e para o computador, permitindo assim o acompanhamento e o armazenamento dos dados. Após atravessar a objetiva o feixe infravermelho se torna cônico, construindo o foco onde estará o poço potencial de aprisionamento.

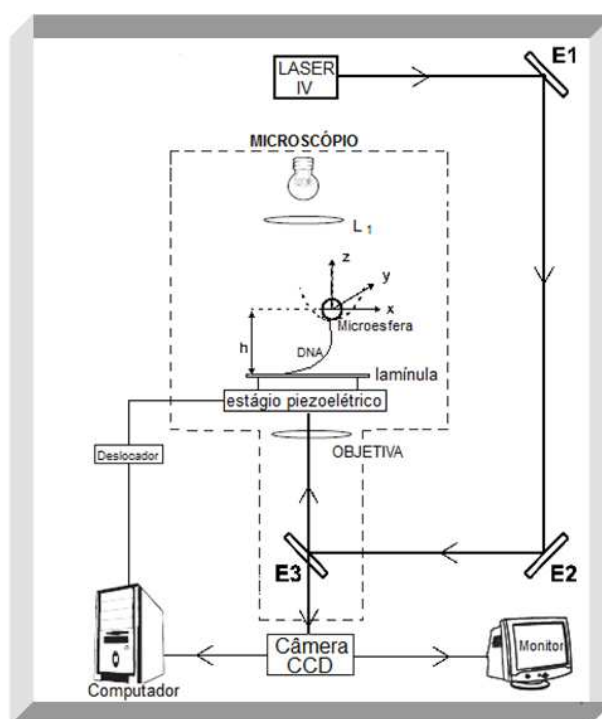


Figura 4.2: Montagem experimental

O computador controla o estágio piezoelétrico de movimentação, através de um deslocador que faz o controle de deslocamentos e velocidades com precisão nanométrica em qualquer direção desejada. A lente L_1 representa o condensador do sistema de iluminação que ilumina o porta amostra de trabalho, aqui representado pela lamínula. No porta amostra está contida

nossa solução aquosa com DNA's e microesferas. Note que esquematizamos a microesfera aprisionada no poço, cujo centro de massa se encontra a uma altura h da lamínula.

4.3 Calibração da pinça ótica

Como vimos nas teorias de pinças óticas (capítulo 2), independentemente do intervalo de aprisionamento de partículas, é muito importante saber a intensidade das forças óticas. Para atingir análises corretas do equilíbrio das partículas em solução, como pretendemos, precisamos calibrar a pinça ótica considerando as variáveis do sistema, como movimentos brownianos e forças de arraste devido à movimentação da solução. Também como já dito, o pinçamento é possível quando se forma um poço de potencial tridimensional na região do foco de uma lente objetiva. A figura 4.3(a), mostra o caso em que não há fluxo do fluido em volta e a microesfera pinçada se encontra no fundo do poço de potencial. Já em 4.3(b) através de uma movimentação no sistema é gerado um fluxo e a microesfera sofre uma força de arraste, denominada força de Stokes, e por estar presa à pinça encontrará uma nova posição de equilíbrio quando as intensidades das forças se igualarem.

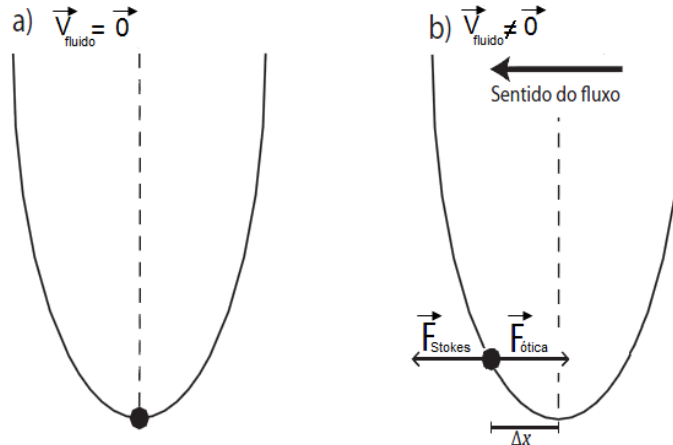


Figura 4.3: **Poço potencial de aprisionamento da pinça ótica.** (a) Microesfera pinçada antes de se estabelecer fluxo. (b) Microesfera pinçada em novo equilíbrio devido ao fluxo.

Nos dois casos podemos dizer que o poço é um potencial aproximadamente harmônico, por ser do tipo $\frac{1}{2}kx^2$. A partícula está sempre numa posição de equilíbrio e sob a ação de várias forças, inclusive uma restauradora, que é a força da pinça. Sempre que o choque com as partículas do meio tender a tirar a microesfera do equilíbrio a pinça atua com uma força que lhe restaura o mesmo. Diante destas considerações podemos compreender a força da pinça como proporcional ao deslocamento sofrido pela microesfera e a uma constante de restauração, ou

seja $F_{ótica} = k\Delta x$. Agora, temos que determinar o valor da constante k para em fim sabermos a intensidade da força ótica. Como na presença de um fluxo, a média dos movimentos brownianos é nula, podemos afirmar que no equilíbrio a força ótica se igualará à força de Stokes ($F_{ótica} \cong F_{Stokes}$) e usaremos este fato para calibrarmos a pinça pelo *método de Stokes*. Este método consiste em gerarmos um fluxo na solução em que se encontra a microesfera com velocidade conhecida e medir o deslocamento da microesfera em relação à situação inicial, com a solução em equilíbrio hidrostático. Conseguimos o fluxo movimentando o estágio do microscópio no qual está presa a solução aquosa contendo as microesferas. O módulo da força de Stokes é dado por:

$$F_s = \gamma v, \quad (4.1)$$

onde v é a velocidade do fluxo e γ é o coeficiente de atrito viscoso sobre a microesfera em solução aquosa cujo valor é estimado por [26]:

$$\gamma = 6\pi\eta a \left[1 - \frac{9}{16} \left(\frac{a}{h} \right) + \frac{1}{8} \left(\frac{a}{h} \right)^3 - \frac{45}{256} \left(\frac{a}{h} \right)^4 - \frac{1}{16} \left(\frac{a}{h} \right)^5 + \dots \right]^{-1}, \quad (4.2)$$

em que $a = 2 \mu m$ é o raio da microesfera, $h = 3,5 \mu m$ é a altura da microesfera em relação ao fundo do recipiente em que está a solução e é encontrada movimentando-se o foco do laser. O raio e a altura são ambos constantes. E ainda temos η como a viscosidade da solução aquosa e que é calculado por [26]:

$$\eta = 10^{-3} \left[0,26 + 1,51 \exp \left(\frac{-t_c}{29} \right) \right], \quad (4.3)$$

onde t_c , a temperatura em graus Celsius, é determinada simultaneamente no ambiente durante a calibração e passa a ser uma constante durante os experimentos de estiramento do DNA, a fim de garantir maior precisão na intensidade da força ótica.

Escrevendo, então, as expressões das forças consideradas na calibração e isolando a constante de força para a pinça, teremos;

$$k = \frac{\gamma v}{\Delta x}. \quad (4.4)$$

Agora o que temos a fazer é encontrar o valor de Δx . Podemos calculá-lo, fazendo uma filmagem do experimento, com auxílio do programa *StreamPix*. O valor que calcularemos para Δx será um valor médio, obtido por meio de repetições do procedimento descrito a seguir em diferentes velocidades e com diferentes microesferas:

- i- Preparamos uma solução tampão aquosa (Phosphate Buffer Saline (PBS)) e nela colocamos certa quantidade das microesferas.
- ii- Levamos essa solução ao microscópio prendendo-a ao estágio piezoelétrico que tem controle de velocidade feito pelo computador.

- iii-* Filmamos inicialmente a microesfera no mínimo (fundo) do poço potencial por ≈ 5 segundos.
- iv-* Colocamos o estágio em movimento e filmamos por ≈ 10 segundos.
- v-* Ao parar, filmamos novamente na nova posição por ≈ 5 segundos.

Após as filmagens, de posse da relação de equilíbrio pixel/micrômetro e da taxa de captura da câmera facilmente convertemos pixel e frame nas unidades de interesse, micrômetro e segundo, com auxílio do programa *ImageJ*. Assim, determinados Δx e v . Substituindo esses valores na equação 4.4 obtemos a constante de força da pinça. Este método garante excelente precisão ao valor da constante e é de muito fácil realização.

4.4 Procedimento experimental

Nesta seção discorreremos sobre o procedimento seguido para obtenção dos dados experimentais. Primeiramente descreveremos as etapas e processos dos estiramentos do DNA e do complexo DNA-ligante e depois o preparo das amostras. Essa ordem de apresentação pretende dar primeiro uma visão mais direta e prática para depois minuciar os passos.

4.4.1 Obtendo dados do estiramento do DNA e do complexo DNA-ligante

Nosso trabalho experimental tem como tarefa extrair propriedades mecânicas do complexo DNA-Hoechst(33258) que serão usadas para obter parâmetros físico-químicos do mesmo. Na extração dessas propriedades procuramos garantir que as moléculas estarão submetidas a forças baixas, pois existem evidências experimentais e teóricas de que é isto que ocorre no interior das células [44]. Assim, acreditamos disponibilizar dados confiáveis para possíveis aplicações em áreas afins.

Assim como na seção anterior, faremos o pinçamento das microesferas, porém com a diferença de que agora elas estarão ligadas a uma extremidade do DNA. No entanto, apenas uma extremidade do DNA fixada não possibilita sua submissão ao estiramento. Como indica a figura 4.4, somente o DNA preso pelas duas extremidades poderá ser tensionado. Seguimos um protocolo (detalhado na próxima seção) que possibilita a ligação de uma das extremidade

do DNA (ou do complexo) à microesfera e a outra ao fundo da lamínula do porta amostra, que nos permite tensionar o DNA e extrair suas propriedades mecânicas.

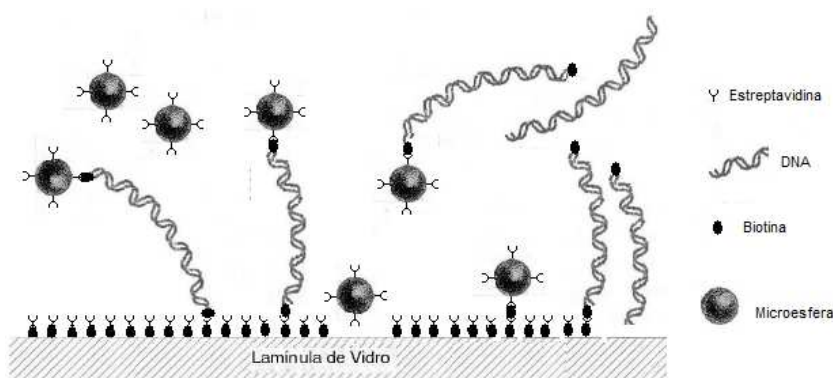


Figura 4.4: **Possíveis configurações da solução no porta amostra.** Adaptada da referência [26]

Começamos essa parte do experimento na busca por um conjunto ideal de microesfera-DNA. Inicialmente nossa preocupação é encontrar uma microesfera suspensa na solução com o DNA duplamente preso, como já dito. Essa busca não é simples, pois como visto na figura 4.4, há muitas configurações possíveis para as microesferas e o DNA. As microesferas podem estar: completamente livres em solução, presas a um DNA que tem sua outra extremidade solta ou presa a outra microesfera, presas a várias moléculas de DNA e grudadas na lamínula. As moléculas de DNA presentes na solução podem estar também soltas e/ou presas ao fundo da lamínula. A busca inicial é manual, movimentamos o estágio piezoelétrico pelos seus parafusos de movimentação até que uma microesfera seja pinçada, depois deslocamos o estágio suavemente. Caso haja DNA duplamente preso, agindo como uma mola distendida, a esfera escapará da pinça. Encontrado o conjunto microesfera-DNA, temos que saber se há somente uma molécula de DNA presa, para isso estiramos o DNA em várias direções para termos a impressão que a distância deslocada é a mesma em todas as direções, como simula a figura 4.5. Embora este método não garanta somente um DNA preso, é o melhor e mais forte indício que temos.

