

**EFEITOS DA ELASTICIDADE E BLINDAGEM
ELETROSTÁTICA NAS INTERAÇÕES DNA–LIGANTES
ESTUDADOS VIA A TÉCNICA DE PINÇAMENTO
ÓPTICO**

Patrícia Santos Alves Sales



Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Exatas

Departamento de Física

EFEITOS DA ELASTICIDADE E BLINDAGEM
ELETROSTÁTICA NAS INTERAÇÕES DNA–LIGANTES
ESTUDADOS VIA A TÉCNICA DE PINÇAMENTO
ÓPTICO

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

Patrícia Santos Alves Sales

BELO HORIZONTE
MINAS GERAIS - BRASIL

2016



Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Exatas
Programa de Pós-Graduação em Física
Caixa Postal 702
30.123-970 Belo Horizonte - MG - Brasil

Telefone (xx) (31) 3409 5637
(xx) (31) 3409 5633
Fax (xx) (31) 3409 5688
(xx) (31) 3409 5600
e-mail pgfisica@fisica.ufmg.br

A presente tese, intitulada “Efeitos da elasticidade e blindagem eletrostática nas interações DNA-ligantes estudados via a técnica de pinçamento óptico” de autoria de **Patrícia Santos Alves Sales** submetida à Comissão Examinadora, abaixo-assinada, foi aprovada para obtenção do grau de **DOUTORA EM CIÊNCIAS**, em vinte e cinco de maio de dois mil e dezesseis.

Belo Horizonte, 25 de maio de 2016.

Prof. Oscar Nassif de Mesquita
Orientador da estudante
Departamento de Física/UFMG

Prof. Gerald Weber
Departamento de Física/UFMG

Profa. Aline Duarte Lúcio
Departamento de Física/UFLA

Prof. Márcio Santos Rocha
Coorientador da estudante
Departamento de Física/UFV

Prof. José Marcos Andrade Figueiredo
Departamento de Física/UFMG

Profa. Márcia Cristina Bernardes Barbosa
Instituto de Física/UFRGS

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus orientadores, o professor Oscar e o professor Márcio, pelas excelentes ideias e pelos ensinamentos. Aos demais professores do Departamento de Física, em especial o professor Ubirajara do nosso grupo de trabalho, que contribuíram para minha formação. Aos amigos do laboratório e do departamento por tornarem mais leve o trabalho envolvido neste processo do doutorado. Aos funcionários do departamento, essencialmente aos da oficina mecânica pelo suporte ao nosso laboratório. Às agências de fomento: CAPES, CNPq e FAPEMIG que contribuíram para a infraestrutura do laboratório e pela concessão da bolsa de estudo.

Aos meus familiares e amigos que são o alicerce de mais esta etapa da minha vida.

Eternos agradecimentos aos meus pais, Jânio e Gorete, que me dedicaram tanto amor e confiança. Ao meu irmão Oscar pelo exemplo e incentivo constante aos estudos. Ao meu marido Vitor pelo apoio incondicional ao longo de toda a trajetória da pós-graduação.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1 Introdução	1
2 Pinças Ópticas	3
2.1 Funcionamento de uma Pinça Óptica	3
2.2 Teorias de Pinças Ópticas	6
2.2.1 Teoria de Óptica Geométrica	6
2.2.2 Teoria de Rayleigh	6
2.2.3 Teoria MDSA	7
2.3 Pinça Óptica aplicada em sistemas biológicos	8
3 A molécula de DNA	9
3.1 Aspectos biológicos da molécula de DNA	9
3.1.1 Estrutura da molécula	9
3.1.2 Desnaturação e renaturação	12
3.1.3 Tipos de DNA	12
3.1.4 O DNA do fago λ	13
3.2 O DNA como um polímero	13
3.2.1 Modelo Worm-Like Chain (WLC)	16
3.3 Complexos DNA-ligantes	20
3.3.1 O modelo de Hill	21
4 Métodos experimentais	25
4.1 Montagem e calibração da pinça óptica	25

4.1.1	Preparação das amostras	26
4.1.2	Calibração da Pinça Óptica	27
4.2	Estiramento da molécula de DNA	29
4.2.1	Configuração DNA-microesfera de interesse para realizar as medidas	29
4.2.2	Constante de força da pinça óptica	31
4.2.3	Curva força \times extensão da molécula de DNA	31
5	Resultados e Discussões	35
5.1	Complexo β -CD–DNA	35
5.1.1	Resultados experimentais	38
5.2	Complexo LYZ – DNA	47
5.2.1	Resultados experimentais	48
6	Conclusões	57
A	Cálculo da $\langle r_{ee}^2 \rangle$ para um polímero	59
B	Cálculo do valor médio de $t_{\perp} ^2$	61
C	Artigo publicado	63
	Revista <i>The Journal of Physical Chemistry Letters</i>	63
	Referências Bibliográficas	70

LISTA DE FIGURAS

2.1	Esquema de forças na microesfera devido aos raios refratados.	4
2.2	Esquema de forças na microesfera devido aos raios refletidos.	5
3.1	Estrutura dos nucleotídeos: um grupo fosfato, um açúcar e uma base nitrogenada.	10
3.2	Desenho esquemático da estrutura secundária helicoidal do DNA, com o pareamento das bases nitrogenadas e as pontes de hidrogênio.	11
3.3	Diferentes tipos de DNA encontrados em condições fisiológicas: B, A e Z.	13
3.4	Variação do vetor posição e do vetor unitário tangente a uma curva arbitrária parametrizados pelo comprimento s	14
3.5	Gráfico da razão $r_{\text{Hill}}/r_{\text{max}}$ em função da concentração de ligantes livres na amostra para diferentes valores de n	24
4.1	Montagem Experimental.	26
4.2	Microesfera presa na pinça antes e depois de ser estabelecido um fluxo	28
4.3	Configurações possíveis encontradas na amostra.	30
4.4	Perfil circular do estiramento máximo da molécula antes da esfera soltar-se da pinça em relação à posição de equilíbrio.	31
4.5	Geometria do experimento de estiramento da molécula de DNA.	32
4.6	Curva típica da componente x da força \times extensão da molécula de DNA.	33
5.1	Desenho esquemático da β -CD. A molécula possui diâmetro interno de $\sim 0,6$ nm, diâmetro externo de $\sim 1,5$ nm e altura de $\sim 0,8$ nm.	36
5.2	Comprimento de persistência do complexo β -CD–DNA em função do tempo para $C_T = 2$ mM.	39
5.3	Comprimento de persistência do complexo β -CD–DNA em função da concentração de CD na amostra para várias moléculas.	40
5.4	Comprimento de contorno do complexo β -CD–DNA em função da concentração de CD na amostra.	41

5.5	Comprimento de persistência do complexo β -CD–DNA em função da concentração de CD na amostra.	42
5.6	Ajuste do inverso do comprimento de persistência em função da concentração de CD em solução.	43
5.7	<i>Pontos</i> : Inverso do comprimento de persistência do complexo CD–DNA em função da concentração total de CD na amostra para o intervalo $0 \leq C_T \leq 6$ mM; <i>linha sólida</i> : ajuste dos dados, Eq. 5.7.	45
5.8	Inverso do comprimento de persistência em função da concentração de CD $6 \leq C_T \leq 16$ mM; <i>pontos</i> : dados experimentais; <i>linha sólida</i> : ajuste dado pela Eq. 5.7.	47
5.9	Estrutura da lisozima	48
5.10	Comprimento de persistência do complexo LYZ–DNA em função da concentração de LYZ na amostra.	50
5.11	Comprimento de contorno do complexo LYZ – DNA em função da concentração de LYZ na amostra.	51
5.12	Sistema de referência usado no complexo LYZ – DNA.	52
5.13	Ajuste do comprimento de persistência do complexo LYZ–DNA em função da concentração total de LYZ na amostra.	56

LISTA DE TABELAS

5.1	Resultado do ajuste apresentado na Figura 5.13.	55
5.2	Fração de cargas neutralizadas.	56

RESUMO

ALVES, Patrícia S., Universidade Federal de Minas Gerais, Maio de 2016. **Efeitos da elasticidade e blindagem eletrostática nas interações DNA–ligantes estudados via a técnica de pinçamento óptico.** Orientador: Oscar Nassif de Mesquita. Coorientador: Márcio Santos Rocha.

Estudamos as mudanças nas propriedades mecânicas em dois diferentes tipos de DNA-ligantes. Foram feitas medidas de estiramentos de moléculas únicas usando a técnica de pinçamento óptico, no qual o comprimento de contorno e o comprimento de persistência do complexo podem ser extraídos. O primeiro complexo estudado envolve a interação da β -ciclodextrina neutra com o DNA. A partir dos dados do comprimento de persistência em função da concentração deste fármaco observamos um processo cooperativo na interação DNA- β -ciclodextrina, determinando parâmetros físico-químicos relevantes. Os resultados indicam que o balanço de forças atrativas e repulsivas é um mediador da cooperatividade observada neste processo. Estudamos também a interação entre a proteína lisozima e a molécula de DNA realizando o mesmo tipo de estiramento em diferentes concentrações de sódio na solução. Os resultados sugerem que o comportamento não monotônico observado do comprimento de persistência do complexo lisozima-DNA neste caso se deve a competição entre dois fatores: (a) o aumento do raio efetivo do complexo que aumenta a rigidez do mesmo e (b) a diminuição da densidade de carga que diminui o comprimento de persistência do complexo lisozima-DNA. Além disso, os resultados experimentais indicam uma mudança na conformação da lisozima ao longo da dupla hélice ao alteramos a concentração de sódio na amostra.

ABSTRACT

ALVES, Patrícia S., Universidade Federal de Minas Gerais, May, 2016. **The effects of elaticity and eletrostatic screening in DNA-ligands interactions studied with optical tweezers.** Advisor: Oscar Nassif de Mesquita. Co-Advisor: Márcio Santos Rocha.

We have studied the changes on the mechanical properties of two different types of DNA-ligand complexes. Single molecule stretching experiments were performed by using the optical tweezers technique, from which the contour and persistence lengths of the complexes can be promptly extracted. The first DNA ligand studied was the neutral β -cyclodextrin. From the persistence length behavior as a function of the cyclodextrin concentration, we concluded that a cooperative process occurs for this interaction, determining the relevant physicochemical parameters. The results indicate that the balance between attractive and repulsive forces is a mediator for the cooperativity observed in this process. We also studied the interaction between the protein lysozyme and the DNA molecule performing the same type of stretching experiments at different sodium concentrations in the buffer solution. The results suggest that the observed non-monotonic behavior of the persistence length of the complexes in this case is due to competition between two factors: (a) the increase of the effective diameter of the DNA-lysozyme complexes, which increases its bending rigidity, and (b) the decrease of the negative charge density of the phosphate backbone, which reduces the persistence length. Furthermore, the experimental results indicate a change of the lysozyme conformation bound along the double-helix as we change the sodium concentration in the buffer.

Capítulo 1

Introdução

Os sistemas vivos são exemplos fascinantes de como a matéria pode se organizar em estados de alta complexidade. A descoberta da estrutura da dupla hélice do DNA por Watson e Crick em 1953 [1] foi um estímulo para estudos referentes à estrutura e à organização de sistemas biológicos. O grande desafio da física biológica é descrever estes sistemas complexos por meio das leis físicas. Para isso, abordagens experimentais e teóricas se complementam a fim de ajudar na compreensão desses sistemas; por exemplo, técnicas experimentais como difração de raios-X e microscopia eletrônica podem ser usadas para elucidar a estrutura de biomoléculas.

Alguns fármacos e proteínas são capazes de interagir com o DNA, modificando as propriedades mecânicas desta macromolécula. O estudo da interação entre DNA e ligantes é importante em diversas áreas do conhecimento: física, química, biologia, medicina, entre outras; contribuindo para a compreensão dos processos intracelulares e para o tratamento de doenças. Desta forma, estas interações têm sido pesquisada e revisada por vários autores [2, 3]. Em tratamentos quimioterápicos, por exemplo, detalhes da interação entre DNA e fármacos são de extrema importância. Muitos fármacos utilizados em quimioterapia apresentam efeitos sobre as funções de transcrição, tradução e replicação gênica, por exemplo a daunomicina que intercala entre os pares de base da molécula de DNA comprometendo suas funções vitais, levando à morte da célula.

Neste trabalho abordamos as interações dos ácidos nucleicos com alguns ligantes. Estudamos o complexo formado entre o DNA e a β -ciclodextrina neutra e o complexo formado entre o DNA e a lisozima. A ciclodextrina é um oligossacarídeo e é amplamente utilizada em produtos de consumo, como alimentos. A lisozima é uma proteína globular com função antibacteriana encontrada em grande quantidade na clara do ovo. São estudadas as mudanças nas propriedades mecânicas de moléculas únicas

de DNA quando estas são expostas a esses ligantes. A análise dessas propriedades mecânicas, comprimento de persistência e de contorno do complexo, é feita usando o modelo Worm-Like Chain que descreve o comportamento de polímeros sob a ação de forças entrópicas. Experimentalmente, prendemos uma das extremidades do DNA na lamínula e a outra em uma microesfera de poliestireno. Utilizando a pinça óptica capturamos esta microesfera e estiramos a molécula medindo simultaneamente a força aplicada para este estiramento. Deste procedimento, obtemos uma curva da força por extensão da molécula da qual podemos extrair propriedades importantes como o comprimento e a elasticidade da molécula. Este é um método poderoso que nos permite obter informações de uma única molécula isolada, ao invés de médias sobre um sistema composto por inúmeras moléculas.

Conectamos a mudança das propriedades mecânicas do DNA induzida pelos ligantes à informações físico-químicas da interação. Conhecendo como o comprimento de persistência varia em função da concentração de ligantes na amostra obtemos parâmetros físico-químicos desta interação. A fim de estabelecer essa conexão entre a mudança de uma propriedade mecânica e as informações físico-químicas, no capítulo 2 apresentamos uma breve revisão da técnica experimental usada para realizar as medidas das quais obtemos as propriedades mecânicas dos complexos, o pinçamento óptico. No capítulo 3 descrevemos aspectos biológicos e físicos da molécula de DNA, além de uma revisão do modelo Worm-Like Chain que usamos para descrever a molécula de DNA e o complexo DNA-ligante mecanicamente. Ainda no capítulo 3, há uma revisão do modelo de Hill que usamos para extrair informações físico-químicas das interações DNA-ligantes.

As técnicas experimentais como o preparo das amostras, a configuração da montagem e o procedimento para o estiramento da molécula de DNA são descritos no capítulo 4. Os resultados são analisados e discutidos no capítulo 5. Por fim, apresentamos as conclusões deste trabalho no capítulo 6.

Capítulo 2

Pinças Ópticas

Neste capítulo, apresentamos o princípio de funcionamento e uma breve revisão das principais teorias de pinça óptica que foi a técnica experimental que utilizamos para fazer os estiramentos dos complexos DNA–ligantes.

2.1 Funcionamento de uma Pinça Óptica

A ideia de que a luz transporta momento e portanto é capaz de exercer forças sobre os objetos foi confirmada teoricamente pelo físico escocês James Clerk Maxwell no século XIX. No entanto, até metade do século XX esta teoria não havia sido verificada experimentalmente. Uma das razões desta dificuldade experimental é pelo fato da pressão de radiação ser pequena. Apenas no fim da década de 60, com o laser, tornou-se possível o estudo da pressão de radiação através do uso de um feixe de luz intenso e colimado.

Em 1969, Ashkin propôs um experimento para estudar o movimento de microesferas sob a ação da pressão de radiação [4, 5, 6]. No experimento, incidia-se um laser em microesferas de poliestireno situadas em solução aquosa e media-se as velocidades destas esferas. Foram observadas velocidades próximas das que foram estimadas e além disso, um outro fenômeno não esperado: as esferas eram guiadas para a região central do feixe do laser, região cuja intensidade do laser é maior no modo TEM_{00} em que foi realizado o experimento. A pinça óptica surgiu quando, nesse experimento, o laser foi fortemente focalizado com uma objetiva. Nesta situação, foi observado que as microesferas ficavam presas na região próxima ao foco da lente.

Uma pinça óptica consiste basicamente em um feixe de laser bem focalizado por meio de uma objetiva. Como veremos, sob certas condições, este feixe é capaz de aprisionar objetos da ordem de micrômetros na região próxima do foco desta lente.

Podemos entender qualitativamente o confinamento de uma esfera sob ação da pinça usando a óptica geométrica. A Figura 2.1 mostra um esquema das forças que atuam na microesfera quando incidimos sobre a mesma um laser bem focalizado, nas regiões antes e depois do foco, devido aos raios refratados. O raio (1) que incide na esfera inferior é desviado da sua trajetória original e para que haja conservação do momento linear do sistema isolado, composto pela esfera e pela luz, haverá uma variação do momento da esfera de mesmo módulo e sentido contrário à variação de momento do raio. Desta variação de momento uma força \vec{F}_1 atua na microesfera como representado na figura. O mesmo acontece com o raio (2). Observe que foi representado o perfil de intensidade gaussiano do laser e desta forma um raio oriundo da região central do feixe possui maior intensidade do que um raio que parte das extremidades. Assim o módulo da força \vec{F}_1 é maior do que o da força \vec{F}_2 e a força resultante desloca a microesfera para a região do foco. Após passar pelo foco da lente, os raios refratados causam uma força resultante na esfera que aponta para baixo, novamente para a região do foco. Dessa forma, o efeito da refração é deslocar o centro da esfera para o foco da lente. Essa força é conhecida como força de gradiente.