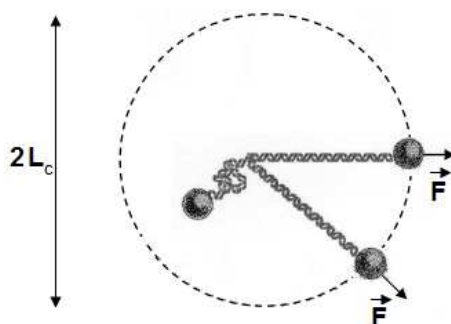


Figura 4.5: **Direção de estiramento para testar uniformidade.** Adaptada da referência [26].

Encontrado o conjunto ideal, necessitamos saber se o DNA atende às condições de um bacteriófago λ padrão ($L_c \cong 16,5 \times 10^{-6} m$ e $A \cong 50 \times 10^{-9} m$). Com a microesfera pinçada, programamos o deslocamento e a velocidade e simultaneamente iniciamos o filme e a movimentação do piezo. Os filmes são tratados para a conversão dos dados, como vimos na seção 4.3, e estes dados são aplicados na expressão de Marko e Siggia, dada pela equação 3.22. O modelo WLC se ajusta bem aos nossos dados [20, 25]. No entanto, o deslocamento será ao longo do eixo x e utilizaremos na análise apenas a componente da força ao longo desse eixo. A figura 4.6 mostra a direção do estiramento e a decomposição da força de estiramento.

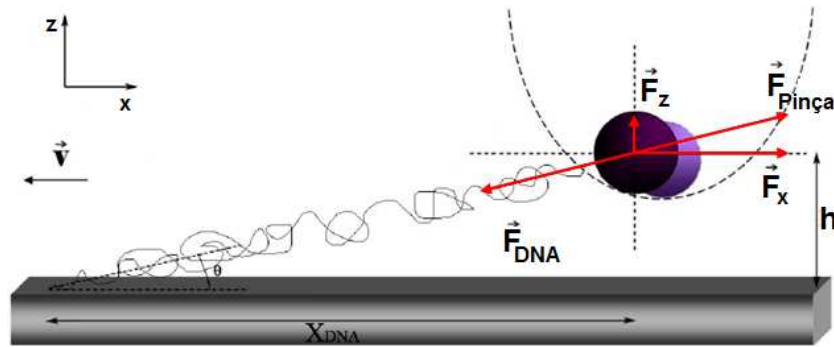


Figura 4.6: Estiramento do DNA ao longo de sua extensão. Note $F_x = F \cos \theta = F(x_{DNA}/z)$ e $z = \sqrt{x_{DNA}^2 + h^2}$. A microesfera sofre forças de módulos iguais pela pinça e pelo DNA. Adaptada da referência [26].

Consideramos somente as forças da pinça e do DNA pois usamos uma velocidade constante e de baixa intensidade ($v = 0,01 \mu m/s$) em nossos experimentos. Assim, a força de Stokes é desprezível e estamos no regime quase estático. Com $F_x = F \cos \theta = F(x_{DNA}/z)$ e $z = \sqrt{x_{DNA}^2 + h^2}$, a equação de Marko e Siggia ao longo da direção x fica:

$$F = \frac{k_B T}{A} \left[\frac{\sqrt{x_{DNA}^2 + h^2}}{L_c} + \frac{1}{4(1 - \frac{\sqrt{x_{DNA}^2 + h^2}}{L_c})^2} - \frac{1}{4} \right] \frac{x_{DNA}}{\sqrt{x_{DNA}^2 + h^2}}. \quad (4.5)$$

Com h , k_B e T constantes, o ajuste da curva de F_x em função de x fornecerá com precisão os parâmetros mecânicos A e L_c . Para o tratamento dos dados usamos o programa Kaleida-Graph, que na figura 4.7 mostra uma curva de força típica da molécula de DNA pura (forma nativa). Este gráfico apresenta os dados de um DNA usado neste trabalho. Depois dos ajustes continuaremos o experimento com essa molécula de DNA se ela estiver dentro dos padrões do bacteriófago λ , se não, reiniciaremos a busca pelo conjunto ideal. Em nossos experimentos tivemos que refazer essa busca inúmeras vezes, pois no processo de manipulação parte das moléculas do DNA são danificadas. Quando o conjunto é o ideal, realizamos o estiramento com ele repetidamente seis vezes, almejando uma média para maior confiabilidade dos dados. Em

nossos experimentos obtivemos uma média de $L_c = (16,5 \pm 1,0)\mu m$ e $A = (45 \pm 5)nm$, para cerca de 30 moléculas de DNA diferentes. Estes valores concordam com aqueles reportados na literatura para o λ -DNA padrão [13, 26, 31–33].

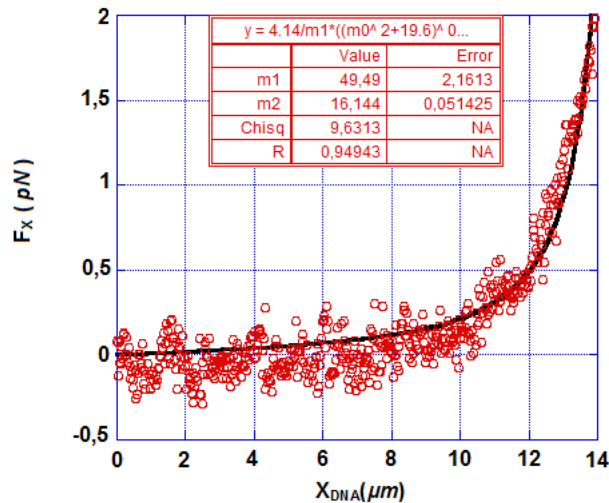


Figura 4.7: **Curva de força típica de um DNA em sua forma nativa.** Note o valor máximo de $2pN$ para a força dentro do regime entrópico e também os valores de ajuste do KaleidaGraph no qual $m1$ representa o comprimento de persistência e $m2$ é o comprimento de contorno.

O trabalho até este ponto foi feito com o DNA em sua forma nativa, ou seja, livre da adição de ligantes. O DNA que atende aos requisitos dos dados padrões está agora pronto para receber a adição de diferentes concentrações das moléculas ligantes, a fim de estudarmos suas interações. Assim como fizemos com o DNA na forma nativa, repetiremos para cada concentração do ligante, seis estiradas do complexo DNA-ligante. Trabalhamos com doze concentrações diferentes, de $1\mu M$ até $12\mu M$, inicialmente com alíquotas pares e depois com as ímpares, adicionando portanto $2\mu M$ para cada seis estiradas. Depois de coletar informações com alíquotas pares e ímpares, fizemos os experimentos com adição em sequência de um a um micromolar do ligante Hoechst(33258). Após a adição de cada concentração, esperávamos $\sim 20min$ para que o ligante atingisse o equilíbrio com o DNA. Transcorrido esse tempo verificávamos uniformidades nas curvas de extensão a cada estiramento, indicando o equilíbrio químico. Como dito acima, repetimos o procedimento seguidamente para várias moléculas usando diferentes amostras. Os cálculos dos comprimentos de contorno e persistência, dos DNA's nativos e dos complexos formados, tiveram suas barras de erro apresentadas em função das médias de todas as moléculas.

A figura 4.8 mostra o esquema de nosso porta amostra, que trata-se de uma câmara fechada com canais microfluídicos para troca das alíquotas do ligante. Essa troca era feita com a microesfera pinçada. Injetávamos com uma seringa, bem lentamente, em uma das extremidades do

canal, a solução contendo o Hoechst(33258). O processo de troca exigia muito cuidado para que não arrancássemos a extremidade do DNA da lamínula. Para cada experimento, construíamos um novo porta amostra e determinávamos seu volume, para que durante a troca injetássemos solução suficiente que garantisse ao DNA estar realmente submetido à concentração desejada do Hoechst(33258).

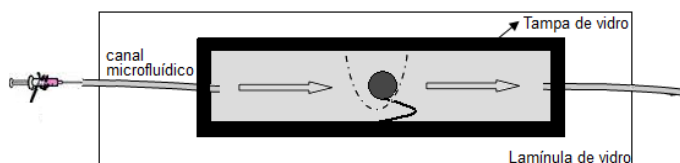


Figura 4.8: Esquema do porta amostra e troca de alíquota. Note a microesfera pinçada e o DNA duplamente preso.

4.4.2 Preparo das amostras

Trabalhamos com amostras de DNA do fago- λ biotinizadas em uma solução salina tamponada com concentração de $[NaCl] = 140\text{ mM}$. O processo de biotinizização, ou seja, de marcar as extremidades do DNA com a proteína biotina, é feito por outro grupo do laboratório. A proteína se liga muito fortemente ao DNA e essa etapa é justificada para seguirmos o protocolo de Amitani [45]. Neste protocolo as extremidades do DNA são ligadas à microesfera e ao fundo da lamínula pela afinidade entre a proteína biotina e estreptavidina, explorando a forte interação entre elas. O motivo de seu uso reside no fato de que apesar de nossas análises serem feitas no regime entrópico, uma ligação fraca do DNA com a microesfera e/ou com a lamínula de vidro aumenta muito a chance do mesmo se soltar durante o experimento. A microesfera já é fornecida pelo fabricante com $2\text{ }\mu\text{m}$ de diâmetro e recoberta com estreptavidina. A lamínula recobrimos durante a montagem do porta amostra. O preparo da solução de DNA e a montagem do porta amostra ocorrem simultaneamente, como se segue:

Construção do porta amostra

- i-* Tomamos uma lamínula de vidro para base da câmara. Dobramos dois pedaços de filme de parafina e colamos sobre a lamínula formando um canal que será a câmara central. Uma mangueira plástica microfluídica é introduzida nas entradas da câmara e com cola araldite garantimos a vedação. Aguardamos 15 min para que seque a araldite.

- ii-* Com a cola seca, acrescentamos na área da câmara $20\ \mu\text{L}$ de BSA-biotinilada (BSA-biot) em solução tampão A¹, na concentração de $1,8\ \mu\text{g}/\text{mL}$ e aguardamos $20\ \text{min}$ em temperatura ambiente até que a área seja toda recoberta.
- iii-* Transcorridos os $20\ \text{min}$ retiramos o excesso de BSA-biot e lavamos a lamínula suavemente com $20\ \mu\text{L}$ de tampão A.
- iv-* Colocamos agora na área da câmara $20\ \mu\text{L}$ de estreptavidina (STP) em solução tampão na concentração de $0,1\ \text{mg}/\text{mL}$ e aguardamos $20\ \text{min}$.
- v-* Repetimos o passo *iii*.
- vi-* Cortamos um pedaço de lamínula para servir de tampa para a câmara. A tampa é colada com araldite e novamente aguardamos $15\ \text{min}$ para que seque completamente.
- vii-* Após a secagem da araldite levamos o porta amostra para o microscópio e o prendemos ao estágio piezoelétrico.

Preparo da solução de DNA

- i-* Colocamos um microtubo (eppendorf) contendo $4\ \mu\text{L}$ de microesferas de poliestireno da solução estoque e $5\ \mu\text{L}$ de λ -DNA previamente biotinilado em banho térmico a $37\ ^\circ\text{C}$ por uma hora. O banho está em temperatura otimizada para a ligação das proteínas. A ligação ocorrerá entre a estreptavidina das microesferas e a biotina na extremidade do DNA.
- ii-* Completada a hora, acrescentamos $3\ \mu\text{L}$ de EDTA² e $88\ \mu\text{L}$ de PBS 7,4 e aguardamos mais $20\ \text{min}$ para homogeneização da solução.
- iii-* Levamos a solução ao microscópio introduzindo-a ao porta amostra com uma seringa.
- iv-* Aguardamos $30\ \text{min}$ até que a estreptavidina do fundo da lamínula e a biotina da extremidade do DNA possam se ligar.

¹O tampão A é uma solução tampão previamente preparada com $10\ \text{mM}$ de MgCl_2 , $40\ \text{mM}$ de KCl , e $25\ \text{mM}$ de Tris HCl em pH 8,0.

²EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) é usado para capturar o excesso de magnésio que possa ter ficado na solução

Capítulo 5

Resultados e discussões

A cada concentração diferente do ligante Hoechst(33258), repetimos sistematicamente todo o procedimento de obtenção das propriedades mecânicas do complexo DNA-Hoechst(33258) e as empregamos em técnicas que auxiliam obter os parâmetros físico-químicos da interação. Neste capítulo mostraremos as técnicas usadas, bem como os resultados obtidos e os discutiremos comparando-os com as expectativas reportadas na literatura.

5.1 Propriedades mecânicas e físico-químicas do complexo DNA-Hoechst(33258)

Antes de seguirmos às análises temos que reconsiderar que em nosso experimento ideal, teríamos uma única molécula do DNA, escolhida no princípio de acordo com os dados padrões para o λ -DNA, submetida a todas as concentrações diferentes do ligante Hoechst(33258). No entanto, muitas vezes durante a troca de concentração do ligante ocorreram problemas que nos forçaram a buscar por uma nova molécula de DNA, levando-nos a adotar um resultado de média entre várias moléculas.

A condensação do DNA pelo Hoechst(33258)

Muitos ligantes são conhecidos por compactar o DNA, sendo alguns deles famosos por

essa interação ao se empregarem em tratamentos anti-tumorais. No trabalho de Saito [16], dentre uma lista, o Hoechst(33258) é referido como o mais efetivo ligante compactante do DNA. Na figura 5.1 nós mostramos as curvas das médias das forças por extensão para algumas concentrações do Hoechst(33258) (C_T) enquanto mantemos fixa a concentração do DNA (C_{bp}). A concentração total do Hoechst(33258) é definida como a soma da concentração de ligantes livres (C_f) com a concentração de ligantes ligados (C_b) em solução. Temos várias curvas traçadas no mesmo sistema de eixos, sendo o gráfico com círculos pretos para o DNA na forma nativa, ou com concentração nula de Hoechst(33258) $C_T = 0$. Os quadrados vermelhos representam o DNA interagindo com $C_T = 2 \mu M$, em amarelo temos $C_T = 6 \mu M$, nos triângulos verdes $C_T = 8 \mu M$ e em azul $C_T = 10 \mu M$. As curvas apresentam análise com valores de forças dentro do regime entrópico de $2 pN$. Observamos que a extensão máxima neste valor, diminui à medida que aumentamos a concentração do Hoechst(33258) na solução, indicando a condensação do DNA por efeito da interação com o Hoechst(33258).

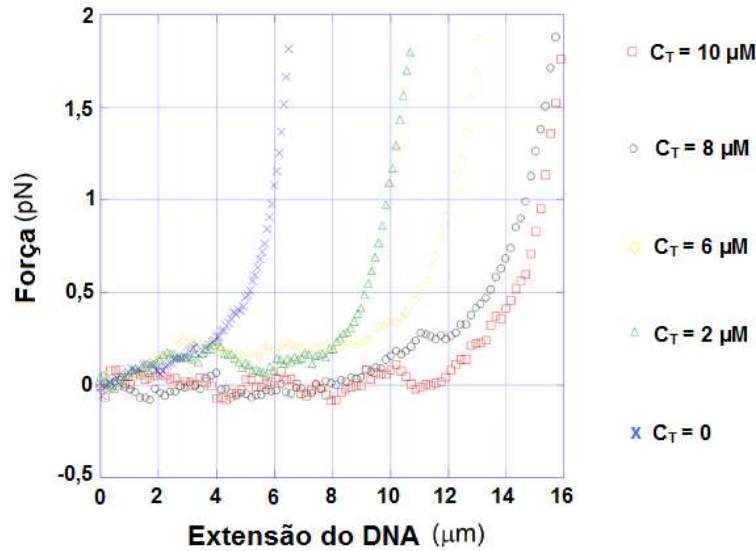


Figura 5.1: Média das curvas de força por extensão para uma concentração fixa de DNA e variadas concentrações de Hoechst(33258) C_T .

O ajuste de nossos dados experimentais, feito pelo modelo WLC, retorna neste caso o comprimento de contorno aparente (L_{app}) e não o real, pois o complexo DNA-Hoechst(33258) condensado não pode ser totalmente estirado no regime entrópico de baixas forças que usamos. Na figura 5.2 apresentamos o comportamento do comprimento de contorno aparente (L_{app}) em função da concentração total (C_T) de Hoechst(33258), onde as barras de erro foram calculadas pelo desvio padrão médio. Nela está evidenciado um comportamento decrescente monotônico quando aumenta-se a concentração total do ligante na amostra, dando à curva uma forma aproximadamente sigmoidal. O decaimento monotônico em forma sigmoidal sugere uma condensação do complexo por processo cooperativo.

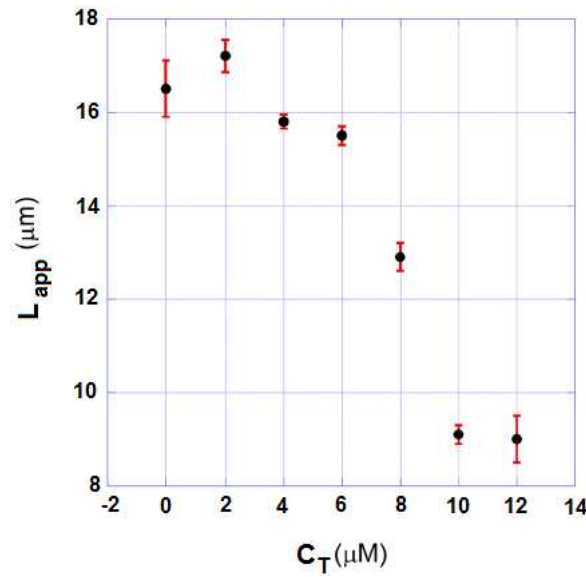


Figura 5.2: **Comprimento de contorno aparente L_{app} por concentração total C_T .** O decaimento monotônico em forma sigmoide sugere uma condensação do complexo por processo cooperativo.

Veremos nas análises do comprimento de persistência do complexo, assim como discutido na seção 4.1, que de fato o Hoechst(33258) apresenta dois modos de ligação diferentes em sua interação com a molécula de DNA, sendo uma delas fortemente cooperativa. Este modo de ligação cooperativo é provavelmente aquele diretamente relacionado à condensação do DNA, como sugerido pela forma da curva na figura 5.2.

5.1.1 Análise dos dados do comprimento de persistência

Como visto, o modelo WLC é versátil quanto aos parâmetros mecânicos comprimentos de persistência e de contorno. Logo o ajuste das curvas de força por extensão que fizemos para extrair o comprimento de contorno aparente do complexo, também fornece o comprimento de persistência desse complexo, para cada concentração do Hoechst(33258). Na figura 5.3, mostramos o comprimento de persistência A do complexo DNA-Hoechst(33258) em função da concentração total C_T de ligante na amostra, onde, novamente, as barras de erro foram calculadas pelo desvio padrão médio. Nesta figura observamos um comportamento não monotônico para A , em oposição a L_{app} . Há um aumento no valor de A , junto com o aumento na concentração total de ligante, mas até um certo limite ($C_T < 3 \mu M$), depois há um decréscimo em A para valores mais altos das concentrações ($C_T > 3 \mu M$), até que o complexo DNA-Hoechst(33258) condense.

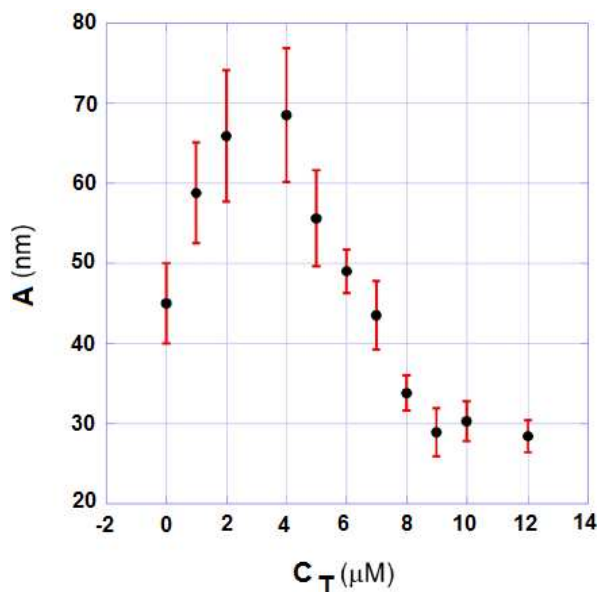


Figura 5.3: **Comprimento de persistência A do complexo em função da concentração total C_T de ligante na amostra.** Note que o comprimento de persistência cresce para baixas concentrações ($C_T < 3 \mu M$) e então decresce para altas concentrações ($C_T > 3 \mu M$).

Para compreender o comportamento não-monotônico do comprimento de persistência, nós aplicamos o *modelo estatístico de desordem de dois sítios* [20, 21], recentemente desenvolvido pelo grupo de Física Biológica da UFV e da UFMG, no ajuste dos dados da figura 5.3. Este modelo é capaz de explicar comportamentos não monotônicos do comprimento de persistência [21], como é o encontrado em nosso caso. Como apresentado nos dois trabalhos de referência, este modelo permite extrair informações físico-químicas do sistema a partir de uma propriedade mecânica particular, no caso o comprimento de persistência. É uma metodologia que estuda as mudanças das propriedades mecânicas do complexo formado entre o DNA e um ligante, em função da concentração total do ligante, relacionando-as com as frações de sítios ligados (r) e consequentemente ao modelo de Hill. O uso do modelo estatístico para dois sítios será justificado quando obtivermos os resultados para nosso sistema. Para entender a lógica do modelo, a figura 5.4 simula um trecho qualquer do DNA e os sítios nele disponíveis para associações.

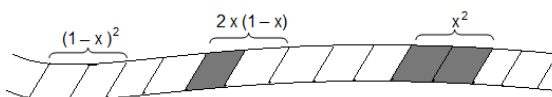


Figura 5.4: **Probabilidade de dois sítios ocupados e desocupados.** Dois sítios consecutivos, sendo x a probabilidade de um sítio estar ocupado, $(1-x)$ a probabilidade de um sítio estar desocupado.

No trecho temos alguns sítios ocupados por um ligante qualquer e parte deles desocupados. Chamemos de x a probabilidade de um sítio qualquer estar ocupado pelo ligante, sendo as-

sim teremos $(1-x)$ a probabilidade do sítio estar desocupado. Vamos assumir uma distribuição aleatória para a localização destes sítios ligados e vamos olhar para dois sítios consecutivos quaisquer. Assim, há três modos distintos de configuração para os dois sítios considerados, que são os dois estarem desocupados com probabilidade $P_0 = (1-x)^2$, os dois estarem ocupados com probabilidade $P_2 = x^2$ e um deles ocupados e o outro desocupado, sendo que neste último modo pode ainda haver inversão na posição ocupada com a desocupada e portanto a probabilidade é $P_1 = 2x(1-x)$.