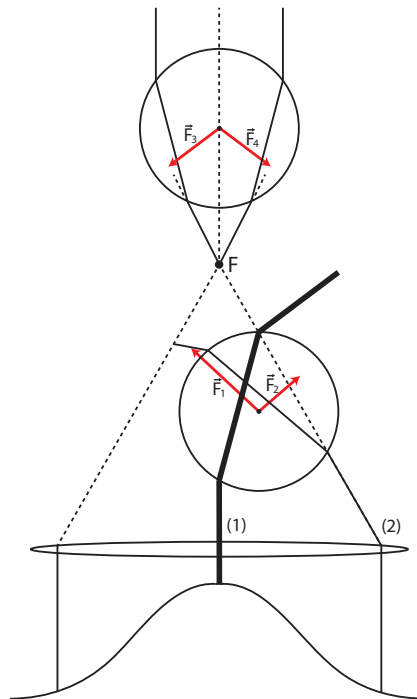


Figura 2.1: Esquema de forças na microesfera devido aos raios refratados.

Observe que na Figura 2.1 representamos os raios refratados para uma microesfera com índice de refração maior que o do meio que a envolve. Isto é fundamental

para que ocorra o pinçamento óptico; pela conservação do momento linear, podemos perceber que se o índice de refração da esfera fosse menor que o do meio, a esfera não ficaria confinada.

Além das forças provenientes dos raios refratados, atuam na microesfera forças devido aos raios refletidos. A Figura 2.2 mostra alguns raios incidentes e refletidos na superfície de uma esfera dielétrica. As reflexões causam na microesfera uma força resultante que tende a deslocá-la no sentido de propagação do feixe, o que é conhecido como pressão de radiação. Desta forma, a pressão de radiação atrapalha o pinçamento; além da reflexão na superfície, um fenômeno que contribui para a pressão de radiação é a possível absorção da luz pela microesfera. Minimizamos esta absorção trabalhando com microesferas dielétricas.

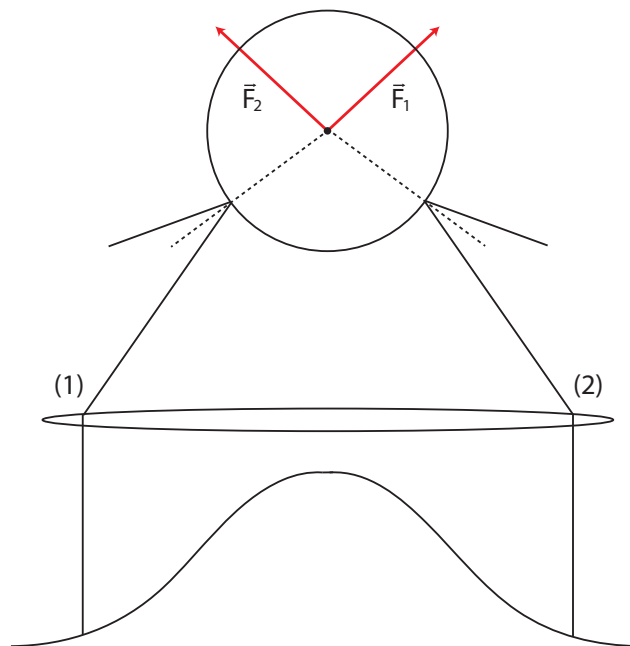


Figura 2.2: Esquema de forças na microesfera devido aos raios refletidos.

O confinamento da microesfera em uma região próxima ao foco da objetiva é feito usando uma objetiva de abertura numérica grande, que possibilita iluminar a amostra com raios mais angulados. Assim, a pressão de radiação e a força de gradiente aumentam, mas a força de gradiente aumenta mais do que a pressão de radiação e por isso o pinçamento acontece.

2.2 Teorias de Pinças Ópticas

Nesta seção apresentamos uma breve revisão das principais teorias de pinças ópticas.

2.2.1 Teoria de Óptica Geométrica

A teoria de óptica geométrica é adequada para o estudo de microesferas de tamanho muito maior que o comprimento de onda da luz incidente. Sendo a o raio da microesfera, $a \gg \lambda$. Nesse limite, podemos calcular a força sobre a microesfera exercida pelo feixe de luz integrando a força exercida por um único raio ao longo do feixe. Ashkin e Roosen foram os primeiros que calcularam a força de uma pinça óptica no regime da óptica geométrica [7, 8]. A partir desta força, podemos determinar a constante de força da pinça óptica em uma certa direção tomando a derivada parcial da componente da força nesta direção em relação à posição, na posição de equilíbrio da pinça óptica:

$$k_x = - \left(\frac{\partial F_x}{\partial x} \right)_{\vec{r}_{\text{eq}}}, \quad (2.1)$$

sendo \vec{r}_{eq} a posição de equilíbrio da microesfera na pinça. Na Ref. [9] calculamos a força e a constante de força da pinça óptica de forma analítica.

2.2.2 Teoria de Rayleigh

A teoria de Rayleigh é apropriada para microesferas que possuem um raio muito menor que o comprimento de onda do laser, válida para:

$$2k_w a (\mu_n - 1) \ll 1, \quad (2.2)$$

sendo k_w o vetor de onda no meio onde estão as microesferas, a o raio da esfera e μ_n o índice de refração relativo, $\mu_n = n_{\text{esfera}}/n_{\text{meio}}$ (n_{esfera} e n_{meio} são os índices de refração da esfera e do meio respectivamente) [10, 11]. Nesse limite, podemos aproximar a esfera por um dipolo induzido em um campo elétrico aproximadamente uniforme [12, 13]. Como o comprimento de onda é muito grande comparado ao raio da esfera, podemos considerar que a variação espacial do campo elétrico é muito pequena nas proximidades da esfera. Nestas condições, o problema é de uma esfera dielétrica em um campo uniforme. A solução deste problema é bem conhecida e pode ser encontrada na Ref. [14]. Na região externa à esfera, o potencial elétrico em coordenadas esféricas é:

$$\varphi(\theta, r) = -Er \cos \theta + \left(\frac{K-1}{K+2} \right) \frac{a^3}{r^2} E \cos \theta \quad (2.3)$$

com $K = \epsilon/\epsilon_m$, sendo ϵ e ϵ_m as permissividades elétrica do material da esfera e do meio, respectivamente; E é o campo uniforme na ausência da esfera.

Podemos identificar o momento de dipolo induzido na esfera como o termo que acompanha a razão $\frac{\cos \theta}{r^2}$, que caracteriza um dipolo elétrico. Desta forma:

$$\vec{p} = \frac{K-1}{K+2} a^3 \vec{E}. \quad (2.4)$$

A energia potencial elétrica do dipolo no campo elétrico uniforme é $U = -\vec{p} \cdot \vec{E}$. Então, a força sobre a esfera é menos o gradiente desta energia:

$$\vec{F} = -\vec{\nabla}(\vec{p} \cdot \vec{E}). \quad (2.5)$$

Fazendo este produto escalar e usando a Eq. 2.1 obtemos a constante de força da pinça óptica sobre a microesfera:

$$k_x = \frac{K-1}{K+2} a^3 \left(\frac{\partial^2 E^2}{\partial x^2} \right)_{\vec{r}_{\text{eq}}}. \quad (2.6)$$

Observe que a constante de força é proporcional ao Laplaciano da intensidade do campo, visto que $I \propto E^2$. Assim, a força é proporcional ao gradiente da intensidade do campo, o que explica o pinçamento: a força que atua sobre a microesfera está direcionada para o ponto de maior intensidade do campo, o foco. A aproximação de campo uniforme é usada apenas para determinar o momento de dipolo induzido na microesfera. Estritamente, o campo elétrico não pode ser invariável espacialmente. Tal fato, resultaria em um valor nulo para a derivada parcial da Eq. 2.6.

2.2.3 Teoria MDSA

As teorias de óptica geométrica e Rayleigh funcionam apenas em alguns limites: a primeira para microesferas muito grandes, $a \gg \lambda$ e a segunda para microesferas pequenas, $a \ll \lambda$. Uma teoria completa para o estudo da constante de força para microesferas em qualquer faixa de tamanho foi proposta por Mazolli, Maia Neto e Nussenzveig [15, 16], a teoria MDSA. Esses autores calcularam as forças axial e transversa que atuam em uma microesfera de raio e índice de refração arbitrários devido à pinça óptica. O cálculo é baseado na representação de Debye para o feixe de laser focalizado além da objetiva e na teoria de espalhamento de Mie para a interação do

feixe com a microesfera.

Nesta teoria, as grandezas utilizadas nos cálculos são medidas de forma independente, não há parâmetros ajustáveis. Posteriormente, foram incluídas outras aberrações ópticas na teoria, em especial o astigmatismo [17].

Atualmente, a teoria MDSA de pinças ópticas é a mais realista e mais geral, pode ser utilizada para microesferas de qualquer tamanho. Vale ressaltar que esta teoria se reduz a teoria da óptica geométrica para microesferas grandes ($a \gg \lambda$) e a teoria de Rayleigh para microesferas pequenas ($a \ll \lambda$).

2.3 Pinça Óptica aplicada em sistemas biológicos

Atualmente, manipular sistemas biológicos é uma das importantes aplicações da pinça óptica. O uso desta técnica em sistemas biológicos iniciou-se em 1987 em um experimento com o vírus do mosaico do tabaco, um vírus aproximadamente cilíndrico cujas dimensões são: 200 Å de diâmetro e 3200 Å de comprimento [18]. Neste trabalho Ashkin e colaboradores verificaram via espalhamento de luz que não apenas o vírus era capturado pela pinça como também as flutuações características da rotação deste vírus eram bastante reduzidas; indicando o alinhamento angular do vírus dentro do poço de potencial. Devido a contaminação por bactérias nas amostras desse vírus, Ashkin percebeu que as bactérias também eram pinçadas e pouco depois morriam. Por meio de uma escolha apropriada do comprimento de onda, observaram que os danos aos sistemas biológicos poderiam ser minimizados. Mudaram o laser de argônio, $\lambda = 515$ nm, que usavam e utilizando um laser de ítrio-alumínio infravermelho, $\lambda = 1064$ nm, perceberam que esses danos diminuam. Assim, conseguiram capturar e isolar por horas a bactéria *E. Coli*. [19]. Desde então, esta técnica tem sido usada no estudo de vários sistemas biológicos.

Como a força envolvida no pinçamento óptico é da ordem de piconewtons, da mesma magnitude da força para estirar uma macromolécula, como o DNA, a pinça óptica pode ser usada como um sensor de força para o estudo das propriedades mecânicas desta macromolécula, como realizado neste trabalho.

Capítulo 3

A molécula de DNA

O ácido desoxiribonucleico, o DNA, é responsável por armazenar a informação genética dos seres vivos. Em 1953, o modelo estrutural da molécula foi proposto por Watson e Crick, o que lhes renderam o Prêmio Nobel de Medicina no ano de 1962. Além de sugerir que a informação genética de cada ser vivo estava armazenada na sequência das bases que compõe a molécula de DNA, este modelo concordava com as medidas de raio X feitas na mesma época por Rosalind Franklin [20]. Utilizado nos dias atuais, este modelo estrutural é conhecido como modelo de dupla hélice.

Para armazenar a informação genética de um ser vivo, a molécula de DNA precisa ser grande. Para um ser humano, por exemplo, o tamanho desta molécula é da ordem de metro. O diâmetro das células do corpo humano é da ordem de micrômetros e tem uma cópia desta informação. Então, como é possível colocar nestas células uma molécula cujo comprimento é cerca de seis ordens de grandeza maior que o diâmetro da célula? Para isso, esta molécula precisa ser bastante empacotada. As propriedades mecânicas da molécula de DNA contribuem para este empacotamento; *in vivo*, este processo ocorre devido a interações com ligantes, especialmente com as proteínas histonas.

3.1 Aspectos biológicos da molécula de DNA

3.1.1 Estrutura da molécula

O DNA é formado pela junção de dois polímeros lineares, conhecidos como fita do DNA, que possuem como monômeros quatro nucleotídeos: adenina (A), guanina (G), timina (T) e citosina (C). Cada nucleotídeo é composto por um grupo fosfato (PO_4^-); um açúcar do tipo pentose, a desoxirribose e uma base nitrogenada, Figura

3.1. Esta é a parte que difere os nucleotídeos entre si. A adenina e a guanina são similares em estrutura química, sendo chamadas de purinas. Pelo mesmo motivo, a timina e a citosina são chamadas de pirimidinas. Como mostrado na Figura 3.2, os nucleotídeos de uma fita do DNA têm a mesma orientação relativa, sendo a orientação de uma fita oposta a da outra. Assim, podemos especificar a molécula em uma direção definida. A sequência das bases determina a estrutura primária do DNA e é única para cada organismo. A conexão entre as duas fitas do DNA é denominada estrutura secundária da molécula, proposta por Watson e Crick [1].

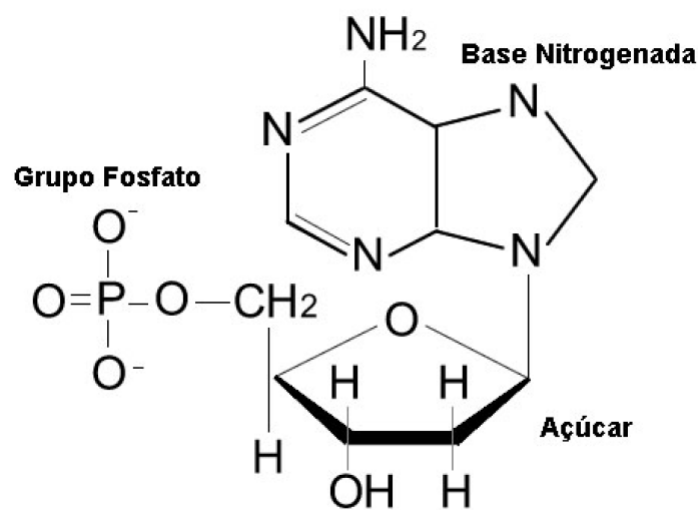


Figura 3.1: Estrutura dos nucleotídeos: um grupo fosfato, um açúcar e uma base nitrogenada. Nesta figura a base nitrogenada representada é a adenina.

As fitas enrolam-se ao redor de um eixo comum formando uma estrutura de dupla hélice. A distância entre as bases adjacentes ao longo deste eixo de rotação é de 0,34 nm e o ângulo de rotação entre estas bases é de 36° . As bases ficam dentro da estrutura da dupla hélice formada pelos fosfatos e pelos açúcares. Quando o polímero está imerso em solução fisiológica, cada grupo fosfato adquire carga -1 , o que confere à molécula de DNA um caráter predominantemente negativo.

Em uma fita, os nucleotídeos são ligados por ligações fosfodiéster estabelecidas entre a hidroxila (OH^-) ligada ao carbono 3' da pentose e o fosfato do nucleotídeo adjacente. As duas fitas são unidas por pontes de hidrogênio¹ entre as bases, assumindo uma forma helicoidal. As pontes de hidrogênio formam-se sempre entre uma purina e uma pirimidina, sendo que G pareia-se com C por três pontes de hidrogênio e A pareia-se com T por duas pontes de hidrogênio, Figura 3.2.

¹Uma ligação relativamente fraca; em termos de energia de ligação, uma ponte de hidrogênio possui entre 1 a 10 KJ/mol e uma ligação covalente possui entre 100 a 1000 kJ/mol.

As bases possuem dois tamanhos: as pirimidinas são menores, com apenas um anél aromático e as purinas que são maiores, com dois anéis. Não obstante, os pares AT e CG são altamente isostéricos, têm o mesmo tamanho. Como ambos os pares têm a mesma dimensão, a dupla hélice apresenta um diâmetro uniforme ao longo da sua extensão. A razão molar entre A e T é igual a 1, o mesmo acontece para as concentrações de C e G. Entretanto, a quantidade molar de AT e de CG varia de acordo com a sequência de DNA analisada. Este tipo de estrutura é fundamental para replicação da molécula de DNA, visto que cada base especifica sua base complementar.

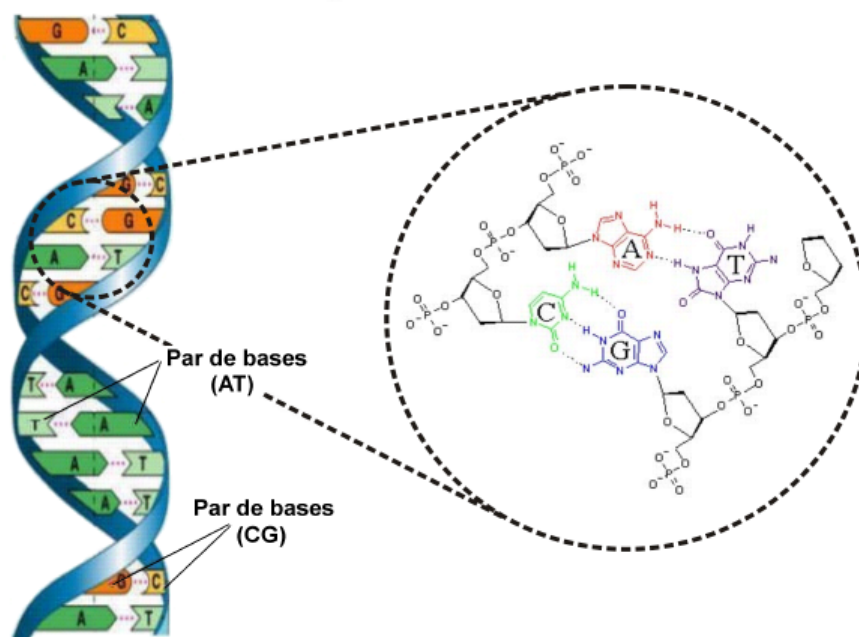


Figura 3.2: Desenho esquemático da estrutura secundária helicoidal do DNA, com o pareamento das bases nitrogenadas e as pontes de hidrogênio.