O DNA em sua forma nativa apresenta um valor específico para o comprimento de persistência, definido como A_0 , mas quando o DNA interage com um ligante, essa interação altera o comprimento de persistência local. Quando consideramos dois sítios vizinhos e a interação ocorre com um ocupado e o outro vazio, o comprimento de persistência local é definido A_1 e será definido A_2 para o caso da associação ocupar os dois sítios. Dessa forma, um valor efetivo para o comprimento de persistência do complexo DNA-ligante é dada por A e é encontrado pela expressão [21]:

$$\frac{P}{A} = \frac{P_0}{A_0} + \frac{P_1}{A_1} + \frac{P_2}{A_2}, \quad (5.1)$$

onde P é a probabilidade total e igual a um, P_0 , P_1 e P_2 são as probabilidades já citadas para as ocupações vistas na figura 5.4.

Nas considerações feitas até aqui para o caso da figura 5.4, pensamos simplesmente na associação de uma molécula de ligante por sítio e não citamos a possibilidade da cooperatividade influenciar nas associações. No entanto, a cooperatividade é possível neste tipo de sistema e refletida na formação de agregados de ligantes. Estes agregados ligados possuem uma faixa de distribuição estreita com n moléculas em média e estão aleatoriamente localizadas ao longo do DNA [21]. Se não há cooperatividade teremos $n = 1$ e cada molécula também está aleatoriamente localizada pelo DNA. As associações dos agregados ligados ocorrem com as mesmas probabilidades que uma só molécula, então reclassificando x como a fração ligada que já conhecemos r/r_{max} , podemos escrever o comprimento de persistência efetivo A do complexo DNA-ligante como,

$$\begin{aligned} \frac{1}{A} &= \frac{P_0}{A_0} + \frac{P_1}{A_1} + \frac{P_2}{A_2} \\ &= \frac{\left(1 - \frac{r}{r_{max}}\right)^2}{A_0} + \frac{\frac{2r}{r_{max}} \left(1 - \frac{r}{r_{max}}\right)}{A_1} + \frac{\left(\frac{r}{r_{max}}\right)^2}{A_2} \\ &= \frac{1}{A_0} + \left(\frac{2}{A_1} - \frac{2}{A_0}\right) \left(\frac{r}{r_{max}}\right) + \left(\frac{1}{A_0} - \frac{2}{A_1} + \frac{1}{A_2}\right) \left(\frac{r}{r_{max}}\right)^2. \end{aligned} \quad (5.2)$$

Da equação de Hill (3.31) lembramos que a fração ligada r/r_{max} é a isoterma de ligação e pode ser expressa em termos dos parâmetros físico-químicos do complexo. No entanto, como vimos na seção 4.1, o ligante Hoechst(33258) apresenta dois modos de ligação diferentes com a

dupla fita do DNA. Portanto, a mais simples isoterma de ligação que podemos propor deve ser composta por duas constantes de ligação de equilíbrio. Nós propomos uma isoterma de ligação composta de dois processos do tipo Hill:

$$\frac{r}{r_{max}} = \frac{(k_1 C_f)^{n_1}}{2[1 + (k_1 C_f)^{n_1}]} + \frac{(k_2 C_f)^{n_2}}{2[1 + (k_2 C_f)^{n_2}]} \quad (5.3)$$

Temos agora que expressar o comprimento de persistência efetivo em função da concentração total de ligante, para isso relembremos que a concentração total é igual a soma da concentração de ligantes livres (C_f) mais a de ligantes ligados (C_b). Evidenciando a concentração de ligantes livres a equação fica,

$$C_f = C_T - C_b \quad \text{mas} \quad r = \frac{C_b}{C_{bp}} \quad \Rightarrow \quad C_f = C_T - rC_{bp}, \quad (5.4)$$

onde C_{bp} é a concentração de pares de base do DNA na amostra e junto com C_T são parâmetros conhecidos do sistema. Este último valor de C_f substituído na equação 5.3 nos permite obter,

$$\frac{r}{r_{max}} = \frac{[k_1(C_T - rC_{bp})]^{n_1}}{2[1 + (k_1(C_T - rC_{bp}))^{n_1}]} + \frac{[k_2(C_T - rC_{bp})]^{n_2}}{2[1 + (k_2(C_T - rC_{bp}))^{n_2}]} \quad (5.5)$$

Agora, após a substituição deste novo valor da fração r/r_{max} na equação 5.2 teremos uma nova equação para o comprimento de persistência efetivo do complexo e essa nova equação nos conduz ao ajuste dos dados da figura 5.3. Podemos visualizar o resultado desse ajuste na figura 5.5, na qual apresentamos o inverso do comprimento de persistência por conveniência. Nela observamos que o modelo (linha sólida) se ajusta bem aos dados (círculos). Nós fizemos o experimento com seis parâmetros ajustáveis, $k_1, k_2, n_1, n_2, r_{max}$ e A_1 . A concentração de pares de base do DNA na forma nativa $C_{bp} = 20\mu M$ é conhecida a partir dos procedimentos de preparação da amostra e confirmada por espectrofotometria. Os valores do comprimento de persistência para a forma nativa do DNA e para o complexo DNA-Hoechst saturado, tem valores $A_0 = (45 \pm 5)$ e $A_2 = (28 \pm 3)$, respectivamente, e foram determinados experimentalmente, como visto na figura 5.3.

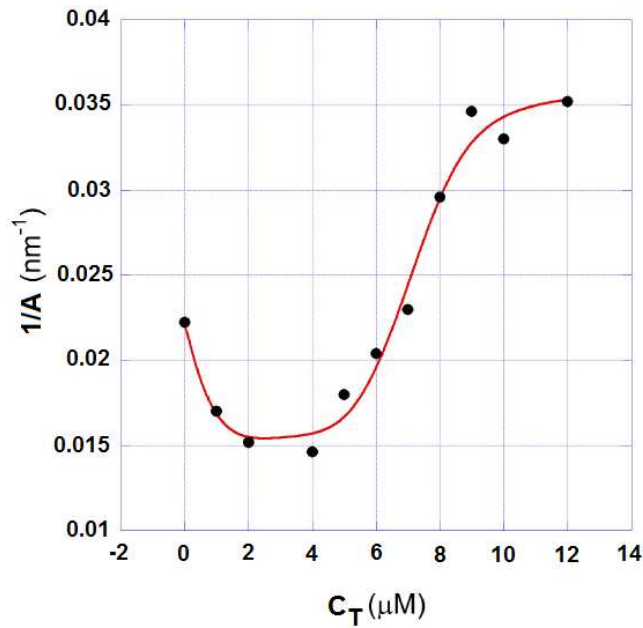


Figura 5.5: **Curva de ajuste pelo modelo estatístico de desordem de dois sítios.** Os círculos são inversos do comprimento de persistência, obtidos da figura 5.3. A linha sólida é o ajuste pelo modelo estatístico de desordem de dois sítios com a isoterma de ligação consistindo de dois processos tipo Hill.

A partir do ajuste determinamos os parâmetros físico-químicos $k_1 = (1,8 \pm 0,4) \times 10^6 M^{-1}$, $k_2 = (2,4 \pm 0,2) \times 10^5 M^{-1}$, $n_1 = (1,1 \pm 0,3)$, $n_2 = (7 \pm 3)$, $A_1 = (300 \pm 100) nm$ e $r_{max} = (0,32 \pm 0,02)$. Estes resultados indicam que o primeiro dos modos de ligação tem uma constante de equilíbrio k_1 uma ordem de grandeza maior que a constante de equilíbrio k_2 do segundo modo. Entretanto, este primeiro modo é não cooperativo ($n_1 \approx 1$), enquanto o segundo modo é altamente cooperativo, com um coeficiente de Hill $n_2 \approx 7$. Estes resultados relativos à cooperatividade dos dois modos de ligação estão de acordo com resultados prévios reportados por outras técnicas, tais como diálise de equilíbrio e espectroscopia de absorção [39,40]. Além disso, estes resultados também indicam que as moléculas de Hoechst(33258) ligadas pelo modo 1 não formam agregados ligados, enquanto as moléculas ligadas pelo modo 2 formam agregados ligados com uma faixa média de sete moléculas. O parâmetro $r_{max} = (0,32 \pm 0,02)$ indica que há saturação quando aproximadamente 30% da molécula de DNA está ligada pelo Hoechst(33258), considerando os dois modos de ligação. Finalmente, o fato de que $A_1 > A_0 > A_2$ indica que: sejam moléculas isoladas de Hoechst(33258), ligadas pelo modo 1, ou agregados ligados isolados de Hoechst, ligados pelo modo 2, o comprimento de persistência do complexo é aumentado, enquanto sequências de moléculas (pelo modo 1) ou sequências de agregados ligados (pelo modo 2) diminuem esse parâmetro. Os valores obtidos para os parâmetros A_1 e n_2 apresentam grandes barras de erro devido ao excesso de parâmetros usados no procedimento de ajuste e portanto podem ser interpretados como somente uma indicação da ordem de magnitude desses parâmetros. Quando se desejar aplicar a metodologia presente para um

sistema DNA-ligante particular, pode-se obter menores barras de erro se alguns dos parâmetros forem previamente conhecidos por outras técnicas, portanto reduzindo o número de parâmetros ajustáveis no processo de ajuste.

Nós tentamos também fazer o ajuste dos dados experimentais usando uma isoterma de ligação contendo uma única constante de ligação, que seria composta de um só processo do tipo Hill. Contudo, o ajuste é consideravelmente pior e os valores retornados para alguns parâmetros físico-químicos não são fisicamente aceitáveis, o que indica que os dois modos de ligação considerados com suas duas constantes de ligação são necessários para descrever corretamente o sistema DNA-Hoechst(33258), como previamente mencionados em outros estudos sobre o mesmo.

Um passo a mais, muito útil na direção de uma compreensão mais aprofundada, é estudar os modos de ligação desacoplados, isolando cada uma das isotermas de ligação. Para tanto, apresentamos na figura 5.6 as duas isotermas de ligação, IL_1 e IL_2 , individualmente, em função da concentração total $C_T = C_f + rC_{bp}$

$$IL_1 = \frac{(k_1 C_f)^{n_1}}{2[1 + (k_1 C_f)^{n_1}]} \quad \text{e} \quad IL_2 = \frac{(k_2 C_f)^{n_2}}{2[1 + (k_2 C_f)^{n_2}]} \quad (5.6)$$

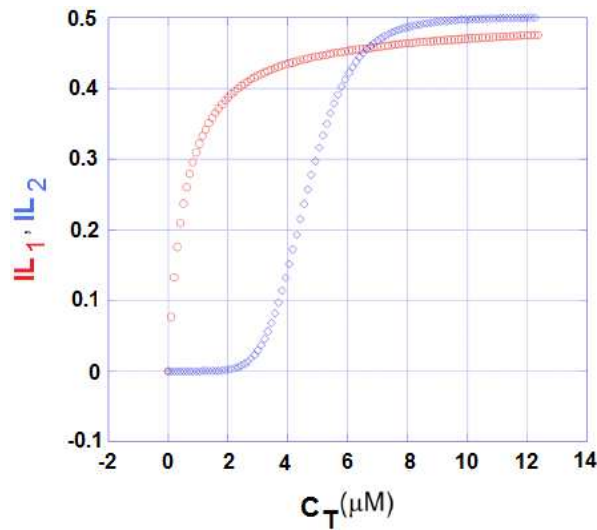


Figura 5.6: **Curvas individuais dos dois modos de ligação distintos em função de C_T .** Os círculos vermelhos representam a isoterma do primeiro modo de ligação (IL_1) e os quadrados azuis representam a isoterma do segundo modo de ligação (IL_2).

Devemos notar que as isotermas de ligação representam a fração ligada do ligante, nos dois modos de ligação distintos. Observamos também que os círculos vermelhos representando a isoterma de ligação do modo 1 é a curva dominante no intervalo de baixas concentrações ($C_T < 3 \mu M$), enquanto os quadrados azuis representando a isoterma de ligação do modo 2

é desprezível neste intervalo. Portanto, o domínio do modo 1 é provavelmente o responsável pelo aumento do comprimento de persistência observado na figura 5.3 para $C_T < 3 \mu M$. Para mais altas concentrações, $C_T > 3 \mu M$, verificamos que o modo de ligação 2 rapidamente se torna relevante enquanto a fração de moléculas ligadas pelo modo de ligação 1 não mais aumenta significativamente. Portanto, o modo de ligação 2 deve estar relacionado ao decréscimo do comprimento de persistência observado na figura 5.3 para $C_T > 3 \mu M$. Além do mais, por causa da alta cooperatividade presente no modo 2, ele deve também estar relacionado à condensação do DNA, previamente discutida. Outra evidência da condensação pelo modo dois, vem do fato de que as moléculas de Hoechst(33258) são monovalentes quando interagindo com o DNA. As moléculas de ligantes com monovalência em geral não podem condensar o DNA, então tais efeitos devem ser relacionados à formação dos agregados das moléculas do ligante, os quais passam a ter uma valência superior. Além disso, uma forte interação hidrofóbica entre o Hoechst(3328) e o DNA pode também contribuir para a condensação, como sugeriu Saito e colaboradores [16, 41, 42].

E assim, finalmente podemos nos questionar sobre a natureza das interações relacionadas a cada modo de interação. Como mencionado na seção 4.1, um grande número de autores tem reportado que o ligante Hoechst(33258) se liga preferencialmente à fenda menor do DNA, especialmente numa região rica em pares A-T. Alguns trabalhos indicam a possibilidade de intercalação em regiões ricas de pares G-C [15–17, 37–43]. Desta forma, como a condensação do DNA pode ser alcançada pela ligação de ligantes multivalentes, associando-se às fendas menores do DNA, mas nunca pela intercalação, nós propomos um cenário onde o modo 1 é a ligação intercalante, enquanto o modo 2, aquele cooperativo, é a ligação de fenda menor. Outra evidência de tal cenário, é o fato de que alguns intercalantes podem aumentar o comprimento de persistência do DNA [46–49], um efeito também observado pelo Hoechst(33258) para concentrações menores que $3 \mu M$, o intervalo de ligação no qual o modo de ligação 1 é dominante.

Capítulo 6

Conclusões e perspectivas

Nesta dissertação de mestrado, fizemos uso da técnica de pinçamento ótico aliada a videomicroscopia, para realizar e analisar experimentos de estiramentos, no regime entrópico de baixas forças, em moléculas únicas de um complexo DNA-ligante. Estudamos os efeitos ocorridos nas propriedades mecânicas deste complexo, em função de diferentes concentrações do ligante Hoechst(33258), empregando a expressão de mecânica de polímeros semiflexíveis de Marko e Siggia [36], para extrair tais propriedades ao analisar as curvas de força por extensão do complexo. Observamos um aumento significativo no comprimento de persistência em baixas concentrações do Hoechst(33258) e um decréscimo acentuado do mesmo em concentrações mais altas. Também verificamos um comportamento monotonicamente decrescente no comprimento de contorno aparente do complexo, até a completa compactação do DNA. Sugerimos, a partir desta queda monotônica, como indica um processo tipo Hill, ser a interação do DNA com o ligante Hoechst(33258) dada por um modo de ligação cooperativo.

Usando um modelo estatístico de desordem de dois sítios, previamente desenvolvido [21], relacionamos o comprimento de persistência a propriedades físico-químicas do complexo por meio da equação de Hill. Com este modelo fomos capazes de decompor os dois modos de ligação que o ligante Hoechst(33258) exibe com a molécula de DNA, determinando os parâmetros físico-químicos de cada um desses modos. Através de efeitos conhecidos na literatura para ligantes intercalantes e ligantes de fenda menor, sugerimos relacionar estes modos de ligação ao aumento e ao decréscimo do comprimento de persistência do complexo. Por ser a primeira vez que o modelo estatístico de desordem de dois sítios, é aplicado a um sistema de interação que possui múltiplos modos de ligação, demonstramos com os resultados que concordam com dados reportados por outras técnicas, que diferentes modos podem de fato ser decompostos e que a natureza das interações podem em princípio ser identificadas. Temos portanto, como perspectivas aplicar este método a outros sistemas DNA-ligantes com múltiplos modos de ligação.

Ainda, como dispomos de outras técnicas acessíveis ao laboratório de Física Biológica, pretendemos usar esses meios para conhecer melhor alguns parâmetros e assim diminuir o número de parâmetros ajustáveis, alcançando dados ainda mais precisos.

Apêndice A

Cálculo da média quadrática da distância entre as extremidades $\langle r_{ee}^2 \rangle$

Na figura A.1 visualizamos os vetores $\vec{r}_0$ e $\vec{r}_L$ que são, respectivamente, os vetores posição que localizam as extremidades inicial e final do polímero. Assim, estamos na verdade estabelecendo a extremidade inicial do vetor em $s = 0$ e a final em $s = L$, definindo portanto o comprimento de contorno L_c do polímero.

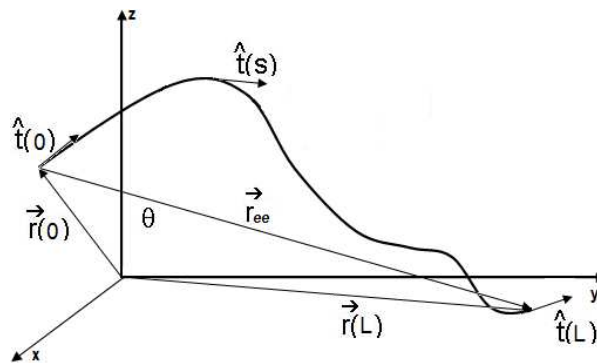


Figura A.1: Curva arbitrária de um polímero e seus vetores posição.

O vetor $\vec{r}_{ee}$ é o vetor que fornece a distância entre as extremidades do polímero. Como podemos ver esse vetor é dado por:

$$\vec{r}_{ee} = \vec{r}_L - \vec{r}_0 \quad (\text{A.1})$$

e sua média quadrática é calculada por;

$$\langle \vec{r}_{ee}^2 \rangle = \langle [\vec{r}_L - \vec{r}_0]^2 \rangle. \quad (\text{A.2})$$

Do capítulo 3.6.1 sabemos que:

$$\hat{t}(s) = \frac{\partial \vec{r}}{\partial s} \implies \int_0^s d\vec{r} = \int_0^s \hat{t}(s') ds' \quad (\text{A.3})$$

e, assim, a integral do primeiro membro nos fornece,

$$\vec{r}_s = \vec{r}_0 + \int_0^s \hat{t}(s') ds'. \quad (\text{A.4})$$

Se colocarmos este valor na equação A.2, com a eliminação de $\vec{r}_0$ e com $\vec{r}_s$ elevado ao quadrado teremos;

$$\begin{aligned} \langle \vec{r}_{ee}^2 \rangle &= \left\langle \left[\int_0^s \hat{t}(s') ds' \right] \cdot \left[\int_0^s \hat{t}(s'') ds'' \right] \right\rangle = \\ &= \int_0^L ds'' \int_0^L ds' \langle \hat{t}(s') \cdot \hat{t}(s'') \rangle. \end{aligned} \quad (\text{A.5})$$

Agora, temos que calcular o valor médio do produto escalar entre os vetores unitários. Tomando como θ o ângulo entre dois vetores unitários, um na origem do polímero e o outro numa posição s qualquer, temos:

$$\langle \hat{t}(0) \cdot \hat{t}(s) \rangle = \langle \cos \theta \rangle. \quad (\text{A.6})$$

Considerando pequenas flutuações, em que θ é pequeno, podemos fazer uma aproximação pela fórmula de meio ângulo onde $\cos \theta \sim 1 - \theta^2/2$ que nos levará a:

$$\langle \hat{t}(0) \cdot \hat{t}(s) \rangle \cong 1 - \frac{\langle \theta^2 \rangle}{2} = 1 - \frac{s}{A}, \quad (\text{A.7})$$

para uma aproximação em primeira ordem.

O último termo da equação A.7 é a expansão da função exponencial em primeira ordem. De fato, se levarmos em conta todos os termos da expansão, obteremos a seguinte expressão:

$$\langle \hat{t}(0) \cdot \hat{t}(s) \rangle \cong \exp \left(-\frac{s}{A} \right). \quad (\text{A.8})$$

Aqui cabe uma observação do resultado que acabamos de obter, pois ele é tomado como a interpretação geométrica do comprimento de persistência. Ele diz que o comprimento de persistência é o comprimento de correlação da cadeia polimérica, ou seja, mede a distância ao longo do polímero sobre o qual a orientação da cadeia fica descorrelacionada.

Com esse resultado, se fizermos uma mudança de origem do sistema teremos:

$$\langle \hat{t}(s') \cdot \hat{t}(s'') \rangle \cong \exp \left(-\frac{|s' - s''|}{A} \right). \quad (\text{A.9})$$

Substituindo a equação A.9 na equação A.5 a integral pode ser dividida em duas partes iguais como se segue;

$$\langle \vec{r}_{ee}^2 \rangle \cong 2 \int_0^{L_c} \exp\left(-\frac{s''}{A}\right) ds'' \int_0^{s''} \exp\left(-\frac{s'}{A}\right) ds' \quad (\text{A.10})$$

e a resolução dessa integral nos fornece;

$$\langle \vec{r}_{ee}^2 \rangle \cong 2AL_c - 2A^2 \left[1 - \exp\left(-\frac{L_c}{A}\right) \right]. \quad (\text{A.11})$$

Podemos tomar dois limites extremos para a exponencial através de sua expansão, fazendo $L_c \gg A$ e $L_c \ll A$ e interpretá-los como um ajuste para os limites nos quais o polímero é flexível e rígido, respectivamente, finalmente obtendo:

i- Para $L_c \gg A$ (limite flexível):

$$\langle \vec{r}_{ee}^2 \rangle \cong 2AL_c, \quad (\text{A.12})$$

ii- Para $L_c \ll A$ (limite rígido):

$$\langle \vec{r}_{ee}^2 \rangle \cong L_c^2, \quad (\text{A.13})$$

que são os resultados usados na seção 3.6.3.

Apêndice B

Artigo aceito para publicação

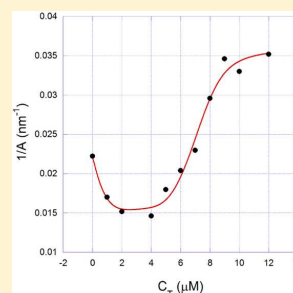
Neste apêndice apresentamos o artigo “*DNA interaction with Hoechst 33258: stretching experiments decouple the different binding modes*” aceito para publicação na revista *The Journal of Physical Chemistry B* na data de 6/05/2013 durante execução dos trabalhos de mestrado.

DNA Interaction with Hoechst 33258: Stretching Experiments Decouple the Different Binding Modes

E. F. Silva, E. B. Ramos, and M. S. Rocha*

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

ABSTRACT: By performing single molecule stretching experiments with optical tweezers, we have studied the DNA interaction with the ligand Hoechst 33258. The mechanical properties of the complexes formed as a function of ligand concentration were directly determined from these measurements by fitting the force $\times$ extension curve to the WormLike Chain model of semiflexible polymers. In addition, the physicochemical parameters of the interaction were extracted from the persistence length data by using a previously developed two-sites quenched disorder statistical model, allowing the determination of the binding isotherm. Such approach has allowed us to decouple the two different binding modes present in this system. In particular, it was found that the binding isotherm consists of two Hill-type processes, one noncooperative and the other strongly cooperative. Finally, DNA condensation due to the interaction with the ligand was also verified and characterized here by analyzing the apparent contour length of the complexes.