Várias forças agem em conjunto para estabilizar a estrutura da dupla-hélice do DNA. Essas forças devem ser fortes o suficiente para manter a integridade da macromolécula, mas devem permitir uma flexibilidade conformacional que é essencial para a atividade da mesma. Efeitos hidrofóbicos estabilizam o pareamento, ou seja, os anéis púricos e pirimídicos das bases são forçados para o interior da dupla-hélice por coesão das moléculas internas de água. Por outro lado, os sítios hidrofílicos das bases ficam expostos aos solventes do meio, através das cavidades da dupla-hélice. Assim, moléculas que interagem com sequências específicas de base, em geral proteínas, podem identificar estas sequências sem romper a estrutura da dupla-hélice.

3.1.2 Desnaturação e renaturação

A desnaturação e a renaturação são processos fundamentais na replicação da molécula de DNA. Desnaturação e renaturação são sinônimos de fusão e reanelamento, respectivamente. A desnaturação ocorre com o rompimento das pontes de hidrogênio entre as bases, separando as duas fitas. A renaturação é o processo inverso. Durante a desnaturação a estrutura da dupla fita se abre e cada fita funciona como um molde para gerar dois novos DNAs idênticos, em decorrência do pareamento restrito das bases. Assim, cada uma das moléculas novas tem uma fita da molécula original e uma fita nova, sintetizada a partir dos nucleotídeos presentes na célula e determinada pelo mapeamento das bases. Em função desta característica, a replicação do DNA é dita semiconservativa. A desnaturação do DNA pode ser provocada por diversos fatores, como o aumento da temperatura, a titulação com ácidos e o estiramento da molécula de DNA na presença de fármacos intercalantes [21].

Uma das maneiras de se medir a desnaturação do DNA é por meio da variação da absorvância da luz ultravioleta pela molécula. Como as bases nitrogenadas são as principais responsáveis pela absorção, que é máxima para $\lambda = 260$ nm, quando as fitas da dupla hélice estão completamente separadas, a absorção é aproximadamente 37% maior do que aquela obtida para o DNA em sua forma nativa.

3.1.3 Tipos de DNA

O DNA pode assumir diferentes conformações dependendo das bases que o compõem e do meio em que se encontra. Em condições fisiológicas, encontramos DNAs dos tipos: A, B e Z. O tipo mais comum, usado também em nossos experimentos, é o B. Na forma B, a dupla hélice do DNA gira no sentido horário. A distância média entre dois pares de base adjacentes é 0,34 nm e a cada 10,4 pares de base a hélice completa uma volta. O diâmetro médio da hélice é de 2,37 nm e o ângulo médio de rotação entre dois nucleotídeos consecutivos é de $34,6^\circ$.

A forma A é mais curta e mais larga em relação a forma B. Esta possui uma distância média de 0,26 nm por par de bases e um diâmetro médio de 2,55 nm. A forma Z é mais longa e fina em relação a forma B, com a distância média entre os pares de bases de 0,46 nm e um diâmetro médio de 1,84 nm. A Figura 3.3 apresenta um desenho esquemático da comparação desses três tipos de DNA.

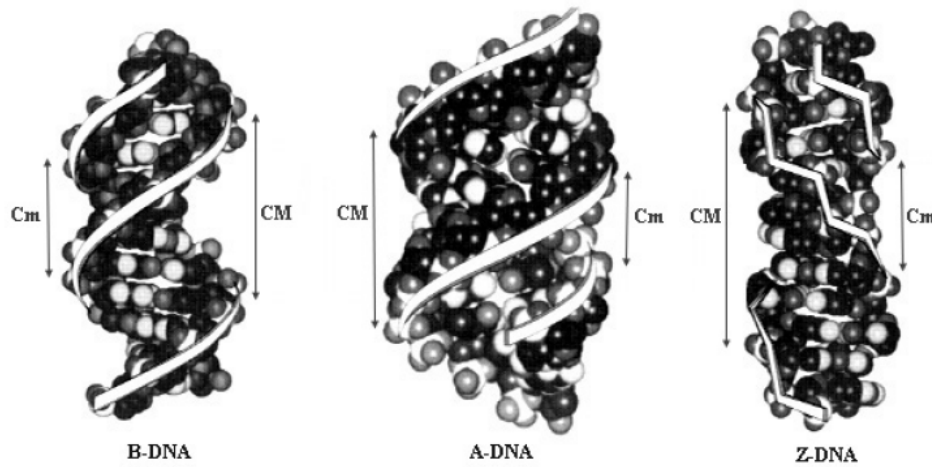


Figura 3.3: Diferentes tipos de DNA encontrados em condições fisiológicas: B, A e Z respectivamente. Para cada tipo de DNA observamos tamanhos diferentes de cavidades entre as duas hélices. Na figura Cm representa a cavidade menor e CM a cavidade maior.

3.1.4 O DNA do fago λ

Em nossos experimentos usamos o DNA do fago λ , um vírus que infecta a bactéria *E. coli*. Este DNA é muito usado em experimentos de estiramento devido ao seu tamanho. Uma molécula de λ -DNA possui aproximadamente 48500 pares de base, o que resulta em um comprimento de contorno médio de 16,5 μm .

3.2 O DNA como um polímero

Um polímero é formado por um número grande de unidades fundamentais, os monômeros. Podemos estudar o comportamento da molécula de DNA sob a perspectiva da dinâmica de polímeros, utilizando o modelo Worm-Like Chain (WLC) que é bastante utilizado em análises de experimentos de estiramento da molécula DNA [3, 22, 23, 24]. Neste modelo, consideramos o polímero como uma sequência de hastes de mesmo comprimento conectadas por vértices que permitem a rotação dessas hastes. Seja θ_i o ângulo entre duas hastes consecutivas; o modelo WLC é construído considerando a energia de curvatura harmônica em função do ângulo θ_i , $E(\theta_i) \propto \theta_i^2$. A energia de curvatura da cadeia polimérica é obtida no limite contínuo ao fazermos o comprimento dessas hastes tender a zero. Assim,

$$E = \frac{\kappa_f}{2} \int_0^{L_c} |C|^2 ds \quad (3.1)$$

sendo C a curvatura de cada segmento, L_c o comprimento de contorno do polímero e κ_f a rigidez flexural da haste que está relacionada diretamente com o comprimento de persistência do polímero:

$$A = \beta \kappa_f \quad (3.2)$$

em que $\beta = 1/k_B T$, k_B a constante de Boltzmann e T a temperatura absoluta. A Figura 3.4 mostra o vetor posição, $\vec{r}(s)$, que localiza um ponto arbitrário ao longo da curva e o vetor unitário tangente $\hat{t}(s)$ a trajetória em cada ponto, ambos parametrizados pelo comprimento s . Daí, $\hat{t}(s) = \frac{\partial \vec{r}}{\partial s}$ e a curvatura, C , é dada por:

$$C = \left| \frac{\partial^2 \vec{r}}{\partial s^2} \right| = \left| \frac{\partial \hat{t}}{\partial s} \right|. \quad (3.3)$$

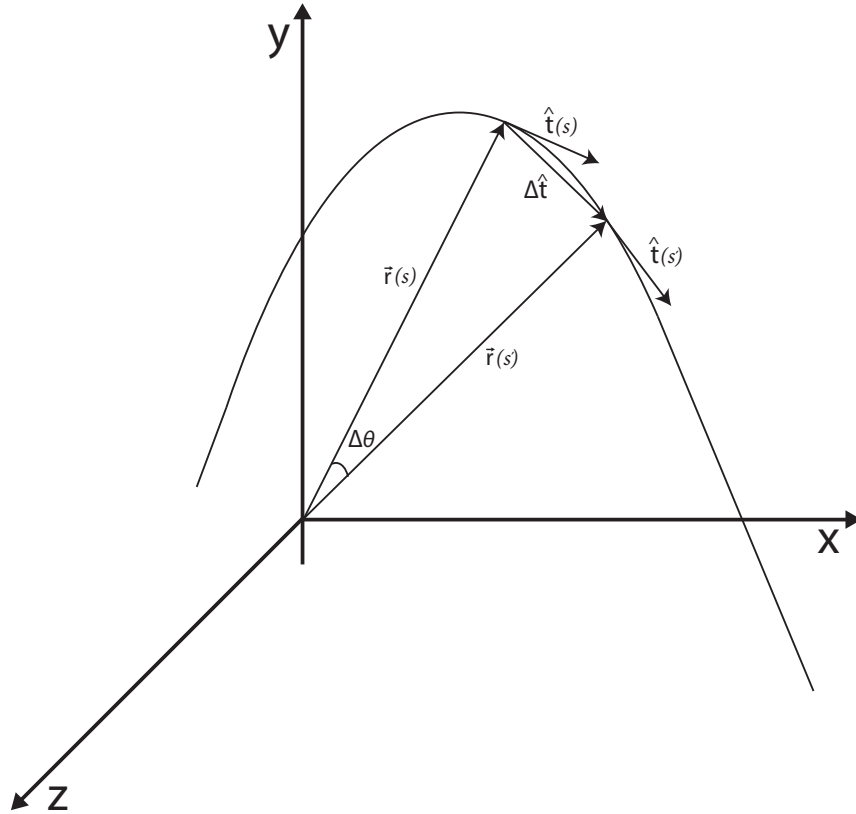


Figura 3.4: Variação do vetor posição e do vetor unitário tangente a uma curva arbitrária parametrizados pelo comprimento s .

Comprimento de Persistência

Da Eq. 3.2, vemos que para uma dada temperatura, A é proporcional à ri-

gidez flexural κ_f e para uma dada rigidez flexural, A é inversamente proporcional à temperatura T . Assim, A nos fornece uma ideia imediata da rigidez do polímero. Quanto maior o valor de A mais rígido é o polímero, apresentando poucas dobras; e quanto menor o valor de A , mais flexível é o polímero, apresentando muitas dobras. Fisicamente, o comprimento de persistência A é a distância característica ao longo do polímero em que a autocorrelação espacial entre os vetores tangentes ao polímero vai a zero, $\langle \hat{t}(s) \cdot \hat{t}(s') \rangle = 0$. Para a molécula de DNA, dois fatores compõem o comprimento de persistência: um relacionado a estrutura, a composição, da molécula e o outro fator de carácter eletrostático, devido a distribuição de cargas negativas ao longo da dupla hélice [25].

Podemos avaliar as flutuações de curvatura de um polímero considerando θ o ângulo entre $\hat{t}(s)$ e $\hat{t}(s')$, Figura 3.4. Este ângulo varia conforme o polímero adquire novas configurações e para caracterizá-las, podemos calcular o valor médio $\langle \theta^2 \rangle$. Para um círculo de raio R_c , θ é o ângulo subtendido pelo arco de comprimento s . Assim, a energia de curvatura do arco,

$$E_{\text{arco}} = \frac{\kappa_f s}{2R_c^2} = \frac{\kappa_f \theta^2}{2s}. \quad (3.4)$$

Usando a distribuição de Boltzmann, podemos calcular o desvio quadrático médio $\langle \theta^2 \rangle$:

$$\langle \theta^2 \rangle = \frac{\int \theta^2 \exp(-\beta E) d\Omega}{\int \exp(-\beta E) d\Omega} \quad (3.5)$$

em que $d\Omega$ é o elemento de ângulo sólido da integração, $d\Omega = \sin\theta d\theta d\phi$. Para pequenas curvaturas, podemos considerar $\sin\theta \sim \theta$ e $E \sim E_{\text{arco}}$. Uma mudança de variável, $x^2 = \beta E_{\text{arco}}$, torna essas integrais gaussianas e o resultado final é:

$$\langle \theta^2 \rangle = \frac{2s}{\beta \kappa_f} = \frac{2s}{A}. \quad (3.6)$$

Considere a função autocorrelação espacial entre os vetores tangentes $\hat{t}(s)$ e $\hat{t}(s')$,

$$\langle \hat{t}(s) \cdot \hat{t}(s') \rangle = \langle \cos \theta \rangle. \quad (3.7)$$

Para pequenas flutuações, θ é pequeno e podemos fazer uma aproximação em primeira ordem considerando $\cos \theta \approx 1 - \frac{\theta^2}{2}$. Assim,

$$\langle \hat{t}(s) \cdot \hat{t}(s') \rangle \cong 1 - \frac{\langle \theta^2 \rangle}{2} = 1 - \frac{s}{A}, \quad (3.8)$$

que é a expansão em primeira ordem da função exponencial. Considerando os demais termos:

$$\langle \hat{t}(s) \cdot \hat{t}(s') \rangle = \exp\left(\frac{-s}{A}\right) \quad (3.9)$$

que mostra que o comprimento de persistência é o comprimento de correlação da cadeia polimérica, sendo uma medida do alcance das perturbações locais na conformação da molécula.

Usando a Eq. 3.9 podemos estimar a distância quadrática média $\langle r_{ee}^2 \rangle$ entre as extremidades do polímero em termos do comprimento de persistência e do comprimento de contorno nos limites em que este é muito flexível e muito rígido. No limite flexível, para $L \gg A$, temos que

$$\langle r_{ee}^2 \rangle \cong 2AL;$$

para o limite muito rígido, $L \ll A$:

$$\langle r_{ee}^2 \rangle \cong L^2.$$

Este cálculo é apresentado no Apêndice A. Vemos que para o limite flexível, $\langle r_{ee}^2 \rangle$ depende dos comprimentos de contorno e de persistência. Para o limite rígido, $\langle r_{ee}^2 \rangle$ depende predominantemente do comprimento de contorno, como esperado, visto que neste limite o polímero assemelha-se a uma haste rígida.

3.2.1 Modelo Worm-Like Chain (WLC)

Um polímero semi-flexível ao ser colocado em uma solução aquosa adquire diferentes configurações até atingir o estado de equilíbrio termodinâmico com o meio. Tais configurações dependem dos choques das moléculas constituintes do meio aquoso e da interação de partes diferentes do polímero. Estas interações do polímero com o meio e entre si podem fazer com que as extremidades do polímero se aproximem ou se afastem, dependendo da configuração inicial da molécula. Para temperatura muito baixa, $T \rightarrow 0$, a curvatura do polímero tende a zero e o raio do polímero tende a infinito. Neste caso, o polímero se comporta como uma haste rígida, com comprimento de persistência tendendo a infinito, Eq. 3.2. Quando a temperatura aumenta, o polímero adquire mais dobras e desta forma aumenta o número de configurações possíveis para o sistema. Visto que a entropia é proporcional ao logaritmo do número dessas configurações [26],

$$S = k_B \ln \Omega \quad (3.10)$$

em que Ω é o número de configurações possíveis para o polímero; a entropia do sistema também aumenta.

A partir do equilíbrio termodinâmico do polímero com o meio, para estirá-lo é necessária uma força aplicada nas extremidades do polímero no sentido de afastá-las. Neste trabalho, estiramos moléculas únicas de DNA usando forças da ordem de poucos piconewtons, ≤ 5 pN. Essas forças estão no regime entrópico, em que a força é capaz apenas de estirar o polímero e não de deformá-lo, danificando as ligações químicas [27]. Neste regime, a elasticidade do polímero é chamada elasticidade entrópica. O DNA encontra-se em regime entálpico tipicamente para forças entre 10 pN até aproximadamente 70 pN. Estas forças causam uma deformação na estrutura da molécula e são chamadas forças entálpicas.

Marko e Siggia, em 1994, mostraram que o estiramento de uma molécula de DNA submetida a forças entrópicas pode ser descrito pelo modelo Worm-Like Chain (WLC) [22, 28], que fornece uma ótima descrição da elasticidade entrópica do DNA ao ser estirado [29]. Este modelo trata o DNA como um polímero semi-flexível que é submetido a deformações suaves devido às flutuações térmicas. Microscopicamente, o modelo assume uma energia de curvatura harmônica para cada segmento da molécula. Assim, quando a molécula de DNA é submetida a uma força em uma das extremidades, cada segmento é sujeito a uma força elástica restauradora proporcional à quantidade que a molécula está dobrada [30].

No regime entrópico, o modelo WLC descreve o comportamento elástico do DNA para pequenos estiramentos: próximo à conformação de equilíbrio; e para longos estiramentos, em que o polímero se encontra próximo à conformação retilínea. Em seguida, deduzimos este modelo em cada um destes limites e finalmente encontramos a equação válida para qualquer estiramento.