INTRODUCTION

DNA interactions with ligands such as drugs or proteins are a research topic of interest to many areas of knowledge, from the comprehension of basic intracellular processes to the application in medical sciences, especially in cancer chemotherapies and gene therapies.

The Hoechst stains, also known as bis-benzimidazoles, are a family of fluorescent dyes largely employed to stain the DNA molecule in molecular biology applications, allowing one to visualize the DNA with fluorescence microscopy. In addition, these compounds can be potentially used as anticancer drugs¹ because their strong interaction with DNA can impede the replication of the molecule. Many experimental techniques were employed over the past years to study the effects of the Hoechst 33258 subtype on the DNA molecule. In particular, it was found that it binds preferentially to the DNA minor groove, especially at AT-rich regions.^{2,3} Nevertheless, many authors have found that the ligand presents more than one binding mode to double-strand (ds) DNA,^{3–5} and some works indicate the possibility of intercalation at GC-rich regions.^{3,6}

In this work, we have studied the interaction of the DNA molecule with Hoechst 33258 by performing single-molecule stretching experiments with optical tweezers in the entropic regime (maximum forces ~ 2 pN) to characterize the mechanical and the physicochemical properties of the complexes formed. In fact, from these stretching experiments, the force versus extension curve of the DNA–ligand complexes can be measured, from which basic mechanical properties such as the contour and persistence lengths can be promptly determined. Recently, we have developed a methodology of data analysis that allows one to extract the chemical parameters, and consequently the binding isotherm, from pure mechanical measurements.^{7–10} In its more sophisticated version, this methodology consists of a fitting procedure of the persistence

length data of DNA–ligand complexes by using a two-sites quenched disorder statistical model.^{9,10} From this fitting, one can promptly determine the local persistence lengths and the chemical parameters of the interaction, thus performing a robust characterization. In the present work, we extend the applicability of this methodology to DNA–ligand systems with more than one binding mode, showing how one can decouple these modes by determining the different set of physicochemical parameters relative to each mode.

EXPERIMENTAL PROCEDURE

Sample Preparation. In this work, the samples consist of λ -DNA molecules end-labeled with biotin in a phosphate-buffered saline (PBS) solution with $[\text{NaCl}] = 140$ mM. One end of the DNA molecules is attached to a streptavidin-coated glass coverslip using the procedure of Amitani et al.,¹¹ while the other end of the molecule is attached to a streptavidin-coated polystyrene bead with $2 \mu\text{m}$ diameter. Therefore, one can trap the polystyrene bead with the optical tweezers and stretch the DNA molecule by moving the microscope stage with a piezoelectric actuator. The sample chamber is constructed with two microfluidic channels such that one can exchange the buffer and consequently the ligand concentration without affecting the trapped DNA molecule.

Stretching Experiments. The optical tweezers consist of a 1064 nm ytterbium-doped fiber laser with maximum output power of 5.8 W (IPG Photonics) mounted in a Nikon Ti-S inverted microscope with a 100 $\times$ N.A. 1.4 objective. The apparatus is previously calibrated by two independent methods,

Received: April 21, 2013

Revised: May 24, 2013

Published: May 28, 2013

as previously described,¹⁰ and used to stretch the DNA–Hoechst complexes with maximum forces of ~ 2 pN, therefore within the entropic regime. The complete details of our stretching procedure can be found in a previous work.⁸ By fitting the experimental force versus extension curves to the Marko–Siggia Worm-Like Chain (WLC) model,¹² we extract the persistence length A and the contour length L of the complexes formed. As previously shown,^{8,10} 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 $A = 45 \pm 5$ nm and $L = 16.5 \pm 1$ μ m, corresponding to the well-known values reported in the literature.^{13,14} Therefore, the method can be used to study the variation of the mechanical properties of DNA–Hoechst complexes as a function of ligand concentration.

To determine the average values and the error bars of the mechanical properties for the DNA–Hoechst complexes, the experiments were performed as follows. First, we choose a particular bare DNA molecule and stretch it six times. Then, we change the ligand concentration in the sample by using the microfluidic channels constructed in the sample chamber. After changing the concentration, we wait ~ 20 min for the ligand to equilibrate with DNA. By analyzing the reversibility of the stretching curves, we have found that this time scale is sufficient for Hoechst to equilibrate with DNA. We then perform again six stretching experiments, obtaining the new values for the persistence and contour lengths for the chosen Hoechst concentration. This procedure is then repeated sequentially for each ligand concentration. We have also repeated the entire procedure, scanning all of the concentrations, for other DNA molecules by using different samples. The error bars of the mechanical properties are then estimated by calculating the standard deviations from these sets of measurements.

RESULTS AND DISCUSSION

DNA Condensation by Hoechst 33258. In Figure 1, we show the averaged force versus extension curves for some Hoechst concentrations. Observe that the maximum extension, obtained for $F \approx 2$ pN, decreases with the ligand concentration, indicating DNA condensation by the ligand. Because of this condensation, one should observe that the “apparent contour length” (and not the real one) is the parameter returned by fitting the experimental force curves to the WLC model because the condensed DNA–Hoechst complexes cannot be fully stretched in the entropic low-force regime used in this work ($F < 2$ pN).

In Figure 2, we show the apparent contour length L_{app} of DNA–Hoechst complexes as a function of total ligand concentration in the sample C_T . Observe that L_{app} decreases monotonically as C_T increases and the curve presents a nearly sigmoidal shape, which indicates that the condensation of the DNA–Hoechst complexes is a cooperative process.^{7,8,15} A similar behavior was previously found for the drug cisplatin when interacting with DNA, under equivalent experimental conditions.^{7,8} In the next section we will show that in fact there are at least two different binding modes present in the DNA–Hoechst interaction, one of them being strongly cooperative. This cooperative binding mode is probably the one directly related to DNA condensation, as suggested by the shape of the curve shown in Figure 2.

Persistence Length Data Analysis. The persistence length of the complexes is also determined for each

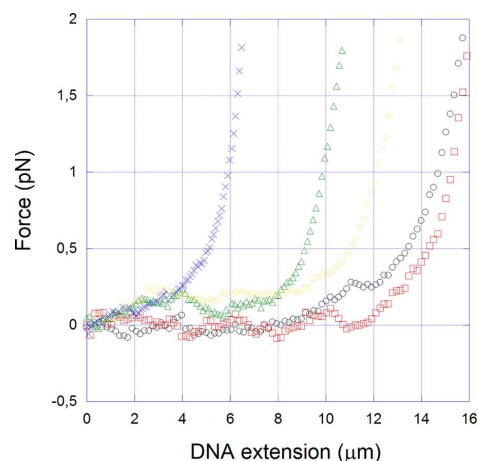


Figure 1. Force versus extension curves for various Hoechst concentrations C_T and a fixed DNA concentration ($C_{bp} = 20$ μ M). Black circles: bare DNA; red squares: $C_T = 2$ μ M; yellow diamonds: $C_T = 6$ μ M; green triangles: $C_T = 8$ μ M; blue $\times$: $C_T = 10$ μ M.

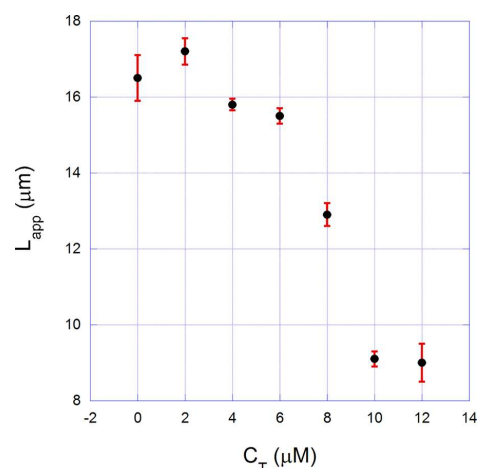


Figure 2. Apparent contour length L_{app} of DNA–Hoechst complexes as a function of total ligand concentration in the sample C_T . The sigmoidal shape of the curve suggests that the condensation of DNA–Hoechst complexes is a cooperative process.

concentration by the same fitting of the force curves to the WLC model. In Figure 3, we show the persistence length A of the DNA–Hoechst complexes as a function of the total ligand concentration in the sample C_T . Observe that the persistence length increases for low concentrations ($C_T < 3$ μ M) and then decreases for larger ones ($C_T > 3$ μ M).

To understand this nonmonotonic behavior of the persistence length, we use the two-sites quenched disorder statistical model recently developed by us^{9,10} to fit the data of Figure 3. As discussed in these two previous works, this model allows one to extract information about the physical chemistry of the system from a particular mechanical property (in the present case, the persistence length).

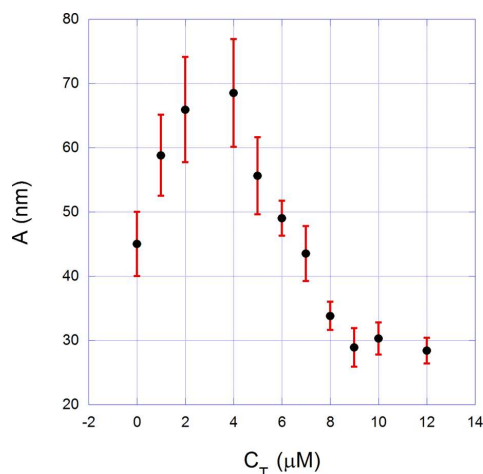


Figure 3. Persistence length A of the DNA–Hoechst complexes as a function of the total ligand concentration in the sample C_T . Observe that the persistence length increases for low concentrations ($C_T < 3 \mu\text{M}$) and then decreases for larger ones ($C_T > 3 \mu\text{M}$).

Essentially, 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, $n = 1$ 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, then the complex changes again the local persistence length to the value A_2 . The effective persistence length A of the DNA–ligand complex can be written as⁹

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

where r is the bound fraction (bound ligand concentration per DNA base-pair concentration) and $r_{\max}$ is the saturation value of r .

The fraction $r/r_{\max}$ can be expressed by the binding isotherm of the system. In the case of Hoechst 33258, as pointed out in the Introduction, it is known that the ligand presents at least two distinct binding modes to ds DNA.^{3–5} Therefore, the simplest binding isotherm that one can propose must be composed at least by two equilibrium binding constants. We propose a binding isotherm composed by two Hill-type processes,¹⁵ that is

$$\frac{r}{r_{\max}} = \frac{(K_1 C_f)^{n_1}}{2[1 + (K_1 C_f)^{n_1}]} + \frac{(K_2 C_f)^{n_2}}{2[1 + (K_2 C_f)^{n_2}]} \quad (2)$$

where K_1 and K_2 are the two equilibrium association constants and n_1 and n_2 are the two Hill exponents, corresponding to the two different binding modes. In addition, C_f is the free ligand concentration in the sample. This quantity is related to the total

ligand concentration (C_T) and to the bound ligand concentration (C_b) by $C_f = C_T - C_b$.

By plugging eq 2 into eq 1 and using the relation $C_f = C_T - C_b = C_T - rC_{bp}$, where C_{bp} is the DNA base-pair concentration in the sample (a known parameter), one can fit the persistence length data of Figure 3. The details of the fitting procedure can be found in refs 9 and 10. The result is present in Figure 4, in

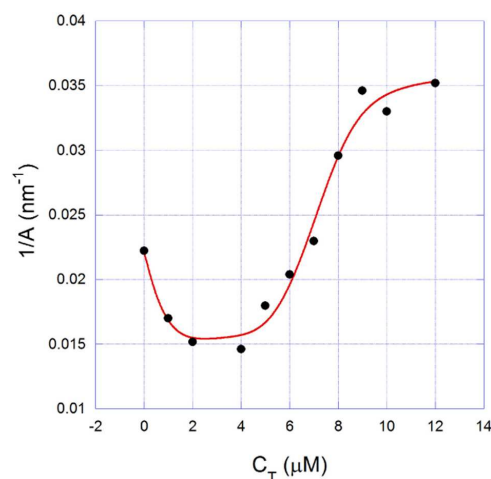


Figure 4. Circles: inverse of the persistence length data from Figure 3. Solid line: a fitting to the two-sites quenched disorder statistical model (eq 1), with the binding isotherm consisting of a two Hill-type processes (eq 2). From the fitting, we decouple the two distinct binding modes, determining the chemical parameters of each one, the local persistence lengths and the saturation fraction.

which we have plotted the inverse of the persistence length, for convenience. Observe that the model (solid line) fits well to the experimental data (circles). We have performed the fit with the adjustable parameters K_1 , K_2 , n_1 , n_2 , A_1 , and $r_{\max}$. The DNA base-pair concentration $C_{bp} = 20 \mu\text{M}$ is known from the sample preparation procedure and confirmed by spectrophotometry, and the local persistence lengths $A_0 = (45 \pm 5) \text{ nm}$ and $A_2 = (28 \pm 3) \text{ nm}$ were experimentally determined (as can be seen in Figure 3) because they correspond to the persistence length of the bare DNA and of a saturated DNA–Hoechst complex, respectively.

From the fitting, we determine the physicochemical parameters $K_1 = (1.8 \pm 0.4) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, $K_2 = (2.4 \pm 0.2) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, $n_1 = 1.1 \pm 0.3$, $n_2 = 7 \pm 3$, $A_1 = (300 \pm 100) \text{ nm}$, and $r_{\max} = 0.32 \pm 0.02$. These results indicate that the first of the binding modes has an equilibrium constant K_1 one order of magnitude larger than the constant K_2 of the second mode. Nevertheless, this first binding mode is noncooperative ($n_1 \approx 1$), whereas the second mode is highly cooperative, with a Hill exponent $n_2 \approx 7$. These results concerning the cooperativity of the two binding modes are in agreement with previous studies performed by other techniques, such as equilibrium dialysis and absorption spectroscopy.^{4,5} In addition, these results also indicate that the Hoechst molecules bound by mode 1 do not form bound clusters, while the ligand molecules bound by mode 2 form bound clusters with an average size of seven molecules.⁹ The parameter $r_{\max} = 0.32 \pm 0.02$ indicates that

upon saturation ~30% of the DNA molecule is bound by Hoechst, considering the two binding modes. Finally, the fact that $A_1 > A_0 > A_2$ indicates that isolated Hoechst molecules (bound by mode 1) or isolated bound clusters (bound by mode 2) increase the DNA persistence length, while sequences of ligand molecules (bound by mode 1) or bound clusters (bound by mode 2) decrease this parameter. The values obtained for the parameters A_1 and n_2 present large error bars due to the excess of parameters used in the fitting procedure and therefore may be interpreted as only an indication of the order of magnitude of those parameters. 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 techniques, therefore reducing the number of adjustable parameters in the fitting process.

We have also tried to fit the experimental data with a binding isotherm containing only a single binding constant, that is, composed of a single Hill-type process. However, the fit is considerably worse and the values returned for some of the physicochemical parameters are not physically acceptable, which indicates that at least two different binding constants are needed to correctly describe this DNA-ligand system, as previously pointed out.

To extend the analysis further, we plot in Figure 5 the two individual binding isotherms $BI_1 = (K_1 C_T)^{n_1} / [2(1 + (K_1 C_T)^{n_1})]$ and

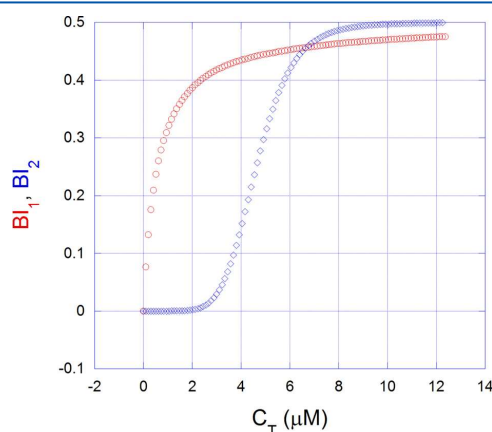


Figure 5. Two individual binding isotherms $BI_1 = (K_1 C_T)^{n_1} / [2(1 + (K_1 C_T)^{n_1})]$ (red ○) and $BI_2 = (K_2 C_T)^{n_2} / [2(1 + (K_2 C_T)^{n_2})]$ (blue ◇) as a function of total ligand concentration in the sample C_T . These two isotherms correspond to the two distinct binding modes that the Hoechst molecules exhibit with DNA.

$BI_2 = (K_2 C_T)^{n_2} / [2(1 + (K_2 C_T)^{n_2})]$ as a function of $C_T = C_f + rC_{bp}$. One should note that these two binding isotherms represent the bound ligand fraction for the two distinct binding modes. By analyzing Figure 5, one should also observe that for low concentrations ($C_T < 3 \mu\text{M}$) binding mode 1 (red ○) is dominant and binding mode 2 (blue ◇) is negligible. Therefore, binding mode 1 should be related to the increase in the persistence length observed in Figure 3 for $C_T < 3 \mu\text{M}$. For $C_T > 3 \mu\text{M}$, one can verify in Figure 5 that binding mode 2 rapidly becomes relevant while the fraction of molecules bound by mode 1 does not increase significantly anymore. Therefore, binding mode 2 should be related to the decrease in the

persistence length observed in Figure 3 for $C_T > 3 \mu\text{M}$. In addition, because binding mode 2 is the cooperative one, it should also be related to the DNA condensation previously discussed. Further evidence for this conclusion comes from the fact that the Hoechst 33258 molecules are monovalent when interacting with DNA.^{2,16} Because individual monovalent bound ligand molecules in general cannot condense DNA, such effect must be related to bound clusters of ligand molecules, which have a superior valence.¹⁷ In addition, a strong hydrophobic interaction between DNA and Hoechst can also contribute to the condensation process, as suggested by Saito et al.²

Finally, one can ask about the nature of the interactions related to each of the binding modes. As pointed out in the Introduction, a number of authors have reported that Hoechst 33258 binds preferentially to the DNA minor groove, especially at AT-rich regions.^{2,3} Some works indicate the possibility of intercalation at GC-rich regions.^{3,6} Because DNA condensation can be usually achieved by multivalent minor groove ligands but never by intercalators, we propose a scenario where mode 1 is the intercalative binding; while mode 2, the cooperative one, is the minor groove binding. Another evidence of such scenario is the fact that some intercalators can increase the DNA persistence length,^{18–21} an effect also observed for Hoechst 33258 for $C_T < 3 \mu\text{M}$, the concentration range in which binding mode 1 dominates.

CONCLUSIONS

In this work, we have studied the DNA interaction with the ligand Hoechst 33258 by performing single-molecule stretching experiments in the entropic low force regime. By using a previously developed two-sites quenched disorder statistical model, we have decoupled the two binding modes that the ligand exhibits with DNA, determining the physicochemical parameters of each of these modes. It is the first work that extends the applicability of our model to DNA-ligand systems with multiple binding modes, showing that these modes can in fact be decoupled and that the nature of the interactions can, in principle, be identified. Such analysis can be straightforwardly applied to other DNA-ligand systems with multiple binding modes, opening new perspectives in this field.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: marcos.rocha@ufv.br. Phone: +55 (31)3899-3399. Fax: +55 (31)3899-2483.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

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) Reddy, B. S.; Sharma, S. K.; Lown, J. W. Recent Developments in Sequence Selective Minor Groove DNA Effectors. *Curr. Med. Chem.* **2001**, *8*, 475–508.
- (2) Saito, M.; Kobayashi, M.; Iwabuchi, S.; Morita, Y.; Takamura, Y.; Tamiya, E. DNA Condensation Monitoring After Interaction with

Hoechst 33258 by Atomic Force Microscopy and Fluorescence Spectroscopy. *J. Biochem.* **2004**, *136*, 813–823.

(3) Bailly, C.; Colson, P.; Henichart, J.; Houssier, C. The Different Binding Modes of Hoechst 33258 to DNA Studied by Electric Linear Dichroism. *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 3705–3709.

(4) Bontemps, J.; Housster, C.; Fredericq, E. Physico-Chemical Study of the Complexes of '33258 Hoechst' with DNA and Nucleohistone. *Nucleic Acids Res.* **1975**, *2*, 971–984.

(5) Stokke, T.; Steen, H. B. Multiple Binding Modes for Hoechst 33258 to DNA. *J. Histochem. Cytochem.* **1985**, *33*, 333.

(6) Colson, P.; Houssier, C.; Bailly, C. Use of Electric Linear Dichroism and Competition Experiments with Intercalating Drugs to Investigate the Mode of Binding of Hoechst 33258. Berenil and DAPI to GC Sequences. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1995**, *13*, 351–366.

(7) Crisafuli, F. A. P.; Cesconetto, E. C.; Ramos, E. B.; Rocha, M. S. DNA-Cisplatin Binding Mechanisms Peculiarities Studied with Single Molecule Stretching Experiments. *Appl. Phys. Lett.* **2012**, *100*, 083701.

(8) Crisafuli, F. A. P.; Cesconetto, E. C.; Ramos, E. B.; Rocha, M. S. DNA-Cisplatin Interaction Studied with Single Molecule Stretching Experiments. *Integr. Biol.* **2012**, *2012*, 568–574.

(9) Siman, L.; Carrasco, I. S. S.; da Silva, J. K. L.; Oliveira, M. C.; Rocha, M. S.; Mesquita, O. N. Quantitative Assessment of the Interplay Between DNA-Elasticity and Co-operative Binding of Ligands. *Phys. Rev. Lett.* **2012**, *109*, 248103.

(10) Cesconetto, E. C.; Junior, F. S. A.; Crisafuli, F. A. P.; Mesquita, O. N.; Ramos, E. B.; Rocha, M. S. DNA Interaction with Actinomycin D: Mechanical Measurements Reveal the Details of the Binding Data. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, DOI: 10.1039/c3cp50898f.

(11) Amitani, I.; Liu, B.; Dombrowski, C. C.; Baskin, R. J.; Kowalczykowski, S. C. Watching Individual Proteins Acting on Single Molecules of DNA. *Methods Enzymol.* **2010**, *472*, 261–291.

(12) Marko, J. F.; Siggia, E. D. Stretching DNA. *Macromolecules* **1995**, *28*, 8759–8770.

(13) Strick, T.; Allemand, J. F.; Croquette, V.; Bensimon, D. Twisting and Stretching Single DNA Molecules. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **2000**, *74*, 115–140.

(14) Wang, M. D.; Yin, H.; Landick, R.; Gelles, J.; Block, S. M. Stretching DNA with Optical Tweezers. *Biophys. J.* **1997**, *72*, 1335–1346.

(15) Daune, M. *Molecular Biophysics*, 1st ed.; Oxford University Press: Oxford, U.K., 1999.

(16) Aleman, C.; Adhikary, A.; Zanuy, D.; Casanovas, J. On the Protonation Equilibrium for the Benzimidazole Derivative Hoechst 33258: an Electronic Molecular Orbital Study. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2002**, *20*, 301–310.

(17) Bloomfield, V. A. DNA Condensation by Multivalent Cations. *Biopolymers* **1997**, *44*, 269–282.

(18) Yoshikawa, K.; Matsuzawa, Y.; Minagawa, K.; Doi, M.; Matsumoto, M. 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.* **1992**, *188*, 1274–1279.

(19) Tessmer, I.; Baumann, C. G.; Skinner, G. M.; Molloy, J. E.; Hoggett, J. G.; Tendler, S. J. B.; Allen, S. Mode of Drug Binding to DNA Determined by Optical Tweezers Force Spectroscopy. *J. Mod. Opt.* **2003**, *50*, 1627–1636.