Estiramentos próximo à conformação de equilíbrio

Para estiramentos próximo à conformação de equilíbrio, a força aplicada e o estiramento resultante são pequenos. Assim, podemos aproximar a força pela Lei de Hooke:

$$F = -kz \quad (3.11)$$

em que z é o estiramento da molécula. Como o estiramento resultante é pequeno, podemos aproximá-lo pela distância quadrática média entre as duas extremidades do DNA, $z \cong \sqrt{\langle r_{ee}^2 \rangle}$. Como mostramos no Apêndice A, para o caso de polímeros flexíveis, $L \gg A$, temos que: $\langle r_{ee}^2 \rangle \cong 2AL$. Desta forma,

$$z \cong \sqrt{2AL}. \quad (3.12)$$

Assim, usando o princípio da equipartição da energia para a energia potencial elástica associada ao estiramento da molécula:

$$\frac{1}{2}kz^2 = \frac{n}{2}k_B T \quad (3.13)$$

sendo n o número de graus de liberdade do sistema, neste caso, $n = 3$, referente aos possíveis movimentos de translação. Desta equação e da Eq. 3.12, determinamos a constante de mola k em função do comprimento de persistência e de contorno do DNA:

$$k = \frac{3k_B T}{2AL} \quad (3.14)$$

e a força aproximada neste regime:

$$F = -\frac{3k_B T}{2A} \frac{z}{L}. \quad (3.15)$$

Estiramentos longe da conformação de equilíbrio

Para estiramentos deste tipo, a molécula de DNA está muito esticada e podemos escrever a energia do DNA como a energia de curvatura, Eq. 3.1, descontando o trabalho realizado pela força externa para manter a molécula nesta configuração:

$$E_{\text{WLC}} = \frac{\kappa_f}{2} \int_0^{L_c} |C|^2 ds - Fz \quad (3.16)$$

sendo a força F um multiplicador de Lagrange para manter a extensão z fixa, o vínculo existente entre as extremidades do polímero; lembrando que C é a curvatura, Eq. 3.3. Como a molécula está muito esticada e o eixo- z está ao longo da molécula, $z \sim L$ e o

vetor \hat{t} é praticamente paralelo a curva que descreve a conformação da molécula, $\vec{r}(s)$ (Figura 3.4). Assim, a componente t_z é muito maior que t_x e t_y . Decompondo o vetor \hat{t} :

$$\hat{t} = t_x \hat{x} + t_y \hat{y} + t_z \hat{z}$$

e para o módulo quadrático,

$$|\hat{t}|^2 = |t_x|^2 + |t_y|^2 + |t_z|^2 = |t_z|^2 + |t_\perp|^2 = 1.$$

em que $|t_\perp|^2 = |t_x|^2 + |t_y|^2$. Assim, $|t_z| = \sqrt{1 - |t_\perp|^2}$ e como $|t_\perp| \ll 1$, podemos fazer a aproximação em primeira ordem,

$$|t_z| \cong 1 - \frac{|t_\perp|^2}{2}. \quad (3.17)$$

Uma vez que o vetor \hat{t} é praticamente paralelo à curva de conformação da molécula, podemos escrever $z \cong \int_0^L |t_z| ds$. Substituindo estas aproximações na Eq. 3.16:

$$\begin{aligned} E_{\text{WLC}} &= \frac{1}{2} k_B T A \int_0^L \left| \frac{\partial \hat{t}}{\partial s} \right|^2 ds - F \int_0^L \left(1 - \frac{|t_\perp|^2}{2} \right) ds \\ &= \frac{1}{2} k_B T \int_0^L \left[A \left| \frac{\partial \hat{t}_\perp}{\partial s} \right|^2 + \frac{F}{k_B T} |t_\perp|^2 \right] ds - FL \end{aligned} \quad (3.18)$$

e como t_z é aproximadamente constante ao longo da molécula, usamos que $\partial t / \partial s \cong \partial t_\perp / \partial s$. Usando a transformada de Fourier $\tilde{t}_\perp(q) = \int e^{iqs} t_\perp(s) ds$, podemos decompor esta energia em modos normais:

$$E_{\text{WLC}} = \frac{1}{2} k_B T \int \frac{1}{2\pi} \left[Aq^2 + \frac{F}{k_B T} \right] |\tilde{t}_\perp(q)|^2 dq - FL. \quad (3.19)$$

A partir da Eq. 3.19 calculamos o valor médio de $|t_\perp|^2$. Este cálculo e os detalhes para obtermos a Eq. 3.19 são apresentados no Apêndice B, e o resultado para $\langle |t_\perp|^2 \rangle$ é:

$$\langle |t_\perp|^2 \rangle = \sqrt{\frac{k_B T}{FA}}. \quad (3.20)$$

Então, para estiramentos longe da conformação de equilíbrio $z/L \cong |t_z|$ e usando as equações Eq. 3.17 e Eq.3.20 temos que:

$$\frac{z}{L} = 1 - \frac{1}{2} \sqrt{\frac{k_B T}{FA}}. \quad (3.21)$$

Assim, isolando a força F obtemos a relação para o regime de longos estiramentos:

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

Estiramentos arbitrários

Marko e Siggia acrescentaram dois termos de correção à Eq. 3.22 para validá-la em estiramentos arbitrários. Estes termos são insignificantes para estiramentos longe da conformação de equilíbrio, $z \sim L$, mas quando inseridos na equação podemos recuperar a forma correta para estiramentos próximo à conformação de equilíbrio, Eq. 3.15, expandindo em primeira ordem a expressão para a força. A correção consiste em somar $z/L - 1/4$ dentro do colchete da Eq. 3.22 [28]. Assim, obtemos a expressão de Marko e Siggia para a força entrópica aplicada a um DNA:

$$F = \frac{k_B T}{A} \left[\frac{z}{L} + \frac{1}{4(1 - z/L)^2} - \frac{1}{4} \right]. \quad (3.23)$$

Ainda que válida para quaisquer estiramentos no regime entrópico, a Eq. 3.23 é uma expressão aproximada e diverge para $z = L$; o limite de validade desta equação é até cerca de $z \sim 0,95L$ [28]. Além disso, vale ressaltar que a Eq. 3.23 é válida apenas no regime entrópico, cujas forças aplicadas não são suficientes para deformar as ligações químicas entre os nucleotídeos.

3.3 Complexos DNA-ligantes

As interações DNA-ligantes têm sido amplamente estudadas ao longo dos últimos anos. Uma das motivações para caracterizar e descrever estas interações é que vários destes compostos são utilizados no tratamento de câncer. Alguns fármacos como os antibióticos antraciclínicos e compostos a base de platina exibem alta afinidade para interagirem com o DNA de células cancerosas. Ao ligarem no DNA, estes fármacos podem inibir o processo de replicação, impedindo o crescimento do tumor [3, 31]. Nesses estudos, informações mecânicas e físico-químicas do complexo DNA-ligante são importantes para entender alguns processos que o envolvem, além de possibilitar o desenvol-

vimento de novos fármacos. Podemos extrair as informações mecânicas do complexo por meio de experimentos de estiramentos de moléculas únicas de DNA, como discutido no Capítulo 4. A parte físico-química do complexo DNA-ligante envolve o equilíbrio químico e a cinética da interação. O equilíbrio químico, em um sistema composto por DNA e ligantes, é atingido quando o número de ligantes em solução é constante no tempo. Sendo que no início, temos DNA e ligantes em solução, com o tempo formam-se complexos DNA-ligantes e o número dos ligantes livres em solução varia até o equilíbrio químico ser estabelecido. A cinética da interação descreve as mudanças que ocorrem entre o estado inicial e o estado final de equilíbrio.

3.3.1 O modelo de Hill

A interação entre moléculas de DNA e alguns fármacos pode ser descrita pelo modelo de Hill. Derivada empiricamente por Archibald Hill em 1910 [32], a equação de Hill descreve o caráter sigmóide da curva de ligação das moléculas de oxigênio à hemoglobina. Respostas sigmóides são frequentes em interações que envolvem receptores multiméricos, compostos pela repetição de subunidades. Neste tipo de interação, a afinidade de ligação dos sítios pode ser afetada quando um sítio é ocupado por um ligante, caracterizando uma cooperatividade. Quando um ligante aumenta a afinidade da ligação dos ligantes subsequentes, há uma cooperatividade positiva; se o ligante diminui a afinidade da ligação dos ligantes subsequentes, temos uma cooperatividade negativa. Dizemos que não há cooperatividade quando um ligante não afeta a afinidade de ligação dos próximos ligantes.

Suponha a reação química:



a constante de associação, K_a , é dada pela razão entre a concentração do produto e o produto das concentrações dos reagentes:

$$K_a = \frac{[C]}{[R][L]}, \quad (3.25)$$

a constante de dissociação, K_d , é o inverso da constante de associação:

$$K_d = \frac{[R][L]}{[C]}. \quad (3.26)$$

Nessas equações, os símbolos [] representam as concentrações molares (1 M = 1 mol

L^{-1}) de receptores, ligantes e produtos. Observe que a unidade de K_a é M^{-1} e de K_d é M .

Para a equação de Hill consideramos a interação entre um receptor multimérico (R) de n subunidades, com um sítio por subunidade, e ligantes (L). Neste modelo, assume-se uma aproximação tipo campo médio, de modo que: quando o primeiro ligante se liga a um sítio do receptor, a afinidade de ligação dos sítios restantes muda e todos os ligantes remanescentes se ligam simultaneamente. Representamos esta equação por:



No equilíbrio químico,

$$K_A = \frac{[C]}{[R][L]^n} \quad (3.28)$$

sendo K_A a constante de ligação aparente. A concentração total de receptores é dada pela soma das concentrações dos receptores livres e dos receptores ligados, $[R_T] = [R] + [C]$. Assim, a razão entre as concentrações dos receptores ligados e totais:

$$r_{\text{Hill}} = \frac{[C]}{[R] + [C]} = \frac{K_A [L]^n}{1 + K_A [L]^n}. \quad (3.29)$$

que é a equação de Hill, n é conhecido como expoente de Hill e indica a cooperatividade do processo:

- (i) para $n < 1$, tem-se uma cooperatividade negativa;
- (ii) para $n = 1$ não há cooperatividade;
- (iii) para $n > 1$, tem-se uma cooperatividade positiva.

Além disso, o expoente de Hill indica o número mínimo de ligantes cooperativos envolvidos na interação.

Se cada ligante que se liga ao receptor possuir a mesma constante de associação, K_a , então: $K_A = K_a^n$ e a Eq. 3.29 se torna:

$$r_{\text{Hill}} = \frac{[C]}{[R] + [C]} = \frac{K_a^n [L]^n}{1 + K_a^n [L]^n} = \frac{\left(\frac{[L]}{K_d}\right)^n}{1 + \left(\frac{[L]}{K_d}\right)^n}. \quad (3.30)$$

Podemos adaptar esta notação para o caso específico da interação DNA-ligante. Seja $[L] \equiv C_f$ a concentração de ligantes livres na solução e $[C] \equiv C_b$ a concentração dos ligantes ligados ao DNA. Primeiramente, vamos supor que cada ligante ocupa apenas um par de bases do DNA quando ligado. Assim, a concentração de sítios disponíveis na molécula de DNA pode ser escrita como $[R] \equiv C_{\text{bp}} - C_b$, em que C_{bp} é a concentração

de pares de bases do DNA, que é constante. Substituindo essas definições na Eq. 3.28 temos:

$$K_A = \frac{C_b}{C_f^n (C_{bp} - C_b)}. \quad (3.31)$$

Além disso, nessas definições, a fração dos ligantes ligados, r_{Hill} é:

$$r_{\text{Hill}} = \frac{C_b}{C_{bp}}. \quad (3.32)$$

Desta forma a Eq. 3.31 pode ser escrita como:

$$r_{\text{Hill}} = \frac{(K_a C_f)^n}{1 + (K_a C_f)^n}. \quad (3.33)$$

Podemos generalizar a suposição de que cada ligante ocupa um par de bases introduzindo um fator r_{max} , a fração saturada de ligantes ligados. O inverso de r_{max} é o número médio de pares de bases ocupados por cada ligante. Esta correção conduz a isoterma de Hill:

$$r_{\text{Hill}} = \frac{r_{\text{max}} (K_a C_f)^n}{1 + (K_a C_f)^n}. \quad (3.34)$$

A Figura 3.5 ilustra o comportamento da razão $r_{\text{Hill}}/r_{\text{max}}$ em função da concentração de ligantes livres na amostra para valores de n distintos.

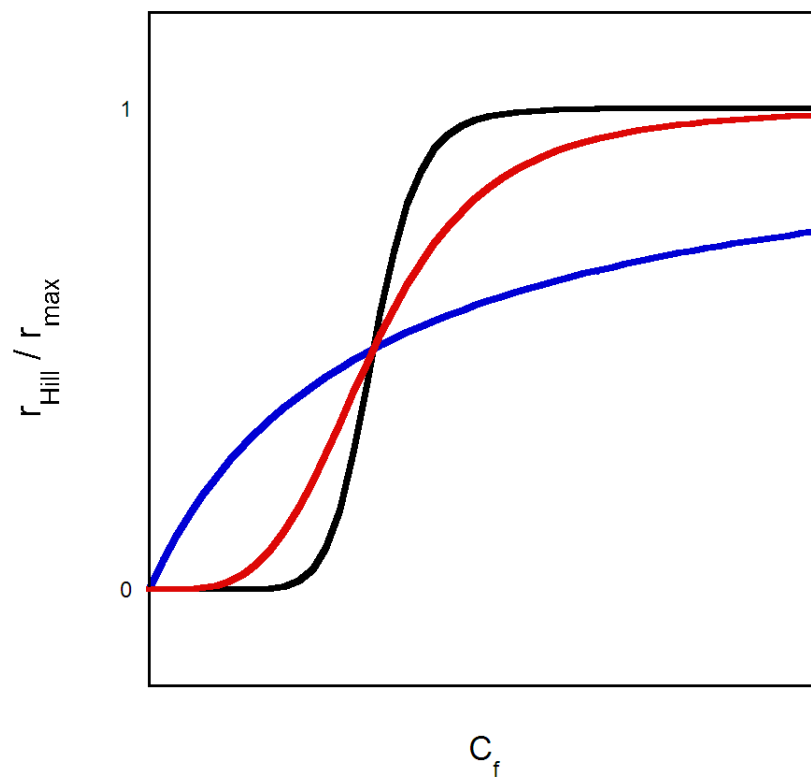


Figura 3.5: Gráfico da razão $r_{\text{Hill}}/r_{\text{max}}$ em função da concentração de ligantes livres na amostra para diferentes valores de n : azul para $n = 1$, vermelho para $n = 4$ e preto para $n = 15$.

Capítulo 4

Métodos experimentais

4.1 Montagem e calibração da pinça óptica

Nesta seção, descrevemos os procedimentos experimentais relativos a montagem e a calibração da pinça óptica.

A Figura 4.1 mostra um esquema da montagem experimental que fizemos para realizar nossas medidas. A região entre a linha pontilhada representa o microscópio invertido Nikon TE-300, com objetiva de óptica corrigida no infinito, aumento de 100X e abertura numérica $NA=1,4$. A objetiva do microscópio é responsável por focalizar o feixe infravermelho (IV), que produz a pinça. Esse feixe é cilíndrico ao sair do emissor e se torna cônico após atravessar a objetiva.

O laser IV é responsável por aprisionar as microesferas. Trabalhamos com o laser infravermelho da *IPG Photonics* modelo *YLR-S-1064-LP* com potência máxima de 6,0 W, cujo comprimento de onda $\lambda = 1064$ nm, operando no modo usual TEM_{00} .

L_1 representa o condensador do sistema de iluminação do microscópio. Logo abaixo do condensador está a amostra de solução aquosa de microesferas. Representamos uma microesfera presa devido ao potencial da pinça e indicamos o sistema de referência. A lamínula é o porta-amostra e h é a distância do centro da microesfera pinçada em relação à lamínula. O deslocador piezoelétrico PI acoplado ao estágio permite movimentar a lamínula com precisão nanométrica ao longo dos três eixos de coordenadas cartesianas.

F_1 representa filtros de densidade neutra e F_2 um filtro de infravermelho que bloqueia este feixe nas imagens em que usaremos a videomicroscopia. E_1 , E_2 e E_4 são espelhos, sendo E_1 e E_2 espelhos para o comprimento de onda do infravermelho; E_3 é um espelho dicróico para o comprimento de onda $\lambda = 1064$ nm.

Em duas saídas do microscópio conectamos as câmeras: uma CCD é ligada ao

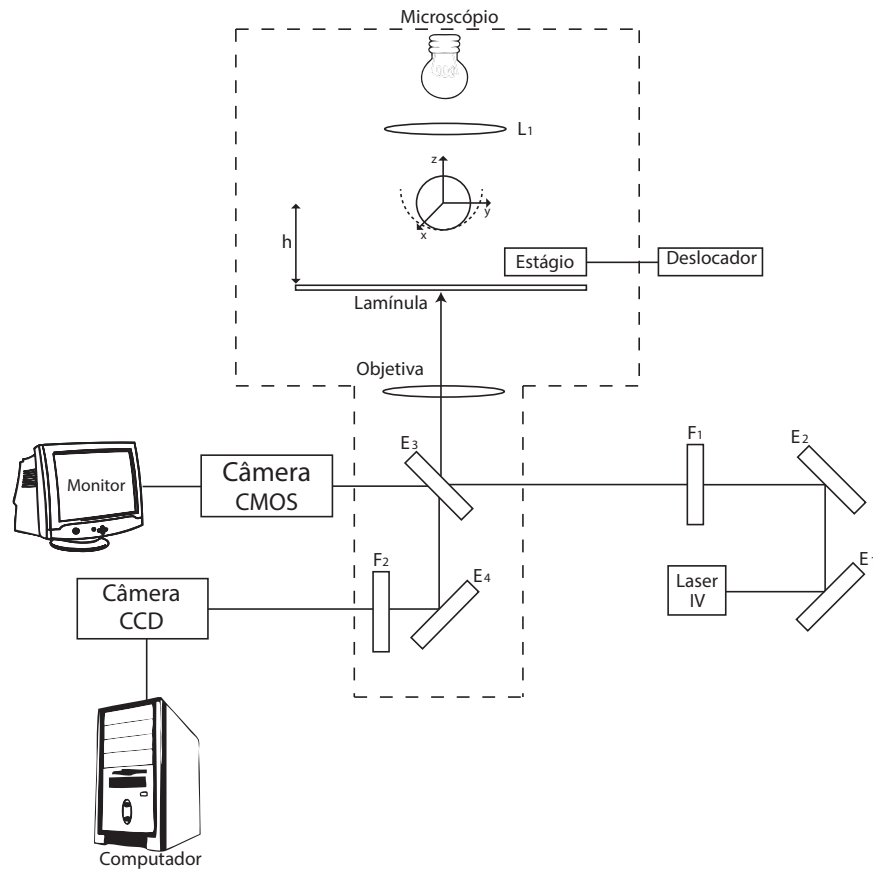


Figura 4.1: Montagem Experimental.

computador por fornecer uma imagem mais uniforme, que é mais fácil de ser trabalhada usando a videomicroscopia; e uma câmera CMOS ligada ao monitor apenas para a visualização da amostra.

4.1.1 Preparação das amostras

O porta-amostra consiste em uma lamínula de vidro de espessura aproximada 0,15 mm com um O-ring de borracha de diâmetro aproximado de 1,0 cm colado em sua superfície. O O-ring é colado na superfície da lamínula usando parafina derretida. A solução é posta no interior do anel e em seguida tampamos com outra lamínula para diminuir as influências do meio externo sobre a solução, evitando perturbações mecânicas.

As amostras são soluções aquosas de *Phosphate Buffered Saline*, PBS, com moléculas de λ -DNA marcadas com biotina. Seguindo o protocolo de Amitani [33], uma extremidade do DNA se liga a lamínula que é coberta com estreptavidina para este fim;

e a outra extremidade se liga a microesfera de poliestireno coberta com estreptavidina cujo diâmetro é $3,0 \pm 0,1 \mu\text{m}$, que são usadas como ferramenta para manipular o DNA com a pinça óptica. A interação estreptavidina-biotina é muito usada em biologia, principalmente por possuir uma alta constante de afinidade $\sim 10^{15} \text{ M}^{-1}$, sendo uma das ligações não-covalentes mais fortes que se conhece [34]. Desta forma, a estreptavidina é bastante utilizada em revestimento de superfícies a fim de ligá-las à moléculas biotiniladas de interesse. A elevada afinidade característica deste complexo assegura que este não é perturbado por mudanças de pH, temperatura, ou manipulações.

4.1.2 Calibração da Pinça Óptica

A pinça óptica é uma ferramenta poderosa para manipulação de objetos da ordem de micrômetros e tem sido usada em aplicações em física e em biologia [18, 35]. Para realizar medidas quantitativas de força com precisão é essencial conhecermos a constante de força da pinça óptica.

Uma grandeza importante para determinar a constante da pinça óptica é o coeficiente de atrito sobre a microesfera em solução aquosa. Este coeficiente depende do tamanho da microesfera, da distância em relação a lamínula e da viscosidade da solução. O coeficiente de atrito para movimentos paralelos à superfície da lamínula pode ser escrito como [36, 37, 38]

$$\gamma = \gamma_0 \left[1 - \frac{9}{16} \left(\frac{a}{h} \right) + \frac{1}{8} \left(\frac{a}{h} \right)^3 - \frac{45}{256} \left(\frac{a}{h} \right)^4 - \frac{1}{16} \left(\frac{a}{h} \right)^5 + \dots \right]^{-1} \quad (4.1)$$

em que a é o raio da microesfera, h é a distância do seu centro em relação a lamínula e:

$$\gamma_0 = 6\pi\eta a, \quad (4.2)$$

sendo η a viscosidade da água. Consideramos também a variação da viscosidade com a temperatura [21]:

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

e t_c é a temperatura do ambiente em graus Celsius e a viscosidade é encontrada em unidades SI.

Posto isto, descrevemos nesta seção um método simples de calibração da pinça óptica, o método da força de Stokes. Detalhes da calibração pode ser encontrado nas referências [9, 39]. Este método consiste em deslocar o estágio do microscópio com

velocidade conhecida e medir o deslocamento da microesfera em relação à situação inicial, com o estágio parado.

A microesfera presa na pinça está submetida a um potencial aproximadamente harmônico e quando um fluxo é aplicado à amostra, que pode ser feito movendo o estágio do microscópio, a força de Stokes atua na microesfera mudando sua posição média de equilíbrio em relação ao mínimo do poço de potencial como apresentado na Figura 4.2. O módulo da força de Stokes é dado por:

$$F = \gamma v, \quad (4.4)$$

sendo γ determinado pelas Eqs. (4.1) e (4.2) e v a velocidade do fluxo em relação a microesfera.

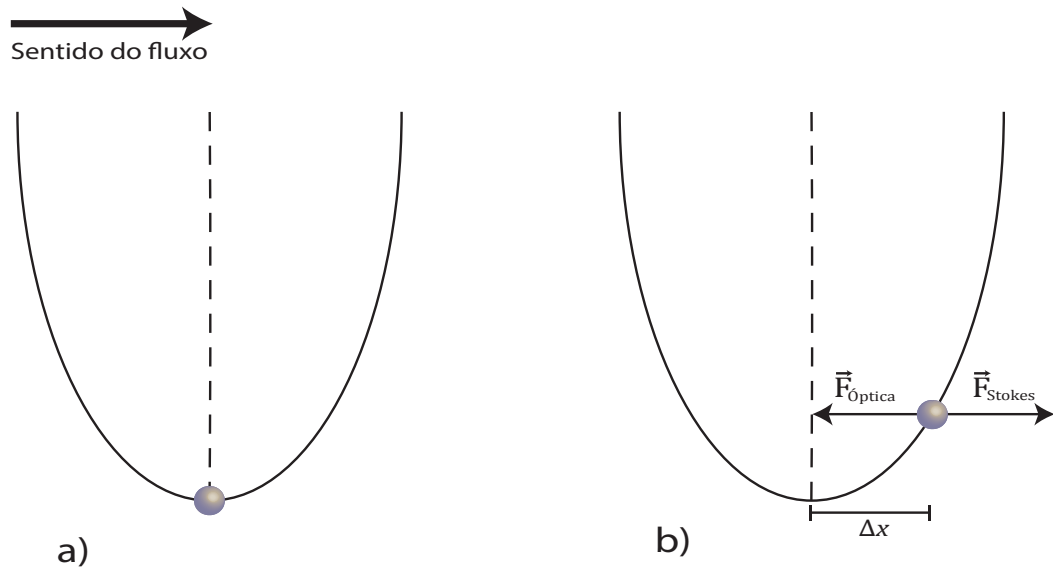


Figura 4.2: (a) Microesfera presa na pinça óptica antes de ser estabelecido o fluxo. (b) Microesfera presa na pinça depois do fluxo ser estabelecido.

Supondo que se estabeleça um fluxo na direção x , a força de Stokes irá deslocar a posição de equilíbrio da microesfera por uma quantidade Δx . A força resultante é nula na nova posição de equilíbrio, então:

$$F_{\text{Stokes}} = F_{\text{Optica}}.$$

Desta forma,

$$\gamma v = k \Delta x.$$

Assim, podemos explicitar a constante da pinça:

$$k = \frac{\gamma v}{\Delta x}. \quad (4.5)$$

Experimentalmente, para determinarmos k , primeiro ajustamos a altura do poço de potencial da pinça. Para isso, localizamos a lamínula com o auxílio de uma microesfera de poliestireno de raio de $a = 0.2 \mu\text{m}$; sabemos que o plano central da microesfera é a região de contraste mínimo [40]. Definida a posição da lamínula, ajustamos com o *knob* do microscópio a altura desejada; nossos experimentos foram realizados para a altura $h = 3,5 \mu\text{m}$; mantemos esta altura fixa ao longo dos experimentos, visto que a constante de força da pinça varia com esta altura. Determinada a altura, começamos a filmagem antes de mover o estágio. Desta forma, conseguimos extrair do vídeo informações da posição média da microesfera antes e depois do fluxo ser estabelecido. A diferença entre a posição média final e a posição média inicial da microesfera fornece-nos o deslocamento da microesfera no poço de potencial, Δx . Determinamos a relação *pixel*/micrômetro capturando uma foto de uma lamínula graduada. Para esta configuração experimental o valor encontrado foi de $15,63 \text{ pixels}/\mu\text{m}$. A velocidade do fluxo é a velocidade estabelecida no deslocador piezoelétrico. Assim, determinados Δx e v obtemos a constante de força da pinça substituindo esses dados na Eq. (4.5).

4.2 Estiramento da molécula de DNA

Nesta seção descrevemos o procedimento experimental usado para realizar as medidas de estiramento do DNA e construirmos a curva força \times extensão para a molécula.

4.2.1 Configuração DNA-microesfera de interesse para realizar as medidas

Depois de colocar a amostra no microscópio, procuramos pelo conjunto DNA-microesfera de interesse para realizar as medidas. As possíveis configurações presentes na amostra estão apresentadas na Figura 4.3. Dentre estas configurações temos: microesferas grudadas na lamínula; microesferas grudadas em DNAs soltos em solução; DNAs grudados na lâmina, mas sem microesferas; DNAs soltos em solução; DNAs grudados em microesferas pelas extremidades em solução e a configuração de interesse.

A configuração DNA-microesferas de interesse que procuramos é a que tem uma extremidade do DNA grudada na lâmina e a outra em uma microesfera. Esta

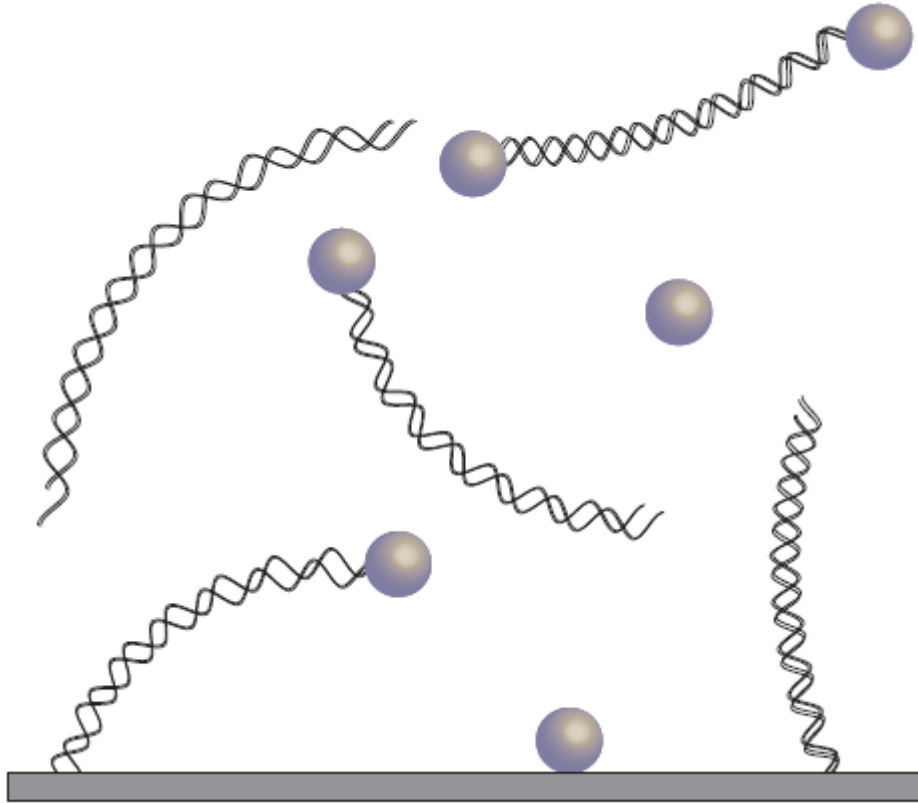


Figura 4.3: Configurações possíveis encontradas na amostra.

procura é dita indireta, visto que não podemos visualizar o DNA com o microscópio óptico. Assim, para encontramos este conjunto de interesse, utilizamos o seguinte procedimento:

(i) Procuramos uma microesfera que não esteja grudada na lâmina e a capturamos com a pinça óptica.

(ii) Movimentamos a lamínula com os deslocadores do microscópio uma quantidade próxima do comprimento do DNA.

Esses passos são feitos até observarmos que após deslocarmos a lamínula suficientemente, a microesfera escapa da pinça e volta a sua posição inicial. Quando isto acontece, sugere que encontramos a configuração desejada em que uma extremidade da molécula do DNA está presa à lâmina e a outra na microesfera. A fim de verificar se a microesfera está presa na extremidade do DNA e se há apenas uma molécula de DNA prendendo-a, deslocamos a lamínula em diferentes direções e observamos o perfil circular do deslocamento da esfera. O estiramento máximo da molécula antes da esfera

soltar-se da pinça deve ser o mesmo para qualquer direção, Figura 4.4.

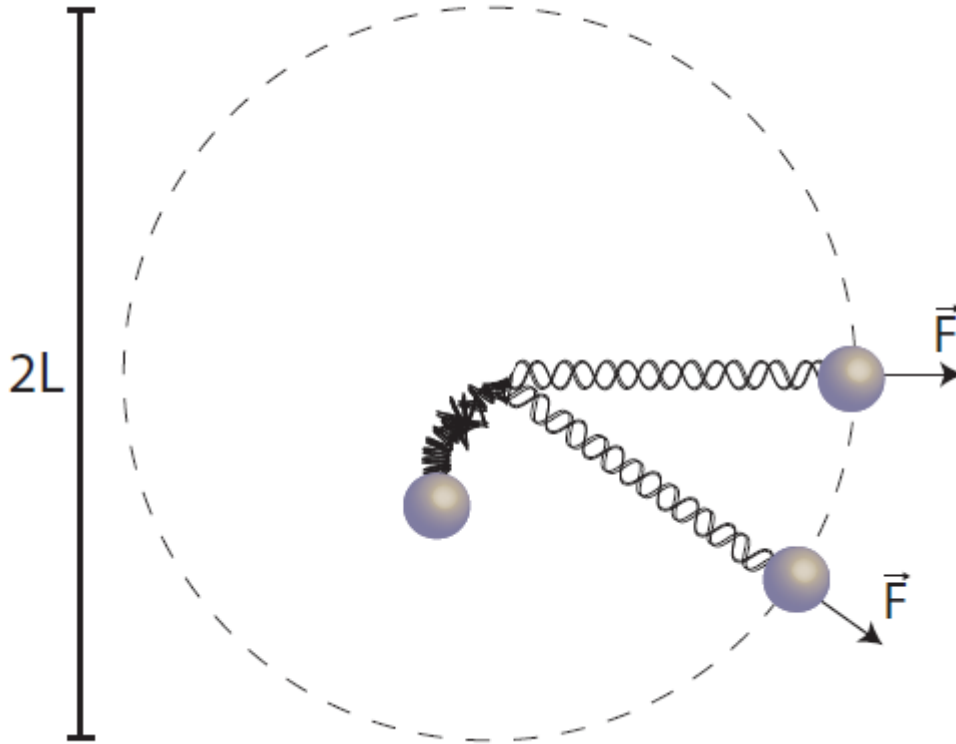


Figura 4.4: Perfil circular do estiramento máximo da molécula antes da esfera soltar-se da pinça em relação à posição de equilíbrio.

4.2.2 Constante de força da pinça óptica

Medimos a constante de força da pinça como descrito na seção 4.1.2. Em nossos experimentos trabalhamos com a constante de força $k \sim 3,0 \text{ pN}/\mu\text{m}$. Além disso, como esta constante de força depende da altura da microesfera em relação à lamínula, mantemos esta altura fixa, $h = 3,5 \mu\text{m}$; e sempre medimos a constante de força antes de realizarmos os estiramentos. Este resultado será usado na análise do estiramento da molécula de DNA.

4.2.3 Curva força \times extensão da molécula de DNA

Conhecida a constante de força da pinça e encontrado o conjunto DNA-microesfera de interesse, estamos aptos a realizar os estiramentos da molécula de DNA. Inicialmente, este conjunto é deixado fora da pinça até que a microesfera atinja sua

posição de equilíbrio. A partir desta, usamos a pinça óptica para capturar a microesfera. Assim, temos nossa configuração de interesse com a microesfera presa em sua posição de equilíbrio.

Iniciamos a filmagem e o deslocamento da lamínula simultaneamente. O motor piezoelétrico acoplado ao estágio do microscópio nos fornece uma velocidade constante e em nossos experimentos foi $v = 0,5 \mu\text{m}/\text{s}$. Esta velocidade é suficientemente baixa para desprezarmos a força de Stokes sobre a microesfera e garantir um processo quase-estático, em que a microesfera passa por estados de equilíbrio. Assim, a força que o DNA exerce sobre a microesfera é igual, em módulo, a força que a pinça óptica exerce sobre a mesma. O estiramento da molécula de DNA é feito até que a microesfera escape do poço de potencial da pinça. A Figura 4.5 apresenta a geometria dos estiramentos realizados.