(20) Cassina, V.; Seruggia, D.; Beretta, G. L.; Salerno, D.; Brogioli, D.; Manzini, S.; Zunino, F.; Mantegazza, F. Atomic Force Microscopy Study of DNA Conformation in the Presence of Drugs. *Eur. Biophys. J.* **2010**, *40*, 59–68.

(21) Rocha, M. S.; Lúcio, A. D.; Alexandre, S. S.; Nunes, R. W.; Mesquita, O. N. DNA-Psoralen: Single-Molecule Experiments and First Principles Calculations. *Appl. Phys. Lett.* **2009**, *95*, 253703.

Referências Bibliográficas

- [1] ASHKIN, A.; “*Acceleration and trapping of particles by radiation pressure*”. Phys. Rev. Lett., **24**, 156-159, 1970.
- [2] ASHKIN, A. and DZIEDZIC, J. M.; “*Optical levitation by radiation pressure*”. Appl. Phys. Lett. **19**, 283-85, 1971.
- [3] ASHKIN, A. and DZIEDZIC, J. M.; “*Optical levitation in high-vacuum*” Appl. Phys. Lett. **28**, 333-335, 1976.
- [4] ASHKIN, A. and DZIEDZIC, J. M.; “*Observation of resonances in radiation pressure on dielectric spheres*”. Phys. Rev. Lett., **38**, 1351-1354, 1977.
- [5] ASHKIN, A. and DZIEDZIC, J. M.; “*Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria*”. Science, **235**, 1517–1520, 1987.
- [6] ASHKIN, A., DZIEDZIC, J. M., BJORKHOLM, J. E., CHU, S.; “*Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles*”. Opt. Lett., **11**, 288-290, 1980.
- [7] ASHKIN, A., DZIEDZIC, J. M. and YAMANE T. “*Optical trapping and manipulation of single cells using infrared-laser beams*”. Nature, **330**, 769-771, 1987.
- [8] ASHKIN, A.; “*Forces of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime*”. Biophys. J. **61**, 569–582, 1992.
- [9] ASHKIN, A.; “*Optical trapping and manipulation of neutral particles using lasers*”. P. Natl. Acad. Sci. USA **94**, 4853–4860, 1997.
- [10] WATSON, J. D. and CRICK, F. H. C.; “*Molecular structure of nucleic acids - a structure for deoxyribose nucleic acid*”. Nature, **171**, (4356), 737–738, 1953.
- [11] WATSON, J. D. and CRICK, F. H. C.; “*Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid*”. Nature, **171**, (4361), 964–967, 1953.

- [12] NEUSA, M. J. S., NADIR, F. e DEMÉTRIO D.; “A CONSTRUÇÃO COLETIVA DO CONHECIMENTO CIENTÍFICO SOBRE A ESTRUTURA DO DNA”. *Ciência e Educação*, **11**, 223-233, 2005.
- [13] WATSON, J., BAKER, T., BELL, S., GANN, A., LEVINE, M., LOSICK, R.; “*Molecular Biology of the Gene*”. 5ª Edition, Person Education, 2004.
- [14] ADAMS, R. L. P., KNOWLER, T. J., LEADER, P. D.; “*The biochemistry of the nucleic acids*”. 11th Ed., Chapman & Hall Ltd, 1992.
- [15] ADHIKARY, A., BUSCHMANN V., MUELLER C. and SAUER M.; “*Ensemble and single-molecule fluorescence spectroscopic study of the binding modes of the bis-benzimidazole derivative Hoechst 33258 with DNA*”. *Nucleic Acids Research*, **Vol. 31**, **No. 8**, 2178-2186, 2003.
- [16] SAITO, M., KOBAYASHI, M., IWABUCHI, S., MORITA, Y., TAKAMURA, Y., TAMAYA, E.; “*DNA Condensation Monitoring After Interaction with Hoechst 33258 by Atomic Force Microscopy and Fluorescence Spectroscopy*”. *J. Biochem.*, **136**, 813-823, 2004.
- [17] SINGH, M. P., JOSEPH T., KUMAR, S., BATHINI, Y., and LOWN, J. W.; “*Synthesis and Sequence-Specific DNA Binding of a Topoisomerase Inhibitory Analog of Hoechst 33258 Designed for Altered Base and Sequence Recognition*”. *Chemical Research in Toxicology*, **5**, 5957-607, 1992.
- [18] CRISAFULI, F. A. P., CESCO NETTO, E. C., RAMOS, E. B., ROCHA, M. S.; “*DNA-Cisplatin Binding Mechanisms Peculiarities Studied with Single Molecule Stretching Experiments*”. *Applied Physics Letters*, **100**, 083701, 2012.
- [19] CRISAFULI, F. A. P., CESCO NETTO, E. C., RAMOS, E. B., ROCHA, M. S.; “*DNA-Cisplatin Interaction Studied with Single Molecule Stretching Experiments*”. *Integrative Biology*, 568-574, 2012.
- [20] CESCO NETTO, E. C., JUNIOR, F. S. A., CRISAFULI, F. A. P., MESQUITA, O. N., RAMOS, E. B., ROCHA, M. S.; “*DNA Interaction with Actinomycin D: Mechanical Measurements Reveal the Details of the Binding Data*”. *Physical Chemistry Chemical Physics*, DOI: 10.1039/c3cp50898f, 2013.
- [21] SIMAN, L., CARRASCO, I. S. S., DA SILVA, J. K. L., OLIVEIRA, M. C., ROCHA, M. S., MESQUITA, O. N. “*Quantitative Assessment of the Interplay Between DNA-Elasticity and Co-operative Binding of Ligands*”. *Physical Review Letters*, **109**, 248103, 2012.

- [22] MILES, J.P., JUSTIN, E.M., DAVID, Mc.; “*Optical Tweezers: Methods and Applications*”. Chapman and Hall/CRC, Taylor and Francis Group, 6000 Broken Sound Parkway NW, Suite 300, Boca Raton, FL 33487-2742, 2010.
- [23] MAZOLLI, A., NETO, P. A. M., and NUSSENZVEIG, H. M.; “*Theory of trapping forces in optical tweezers*”. Proc. R. Soc. Lon. **A 459**, 3021–3041, 2003.
- [24] ROCHA, M. S.; “*Pinças Ópticas: Experimento e Teoria*”. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil, 2004.
- [25] CRISAFULI, F.A.P.; “*Caracterização da interação DNA-Cisplatina usando pinça ótica e videomicroscopia*” Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil, 2012.
- [26] ROCHA, M. S.; “*Pinças ópticas: experimento, teoria e aplicação no estudo da interação DNA-fármacos*”. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil, 2008.
- [27] MAZOLLI, A.; “*Teoria das pinças ópticas: uma aplicação da teoria de espalhamento Mie*”. Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2003.
- [28] DAHM, R.; “*Friedrich Miescher and the discovery of DNA*”. Developmental Biology, **278**, 274-288, 2005.
- [29] DAUNE, M. ; “*Molecular Biophysics: Structures in Motion*”. InterEditions, Paris, 1993. Translated by Duffin, W. J., Oxford Universit Press, New York, US, 1999.
- [30] ZAHA, A., FERREIRA, H., SCHRANK, A. e PASSAGLIA, L.; “*A estrutura dos Ácidos Nucléicos*”. Biologia Molecular Básica, **3**, 33-58, 2003
- [31] RAJAGOPALA, S. V., CASJENS, S., UETZ, P.; “*The protein interaction map of bacteriophage lambda*”. BMC Microbiology, **11**, 2011.
- [32] STRICK, T., ALLEMAND, J. F., CROQUETTE, V., BENSIMON, D. “*Twisting and Stretching Single DNA Molecules*”. Prog. Biophys. Mol. Biol., **74**, 115-140, 2000.
- [33] WANG, M. D., YIN, H., LANDICK, R., GELLES, J., BLOCK, S. M.; “*Stretching DNA with Optical Tweezers*”. Biophys Journal, **72**, 1335-1346, 1997.
- [34] FERREIRA, M. C. G. M.; “*Estudo da Transição Entrópica do DNA Induzida por Intercalantes Utilizando a Técnica de Pinçamento Óptico e Espectroscopia de Autocorrelação de Intensidades*”. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil, 2007.

- [35] NETO, J. C.; “*Medida da Elasticidade Entropica de Uma Molécula de DNA*”. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil, 2001.
- [36] MARKO, J. F. and SIGGIA, E. D., “*Stretching DNA*”. *Macromolecules*, **28** (26), 8759–8770, 1995.
- [37] BAILLY, C., COLSON, P., HENICHART, J., HOUSIER, C.; “*The Different Binding Modes of Hoechst 33258 to DNA Studied by Electric Linear Dichroism*”. *Nucleic Acid Res.*, **21**, 3705-3709, 1993.
- [38] REDDY, B.S., SHARMA, S.K., and LOWN, J.W. “*Recent developments in sequence selective minor groove DNA effectors*”. *Current. Medicinal. Chemistry*. **8**, 475–508, 2001.
- [39] STOKKE, T.; STEEN, H. B.; “*Multiple Binding Modes for Hoechst 33258 to DNA*”. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, **33**, 333, 1985.
- [40] BONTEMPS, J., HOUSSTER, C., FREDERICQ, E.; “*Physico-Chemical Study of the Complexes of 33258 Hoechst with DNA and Nucleohistone*”. *Nucleic Acids Research*, **2**, 971-984, 1975.
- [41] ALEMAN, C., ADHIKARY, A., ZANUY, D., CASANOVAS, J. “*On the Protonation Equilibrium for the Benzimidazole Derivative Hoechst 33258: an Electronic Molecular Orbital Study*”. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, **20**, 301-310, 2002.
- [42] BLOOMFIELD, V. A. “*DNA Condensation by Multivalent Cations*”. *Biopolymers*, **44**, 269-282, 1997.
- [43] KAKKAR, R., GARG, R. and SURUCHI; “*Towards Understanding the Molecular Recognition Process in Hoechst-DNA Complexes*”. *Journal of Molecular Structure*, **584**, 37-44, 2002.
- [44] BLOSSEY, R. and SCHIESSEL, H.; “*The dynamics of the nucleosome: thermal effects, external forces and ATP*”, *FEBS Journal*, **28**, 3619-3632, 2011.
- [45] AMITANI, I., LIU, B., DOMBROWSKI, C. C., BASKIN, R. J., KOWLCZYKOWSKI, S. C. “*Watching Individual Proteins Acting on Single Molecules of DNA*”. *Methods Enzymol*, **472**, 261-291, 2010.
- [46] YOSHIKAWA, K., MATSUZAWA, Y., MINAGAWA, K., DOI, M., MATSUMOTO, M. “*Opposite Effect Between Intercalator and Minor Groove Binding Drug on the Higher Order Structure of DNA as Is Visualized by Fluorescence Microscopy*”. *Biochemistry Biophysics Research Commun*, **188**, 1274-1279, 1992.

- [47] TESSMER, I., BAUMANN, C. G., SKINNER, G. M., MOLLOY, J. E., HOGGETT, J. G., TENDLER, S. J. B., ALLEN, S.; “*Mode of Drug Binding to DNA Determined by Optical Tweezers Force Spectroscopy*”. Journal of Modern Optics, **50**, 1627-1636, 2003.
- [48] CASSINA, V., SERUGGIA, D., BERETTA, G. L., SALERNO, D., BROGIOLI, D., MANZINI, S., ZUNINO, F., MANTEGAZZA, F.; “*Atomic Force Microscopy Study of DNA Conformation in the Presence of Drugs*”. European Biophysical Journal, **40**, 59-68, 2010.
- [49] ROCHA, M. S., LÚCIO, A. D., ALEXANDRE, S. S., NUNES, R. W., MESQUITA, O. N.; “*DNA-Psoralen: Single-Molecule Experiments and First Principles Calculations*”. Applied Physics Letters, **95**, 253703, 2009.