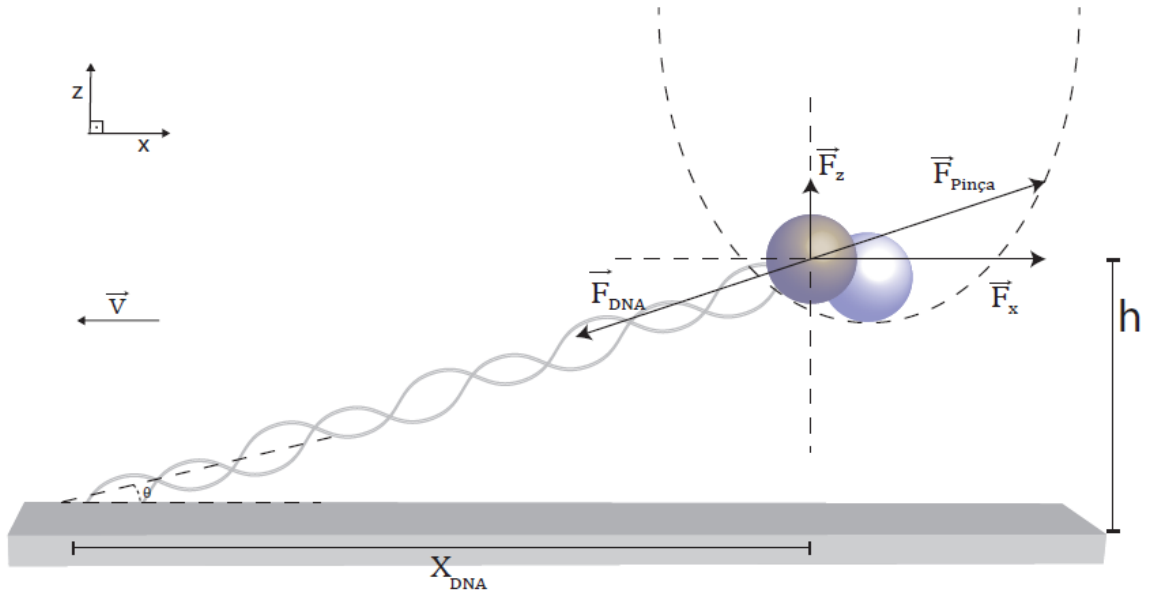


Figura 4.5: Geometria do experimento de estiramento da molécula de DNA.

A partir do vídeo do estiramento, podemos determinar a posição do centro de massa da microesfera em cada instante do deslocamento, $x(t)$, sabendo a relação $pixel/\mu\text{m}$, descrita na seção 4.1.2, e a taxa de captura da câmera. Determinamos a posição inicial da microesfera, $x(0)$, quando esta encontra-se no fundo do poço de potencial da pinça óptica, e a variação de posição da microesfera em função do tempo é dada por

$$\Delta x(t) = x(t) - x(0). \quad (4.6)$$

A força na direção- x é determinada multiplicando-se a constante de força da pinça óptica pela variação da posição da microesfera.

$$F_x = k\Delta x(t). \quad (4.7)$$

Além disso, note que esta é a força que a pinça óptica exerce sobre a microesfera quando esta é afastada da posição de equilíbrio do poço de potencial. No entanto, pelo procedimento experimental ser feito em regime quase-estático, esta força tem o mesmo módulo da força que o DNA exerce sobre a microesfera.

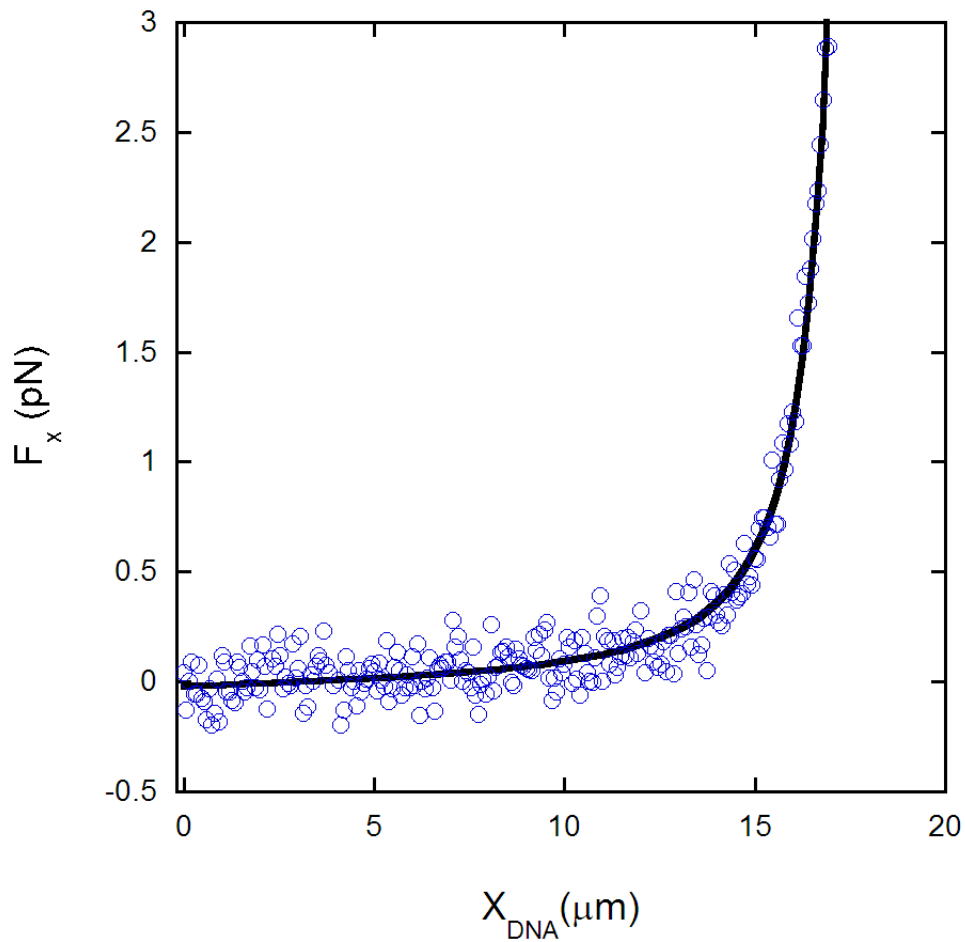


Figura 4.6: Curva típica da componente x da força \times extensão da molécula de DNA. Os dados foram ajustados com a Eq. 4.8.

Como estamos trabalhando experimentalmente na direção- x , fazemos o ajuste com a componente x da expressão de Marko e Siggia, Eq. 3.23. Observando a geometria

apresentada na Figura 4.5, vemos que a extensão total do DNA, $z = \sqrt{x_{\text{DNA}}^2 + h^2}$ e $F_x = F \cos \theta = F (x_{\text{DNA}}/z)$. A partir destas considerações e da Eq. 3.23, obtemos a componente x da força:

$$F = \frac{k_B T}{A} \left[\frac{\sqrt{x_{\text{DNA}}^2 + h^2}}{L} + \frac{1}{4(1 - \sqrt{x_{\text{DNA}}^2 + h^2}/L)^2} - \frac{1}{4} \right] \frac{x_{\text{DNA}}}{\sqrt{x_{\text{DNA}}^2 + h^2}}. \quad (4.8)$$

Vale ressaltar que x é o deslocamento do centro de massa da esfera no poço de potencial e x_{DNA} é o estiramento da molécula.

A Figura 4.6 apresenta uma curva típica da força em função da extensão da molécula de DNA obtida com este procedimento. Os dados foram ajustados usando a expressão de Marko Siggia, Eq. 4.8, e do ajuste determinamos o comprimento de contorno L e o comprimento de persistência A da molécula de DNA. Para este caso particular, obtemos do ajuste $L = 18,2 \pm 0,5 \mu\text{m}$ e $A = 51 \pm 1 \text{ nm}$ para a molécula de λ -DNA na ausência de fármacos. Estes dados foram obtidos da média de cinco estiramentos para a mesma molécula e o erro é o desvio padrão dessas medidas.

Capítulo 5

Resultados e Discussões

Apresentamos neste capítulo os resultados e discussões da interação entre a molécula de DNA e ligantes: a β -cicloextrina neutra (β -CD) e a lisozima (LYZ); por meio de estiramentos de moléculas únicas via a técnica de pinçamento óptico. Monitoramos as mudanças das propriedades mecânicas de cada complexo ligante-DNA em função da concentração do ligante na amostra.

5.1 Complexo β -CD–DNA

Ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos compostos de n -unidades de D-glucose conectadas por ligações glicosídicas. Em particular, o subtipo β consiste em uma molécula com sete unidades de D-glucose. A estrutura espacial da CD lembra um cone truncado com grupos hidroxila localizados na superfície externa do cone, Figura 5.1. Esta estrutura molecular confere às CDs uma característica hidrofóbica na cavidade interna e hidrofílica na superfície externa. Assim, as CDs tem a importante propriedade de ser solúvel em água com uma cavidade interna capaz de acomodar polímeros e formar complexos de inclusão do tipo hóspede-hospedeiro.

Este estudo da interação do DNA com os vários tipos de CDs é importante para avaliar possíveis efeitos intracelulares causados pelas CDs que são amplamente utilizadas em produtos de consumo, como por exemplo em alimentos. Além disso, a β -CD catiônica monovalente, obtida pela substituição de um grupo hidroxila por um grupo amino, interage fortemente com DNA, sendo usada na condensação destas macromoléculas o que possibilita introduzi-las em pequenas vesículas para aplicações em terapia gênica [41, 42].

A fim de testar a hipótese do balanço das forças atrativas e repulsivas como mediadora da cooperatividade na interação β -CD–DNA, apresentamos nesta seção

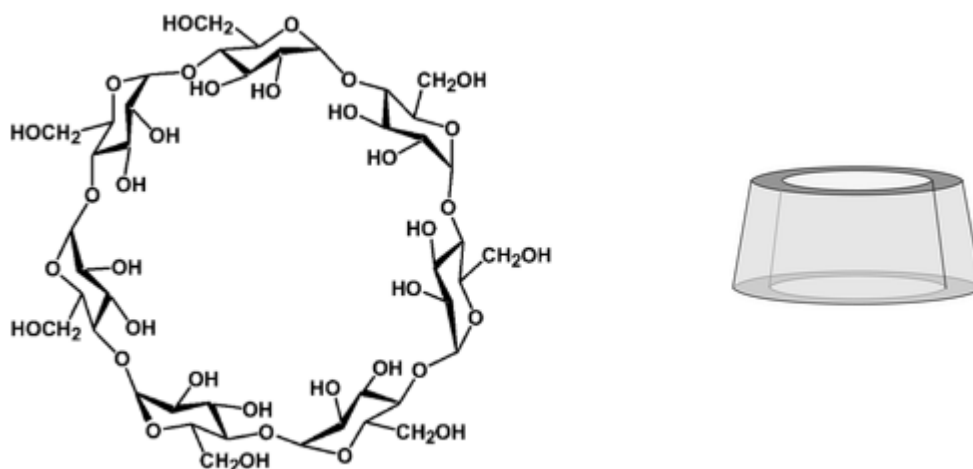


Figura 5.1: Desenho esquemático da β -CD. A molécula possui diâmetro interno de ~ 0.6 nm, diâmetro externo de $\sim 1,5$ nm e altura de $\sim 0,8$ nm.

medidas da elasticidade entrópica deste complexo. Inspirados na referência [41] de Siman *et al.*, do nosso grupo de trabalho, realizamos experimentos de estiramento para este complexo com a ciclodextrina neutra em altas concentrações do fármaco, concentração da ordem de milimolar.

No trabalho [41] foram realizados experimentos para estudar a interação β -CD–DNA tanto para a ciclodextrina neutra quanto para a ciclodextrina monovalente, ambas em baixas concentrações, concentração da ordem de micromolar. Os dados experimentais foram explicados em um modelo que considera a interação entre a β -CD catiônica e o DNA um processo com cooperatividade positiva. A cooperatividade positiva acontece porque a β -CD catiônica interage com as bases que giram para fora do DNA que o desnatura localmente, aumentando a flexibilidade do complexo β -CD–DNA. Este efeito aumenta as flutuações do polímero e conseqüentemente aumenta a taxa em que as bases do DNA giram para fora favorecendo outras moléculas de CD ligarem ao DNA.

No trabalho de Siman *et al.* foi proposto um modelo baseado na equação de Hill e no modelo de desordem do tipo *quenched* para explicar o comportamento cooperativo na formação dos *clusters* de ciclodextrina monovalente, o que não foi observado para a ciclodextrina neutra nas mesmas concentrações. Neste modelo, a formação de um único *cluster* torna o DNA mais flexível, diminuindo localmente o comprimento de persistência do DNA; um *cluster* é uma unidade composta por n ligantes ligados ao DNA. Não obstante, quando há a formação de *clusters* vizinhos, o DNA torna-se localmente mais rígido, aumentando localmente o comprimento de persistência do DNA.

Três hipóteses foram consideradas para construir este modelo:

- (i) os *clusters* são distribuídos aleatoriamente ao longo da cadeia do DNA;
- (ii) a distribuição de tamanho dos *clusters* é uma distribuição estreita, com um tamanho médio de n ligantes por *cluster*;
- (iii) o número de *clusters* aumenta com a concentração de ligantes em solução, mantendo sempre o tamanho médio n . Desta forma, um *cluster* com o dobro do tamanho ocorre quando dois *clusters* são vizinhos e não devido ao crescimento do *cluster*.

Ao convergir essas idéias e usando a distribuição de probabilidade para um segmento de dois sítios vizinhos, em que cada sítio pode estar ou não ocupado, obtém-se uma equação para o comprimento de persistência. Considere um segmento de dois sítios vizinhos. Seja x a probabilidade de um sítio deste segmento estar ocupado, $x \equiv \frac{r}{r_{\max}}$ em que r é a fração de ligantes ligados e r_{\max} a fração máxima de ligantes ligados. Então, um segmento sem sítios ocupados é caracterizado por um comprimento de persistência $A_0 = \beta\kappa_{f_0}$ e possui probabilidade $(1 - x)^2$ de ocorrer. Um segmento se torna mais flexível quando ocupado por apenas um único *cluster*, que ocorre com probabilidade $2x(1 - x)$ e é caracterizado por um comprimento de persistência A_1 . Além disso, quando ambos os sítios de um segmento são ocupados, o que ocorre com probabilidade x^2 , o segmento se torna mais rígido com um comprimento de persistência A_2 . Calcada nessas ideias, temos a equação do comprimento de persistência:

$$\frac{1}{A} = \frac{P_0}{A_0} + \frac{P_1}{A_1} + \frac{P_2}{A_2}. \quad (5.1)$$

Sendo P_0 a probabilidade dos sítios não estarem ocupados, P_1 a probabilidade de um dos dois sítios vizinhos estar ocupado e P_2 a probabilidade dos dois sítios do segmento estarem ocupados. Desta forma,

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

Então, definindo C_f e C_b como a concentração de ligantes livres e ligados, respectivamente, a concentração total de ligantes em solução C_T será $C_T = C_f + C_b$. A fração de ligantes ligados e o total de sítios é dada por $r = C_b/C_{bp}$, em que C_{bp} é a concentração total de pares de bases em solução. Como r_{\max} é a fração máxima de sítios ocupados, a probabilidade de um sítio estar ocupado é definida por r/r_{\max} e é

dada pela equação de Hill, Eq. 3.30:

$$\frac{r}{r_{\max}} = \frac{\left(\frac{[C_f]}{K_d}\right)^n}{1 + \left(\frac{[C_f]}{K_d}\right)^n} \Rightarrow r = r_{\max}H(C_f). \quad (5.3)$$

Pela dificuldade em saber C_f , podemos usar que $C_f = C_T - rC_{bp}$ e resolver a equação de Hill $r = r_{\max}H(C_T - rC_{bp})$. Esta equação pode ser resolvida iterativamente; para ordem zero, temos: $H_0(C_f) \simeq H(C_T)$ e para a aproximação em primeira ordem,

$$H_1 \simeq H[C_T - C_{bp}r_{\max}H(C_T)]. \quad (5.4)$$

Substituindo as Eqs. 5.3 e 5.4 na Eq. 5.2, tem-se o comprimento de persistência efetivo em função da concentração total de ligantes:

$$\begin{aligned} \frac{1}{A} &= \frac{1}{A_0} + \left(\frac{2}{A_1} - \frac{2}{A_0}\right) (H[C_T - C_{bp}r_{\max}H(C_T)]) \\ &+ \left(\frac{1}{A_0} - \frac{2}{A_1} + \frac{1}{A_2}\right) (H[C_T - C_{bp}r_{\max}H(C_T)])^2, \end{aligned} \quad (5.5)$$

que é o resultado principal do modelo proposto por Siman *et al.*.

5.1.1 Resultados experimentais

Foram realizadas medidas do comprimento de persistência e de contorno para complexos β -CD–DNA em diferentes concentrações de β -CD neutra, $C \sim$ mM, à temperatura ambiente (25 °C). As amostras são preparadas como descrito na seção 4.1.1 e consistem de moléculas λ -DNA (Promega) marcadas com biotina em uma solução *Phosphate Buffered Saline* (PBS) cuja concentração de sódio é $[Na] = 150$ mM. A concentração de pares de bases de DNA em todos os experimentos envolvendo a CD é $C_{pb} = 2,4$ μ M. A solução tampão onde se encontra as moléculas de DNA pode ser trocada utilizando uma micropipeta. Assim, conseguimos mudar facilmente a concentração de β -CD na amostra e monitorar as propriedades mecânicas do complexo β -CD–DNA para cada concentração mantendo presa a mesma molécula de DNA.

O grupo controle do experimento constitui de estiramentos da molécula de DNA sem a adição da β -CD; assim, verificamos a reprodutibilidade do estiramento para cada molécula. Depois, com o auxílio de uma micropipeta retiramos a solução e colocamos a solução com a β -CD em uma concentração previamente preparada. Enfatizando que durante este procedimento, a molécula de DNA é mantida presa e desta forma, os

estiramentos são feitos para uma mesma molécula em todas as concentrações.

A Figura 5.2 apresenta o comportamento do comprimento de persistência do complexo para uma concentração de β -CD na amostra igual $C_T = 2$ mM. Note que o comprimento de persistência exibe um comportamento não monotônico em função do tempo: aumenta durante os três minutos iniciais e a partir deste decresce até atingir o equilíbrio químico em que permanece constante. O comprimento de contorno para o complexo β -CD–DNA permanece constante em função do tempo e igual ao valor encontrado para o λ -DNA puro, $L \sim 16.5 \mu\text{m}$.

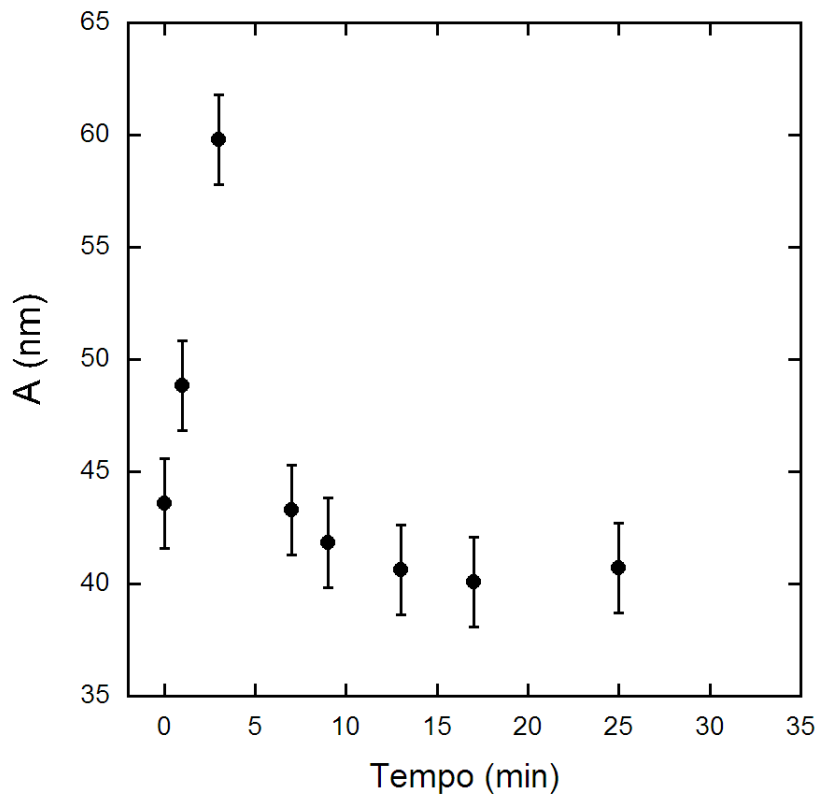


Figura 5.2: Comprimento de persistência do complexo β -CD–DNA em função do tempo para $C_T = 2$ mM.

Determinado o tempo característico para o sistema atingir o equilíbrio químico, monitoramos as propriedades mecânicas deste complexo em função da concentração total de CD na amostra, C_T , em equilíbrio. O comportamento do comprimento de persistência em função da concentração de CD na amostra é mostrado na Figura 5.3.

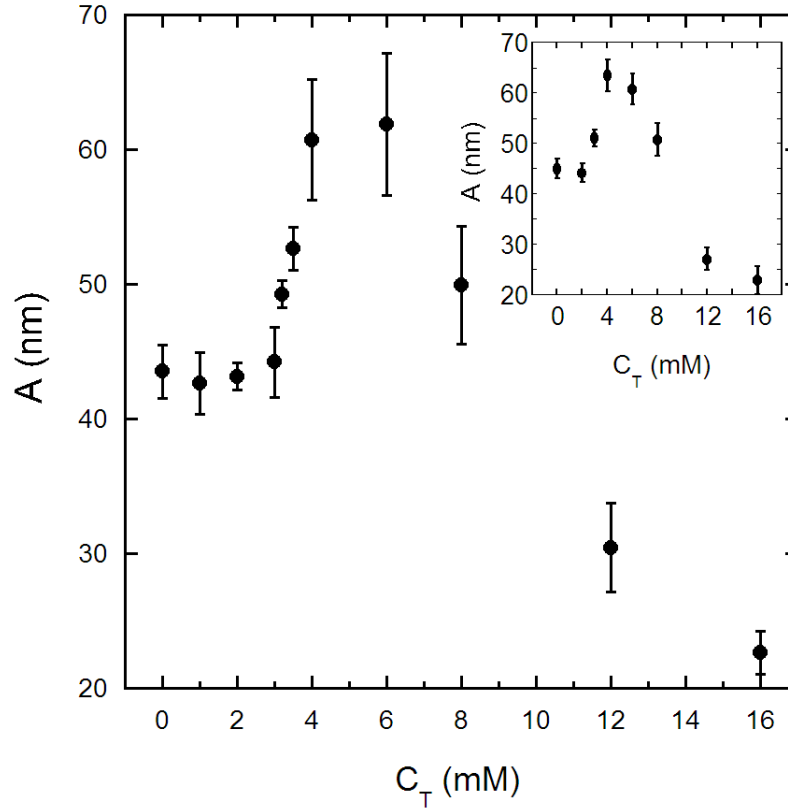


Figura 5.3: Comprimento de persistência do complexo β -CD–DNA em função da concentração de CD na amostra para várias moléculas. No canto superior, o comprimento de persistência do complexo β -CD–DNA em função da concentração de CD na amostra para uma única molécula.

Nesta figura, cada ponto experimental corresponde a uma média sobre quatro moléculas de DNA diferentes, sendo que cada molécula é estirada cinco vezes para cada valor de C_T . Esperamos ~ 20 minutos após cada troca de concentração de CD na amostra para realizarmos os estiramentos. Este tempo é suficiente para se estabelecer o equilíbrio químico na amostra, mantendo constante os valores das propriedades mecânicas do complexo β -CD–DNA, como apresentado na Figura 5.2. Com o intuito de eliminar algumas variações dos comprimentos de persistência e de contorno entre as moléculas de λ -DNA, além do propósito de comparação, apresentamos também no canto superior da Figura 5.3, o comportamento do comprimento de persistência em função da concentração de CD na amostra para uma única molécula de DNA. Neste

caso, cada ponto experimental é a média de cinco estiramentos feitos para a mesma molécula de DNA.

Observamos o comportamento não monotônico do comprimento de persistência, sendo um crescimento abrupto deste comprimento até a concentração de $C = 6$ mM e uma queda suave para concentrações mais altas. Por outro lado, não notamos nenhuma alteração significativa para o comprimento de contorno do DNA em função da concentração de CD na amostra, Figura 5.4. Para todas as concentrações C_T , o valor médio do comprimento de contorno foi $\bar{L} = 16 \pm 1 \mu\text{m}$. Como este valor inclui o comprimento de contorno do λ -DNA puro, podemos concluir que as concentrações de ciclodextrina utilizadas não alteram o comprimento de contorno do DNA.

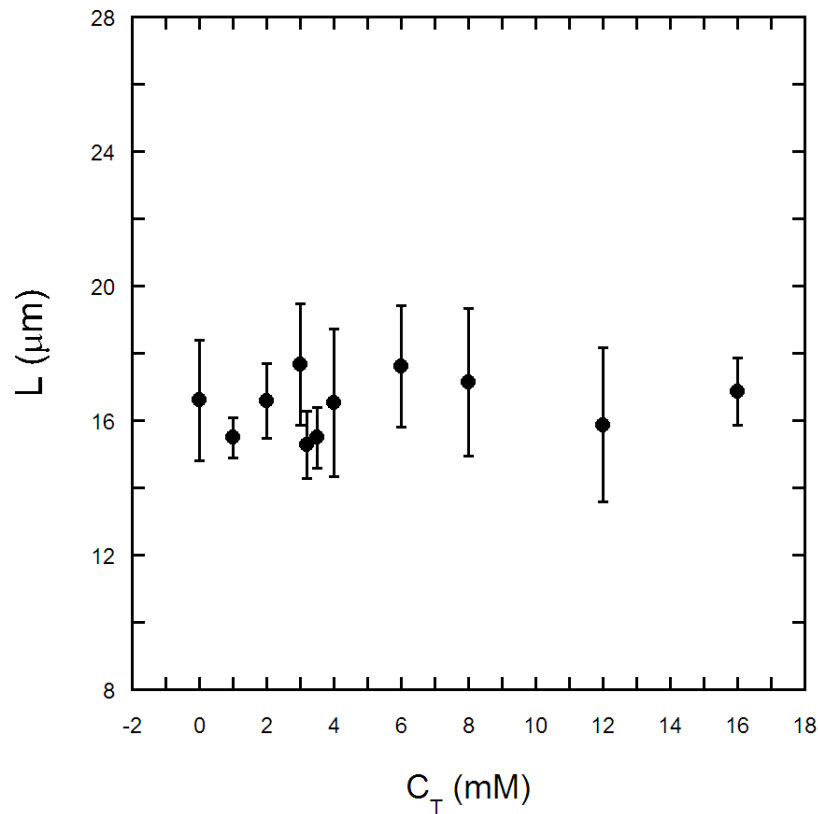


Figura 5.4: Comprimento de contorno do complexo β -CD–DNA em função da concentração de CD na amostra.

Para a interação da β -CD catiônica com a molécula de DNA estudada por Siman *et al.* foi observado um decréscimo do comprimento de persistência, seguida

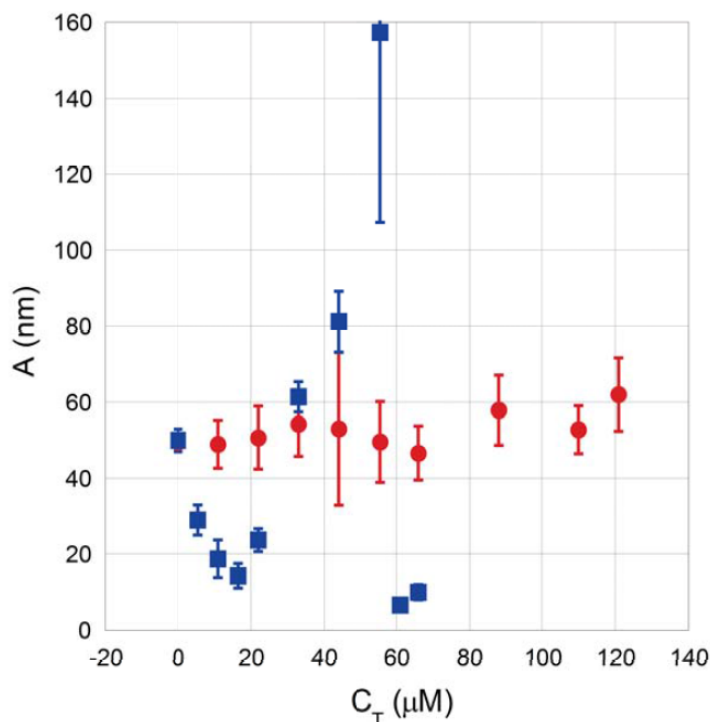


Figura 5.5: Comprimento de persistência do complexo β -CD–DNA em função da concentração de CD na amostra. *Quadrados azuis:* valores medidos para a ciclodextrina monovalente; *esferas vermelhas:* valores medidos para a ciclodextrina neutra [41].

de um aumento deste comprimento em função da concentração de β -CD na amostra. Finalmente, foi observada uma transição abrupta cujos valores do comprimento de persistência eram ~ 10 nm, um valor baixo para o comprimento de persistência consistente com a completa desnaturação da molécula de DNA, Figura 5.5. Ao considerar a interação entre a CD catiônica e o DNA um processo cooperativo, o modelo proposto nesse trabalho ajusta bem os dados experimentais. O expoente de Hill obtido, $n \sim 4$, indica que *clusters* com aproximadamente quatro CDs ligam-se a molécula de DNA. Quando há dois *clusters* vizinhos, aproximadamente oito moléculas de CDs catiônica, o complexo torna-se mais rígido o que aumenta o comprimento de persistência local até a desnaturação completa do DNA. A Figura 5.6 mostra o ajuste segundo o modelo proposto por Siman *et al.* dos resultados experimentais apresentados na Figura 5.5 desconsiderando os dois pontos de concentração mais alta de β -CD, em que a molécula de DNA encontra-se desnaturada.

Nos dados apresentados na Figura 5.3 para a interação CD neutra com o DNA observamos que o complexo torna-se mais rígido e depois mais flexível com o aumento da concentração de CD neutra em solução. Comparando ao caso da CD carregada, a

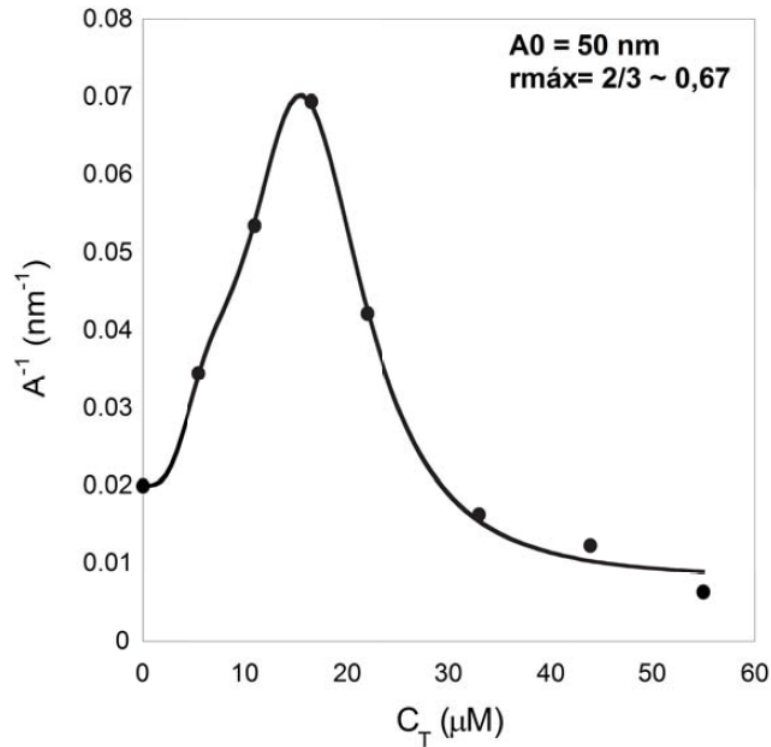


Figura 5.6: Ajuste do inverso do comprimento de persistência em função da concentração de CD em solução. Os pontos representam os dados experimentais e a curva contínua é o ajuste utilizando a Eq. 5.5 [41].

fase inicial mais flexível não ocorre para CD neutra, sugerindo que neste caso *clusters* maiores (mais de oito moléculas de CD) ligam-se cooperativamente ao DNA. Segundo a hipótese da fase de *clusters* [43], esta diferença era esperada porque na presença da repulsão coulombiana *clusters* menores são estabilizados; enquanto que para a CD neutra, na ausência desta força eletrostática, *clusters* maiores podem ser formados. Nossa conjectura é que podemos controlar a cooperatividade na interação CD–DNA controlando a carga superficial das moléculas de CDs. Esta ideia é confirmada quando obtemos os parâmetros quantitativos desta interação ao aplicar o modelo estatístico de desordem tipo *quenched* [41, 3, 44]. Este modelo tem sido aplicado com sucesso a fim de investigar interações da molécula de DNA com diversos ligantes que induzem um comportamento não monotônico do comprimento de persistência ao variar a concentração do ligante na amostra [41, 44, 45]. Este comportamento acontece quando há mais de um modo de ligação mudando o comprimento de persistência local do complexo ou quando um grupo de ligantes muda o comprimento de persistência local diferentemente do ligante isolado [3]. Quando dois ou mais modos de ligação coexistem é necessária a equação de desordem tipo *quenched* para dois sítios vizinhos, Eq. 5.5, para ajustar os dados.

No entanto, quando o segundo modo de ligação surge apenas depois da saturação do primeiro modo de ligação, podemos separar os dados do comprimento de persistência não monotônico em duas partes monotônicas e ajustá-las separadamente com a equação de desordem tipo *quenched* para um único sítio. Testamos essas duas abordagens para os dados apresentados na Figura 5.3. Quando usamos a equação para dois sítios vizinhos, o ajuste retorna parâmetros físico-químicos inconsistentes, indicando que a equação para um sítio pode ajustar os dados apresentados na Figura 5.3. Isto é, existe uma forte preferência por um modo de ligação e o segundo modo aparece apenas após a saturação do primeiro modo. O modelo de desordem tipo *quenched* para um sítio prediz que o comprimento de persistência efetivo A do complexo DNA-ligante pode ser escrito como [46]:

$$\frac{1}{A} = \frac{\left(1 - \frac{r}{r_{\max}}\right)}{A_0} + \frac{\left(\frac{r}{r_{\max}}\right)}{A_1}. \quad (5.6)$$

Lembrando que $\left(\frac{r}{r_{\max}}\right)$ é a probabilidade do sítio estar ocupado e $\left(1 - \frac{r}{r_{\max}}\right)$ a probabilidade do sítio não estar ocupado. Neste caso, apenas dois comprimentos de persistência são considerados: o comprimento de persistência do DNA puro, A_0 e o comprimento de persistência local A_1 alterado pela interação do ligante com o DNA. Usando a Eq. 5.3, temos:

$$\frac{1}{A} = \frac{1}{A_0} - \left(\frac{1}{A_0} - \frac{1}{A_1}\right) H(C_f). \quad (5.7)$$

Sabemos que a concentração de ligantes livres C_f é concentração total de ligantes na amostra C_T menos a concentração de ligantes ligados C_b , ($C_f = C_T - C_b$). Como $C_b < C_{bp} = 2,4 \mu\text{M} \ll C_T$ (mM), então $C_f \simeq C_T$.

Na Figura 5.7 temos o ajuste dos dados apresentados na Figura 5.3 para concentrações em que o comprimento de persistência cresce monotonicamente em função da concentração de CD na amostra, $0 \leq C_T \leq 6$ mM. Visto que o ajuste é dado pela Eq. 5.7, por conveniência, apresentamos o gráfico do inverso do comprimento de persistência em função de C_T . Deste ajuste, determinamos os parâmetros físico-químicos do primeiro modo de ligação:

$$K_d = 3,4 \pm 0,6 \text{ mM} \quad n = 15 \pm 3 \quad A_1 = 62 \pm 3 \text{ nm},$$

em que o comprimento de persistência do DNA puro, $A_0 = 42$ nm, é mantido como um parâmetro fixo.

O fato de ajustarmos com sucesso os dados para $0 \leq C_T \leq 6$ mM com uma única constante K_d indica que há apenas um modo de ligação neste intervalo. O

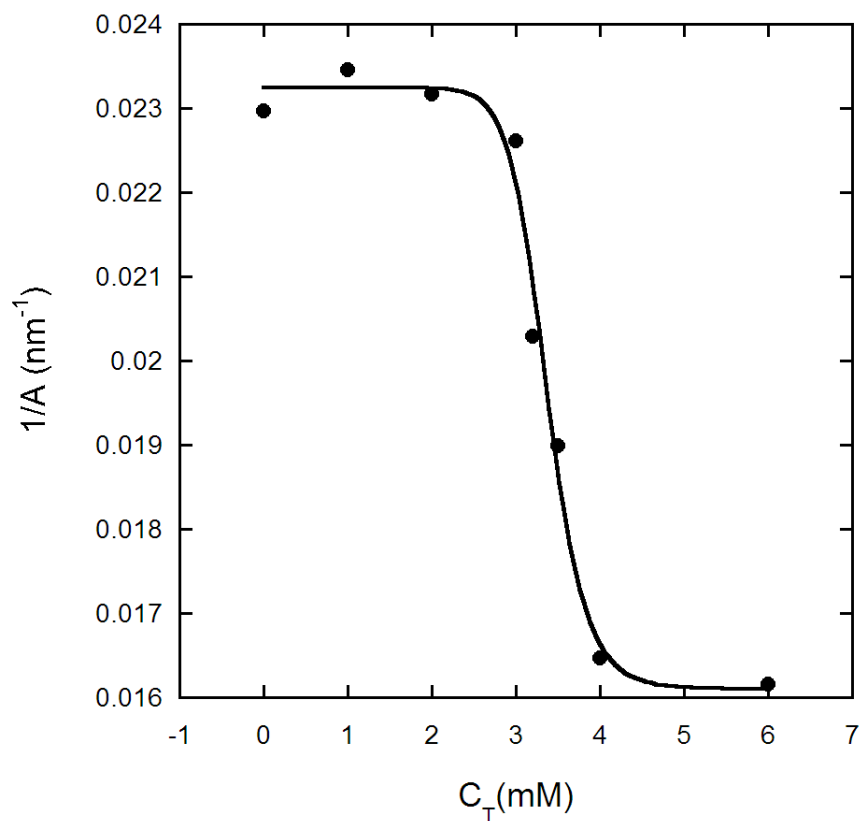


Figura 5.7: *Pontos:* Inverso do comprimento de persistência do complexo CD–DNA em função da concentração total de CD na amostra para o intervalo $0 \leq C_T \leq 6$ mM; *linha sólida:* ajuste dos dados, Eq. 5.7.

valor de K_d ($\sim 10^{-3}\text{M}$) mostra que precisamos de uma alta concentração de CD na amostra, concentração da ordem de milimolar que é três ordens de grandeza maior que a concentração de pares de bases do DNA, para que uma quantidade considerável de moléculas CD interajam com o DNA. Este resultado concorda com o trabalho de Siman *et al.* para a interação CD–DNA, em que foi usada concentrações da ordem de micromolar e desta forma não foi detectada nenhuma interação entre a β -CD neutra e o DNA. Além disso, comparando o valor de K_d que encontramos para a CD neutra com o valor de K_d para CD carregada obtido por Siman *et al.* ($\sim 10^{-6}\mu\text{M}$), notamos que as CDs neutras são mais seguras para serem usadas em produtos de consumo por interagirem de maneira mais fraca com o DNA.

O expoente de Hill obtido indica uma cooperatividade positiva alta no modo de

ligação do complexo CD–DNA. E sugere que *clusters* de ~ 15 moléculas de CD são formados ao longo do DNA. Para a CD carregada, o expoente de Hill encontrado foi $n = 3,45 \pm 0,15$. Isto enfatiza a importância das interações eletrostáticas no sistema. De fato, sabemos que CDs tem a tendência de formarem *clusters* em soluções aquosas [47, 48]. O tamanho destes *clusters* pode ser definido pelo balanço entre uma interação atrativa de curto alcance e uma interação eletrostática repulsiva de longo alcance [43]. Para a CD neutra a força eletrostática repulsiva não está presente e desta forma esperamos um valor muito mais alto para o tamanho do *cluster* e conseqüentemente para o expoente de Hill, como obtido. Esses resultados confirmam nossa hipótese de que a cooperatividade nas reações de ligação em β -CD–DNA pode ser controlada mudando a carga superficial das moléculas de β -CD.

Finalmente, o comprimento de persistência local obtido, $A_1 = (62 \pm 3)$ nm, mostra que este modo de ligação preferencial aumenta o comprimento de persistência do complexo.

A Figura 5.8 mostra o inverso do comprimento de persistência em função da concentração de CD na amostra para concentrações entre $6 \leq C_T \leq 16$ mM. Fizemos um ajuste similar ao apresentado na Figura 5.7, dado pela Eq. 5.7, para monitorarmos a mudança no comprimento de persistência a partir do valor inicial $A_1 = (62 \pm 3)$ nm (determinado a partir do primeiro ajuste e agora mantido fixo) até um valor final A_2 . Para este segundo modo de ligação os parâmetros físico-químicos obtidos são:

$$K_d = 11,5 \pm 2,1 \text{ mM} \quad n = 1,6 \pm 0,3 \quad A_2 = 12,6 \pm 0,5 \text{ nm}.$$

Esses resultados mostram que a constante de dissociação K_d do segundo modo de ligação é cerca de três vezes maior que a do primeiro modo de ligação. O expoente de Hill para o segundo modo de ligação, $n \sim 1,6$, indica que temos um processo cooperativo ainda que uma cooperatividade bem menor da que ocorre no primeiro modo de ligação. Por fim, observamos o decréscimo do comprimento de persistência neste intervalo, $6 \leq C_T \leq 16$ mM. Spies *et al.* mostraram que a β -CD formam complexos de inclusão do tipo hóspede-hospedeiro com as bases purinas que têm a tendência natural de girarem para fora da cadeia, induzindo a desnaturação local da molécula de DNA [49]. Não obstante, esses experimentos foram realizados em temperaturas altas ($> 50^\circ\text{C}$); desta forma, a solubilidade da β -CD é maior e a presença de agregados de CD torna-se menor. No trabalho de Jaffer *et al.*, por outro lado, foram feitos experimentos à temperatura ambiente que sugeriu que *clusters* de CD podem formar pontes de hidrogênio com os pares de bases que giram espontaneamente para fora do DNA, impedindo esses pares de girarem de volta para dentro da cadeia e induzindo a

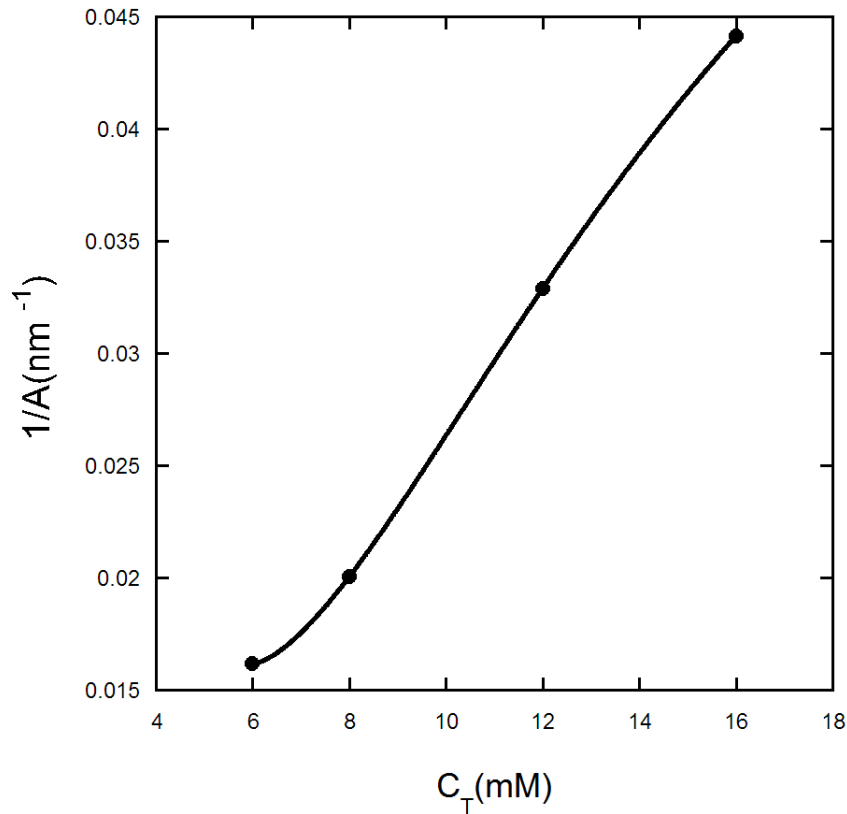


Figura 5.8: Inverso do comprimento de persistência em função da concentração de CD $6 \leq C_T \leq 16$ mM; *pontos*: dados experimentais; *linha sólida*: ajuste dado pela Eq. 5.7.

desnaturação da molécula de DNA [47]. Como nossos experimentos foram realizados à temperatura ambiente, acreditamos que em nosso sistema acontece o proposto por Jaffer *et al.*, em que há a formação de *clusters* de CD ligados a molécula que em seguida induz a desnaturação do DNA. Como discutido anteriormente, os resultados sugerem que o segundo modo de ligação acontece após a saturação do primeiro modo. Esses resultados foram publicados na Ref. [50].

5.2 Complexo LYZ – DNA

A lisozima é uma proteína que possui uma cadeia polipeptídica única com 129 resíduos de aminoácidos. Presente em grande quantidade na clara do ovo, a lisozima é uma proteína globular com função antibacteriana. A atividade enzimática da lisozima é

útil no ataque a muitas bactérias por meio do rompimento da estrutura da parede celular ao hidrolisar a ligação glicosídica entre o *N*-acetilmuramato e o *N*-acetilglicosamina [51]. Em 1999, Huang e colaboradores mostraram que esta proteína é efetiva inclusive contra o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) [52]. A Figura 5.9 apresenta a estrutura da lisozima nas representações *ball-and-stick* e CPK [53].

Semelhante a outras proteínas globulares, a maior parte dos grupos apolares, que a confere um caráter hidrofóbico, estão voltados para o interior da lisozima e maioria dos grupos polares carregados encontram-se na superfície externa onde predomina o caráter hidrofílico.

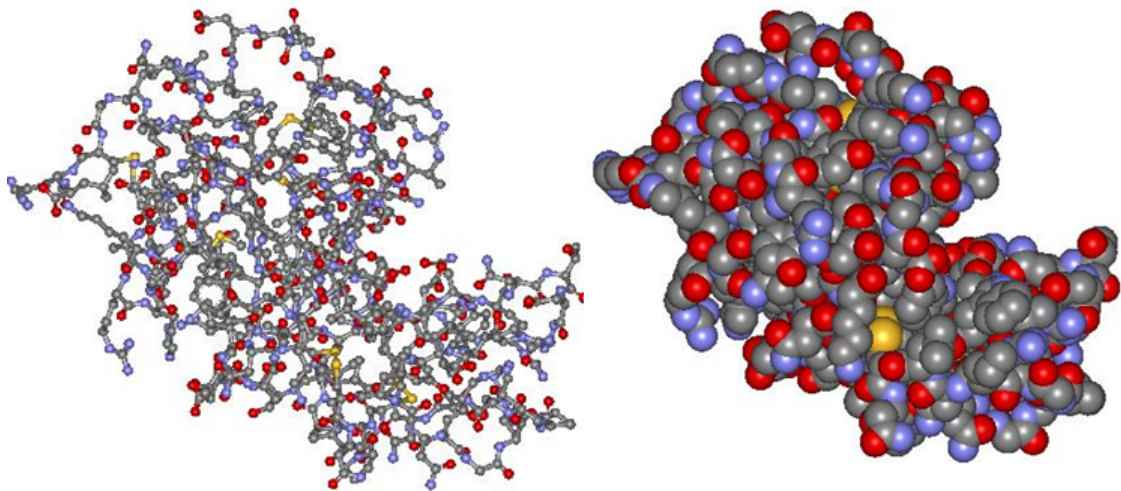


Figura 5.9: Estrutura da lisozima nas representações *ball-and-stick* e CPK respectivamente. Em ambas representações as *esferas cinzas*: carbono; *esferas azuis*: nitrogênio; *esferas vermelhas*: oxigênio; *esferas amarelas*: enxofre. Em solução, a lisozima pode ser considerada um elipsóide cujas dimensões são $3,3 \text{ nm} \times 3,3 \text{ nm} \times 5,5 \text{ nm}$ [51].

5.2.1 Resultados experimentais

Realizamos medidas do comprimento de persistência e de contorno para o complexo LYZ – DNA, à temperatura ambiente (25°C) em função da concentração da lisozima. As amostras são preparadas como descrito na seção 4.1.1 e consistem de moléculas λ -DNA (Promega) marcadas com biotina em uma solução *Phosphate Buffered Saline* (PBS). As medidas foram feitas em soluções PBS em três distintas concentrações de sódio: $[\text{Na}] = 100 \text{ mM}$, $[\text{Na}] = 150 \text{ mM}$ e $[\text{Na}] = 250 \text{ mM}$. A concentração de pares de bases de DNA em todos os experimentos envolvendo a lisozima é $C_{\text{pb}} = 1,7 \mu\text{M}$. Ressaltando que mudamos a concentração de lisozima trocando a solução tampão com

uma micropipeta e desta forma, monitoramos as propriedades mecânicas do complexo LYZ – DNA mantendo presa a mesma molécula de DNA. Análogo ao descrito na seção 5.1.1, o grupo controle constitui de estiramentos da molécula de DNA sem a adição da LYZ para que possamos verificar a reprodutibilidade do estiramento da molécula de DNA. Depois, com o auxílio de uma micropipeta retiramos a solução e colocamos a solução com a LYZ em uma concentração previamente preparada. Este procedimento é feito para cada concentração de sódio.

A Figura 5.10 apresenta o comprimento de persistência em função da concentração total de lisozima na amostra, C_T , para as três concentrações de sódio usadas. Esses dados envolvem três moléculas de DNA, sendo uma para cada concentração de sódio. Cada ponto experimental corresponde a uma média sobre cinco medidas de estiramento do complexo LYZ–DNA e a barra de erro é representada pelo o desvio padrão desta média.

Observamos um comportamento não monotônico para o comprimento de persistência do complexo LYZ – DNA. Em contrapartida, não notamos nenhuma alteração significativa para o comprimento de contorno do DNA em função da concentração de lisozima na amostra, Figura 5.11. Para todas as concentrações C_T de LYZ, o valor médio do comprimento de contorno é próximo do comprimento de contorno do λ -DNA puro, $L_0 = 17 \pm 2 \mu\text{m}$, e desta forma, concluimos que para as concentrações de lisozima usadas o comprimento de contorno do DNA não se altera. Como temos uma molécula de DNA diferente para cada $[\text{Na}]$, os dados do comprimento de contorno L foram normalizados pelo comprimento de contorno do DNA puro, L_0 , para cada $[\text{Na}]$.

Tentamos ajustar os dados do comprimento de persistência do complexo LYZ – DNA em função da concentração total de ligantes usando o modelo *quenched* de dois sítios vizinhos proposto por Siman *et al.*. Daí, conseguimos bons ajustes para as duas concentrações $[\text{Na}]$ mais altas; enquanto para a concentração mais baixa, $[\text{Na}] = 100 \text{ mM}$, o ajuste retornava valores inconsistentes para o comprimento de persistência do complexo.

Em 2005, Podestà *et al.* utilizando a microscopia de força atômica, AFM, mediram a flexibilidade do DNA em superfícies carregadas. O DNA era depositado em mica coberta com um filme de moléculas carregadas positivamente. Esses autores mostraram que a flexibilidade do DNA aumenta a medida que a concentração de cargas positivas da película que cobre a mica aumenta [54]. Antes disto, Manning propôs que a flexibilidade do DNA poderia ser modelada eletrostaticamente, visto que uma parte significativa que contribui para rigidez do DNA era devido a repulsão eletrostática entre os fosfatos da dupla hélice [55, 56].

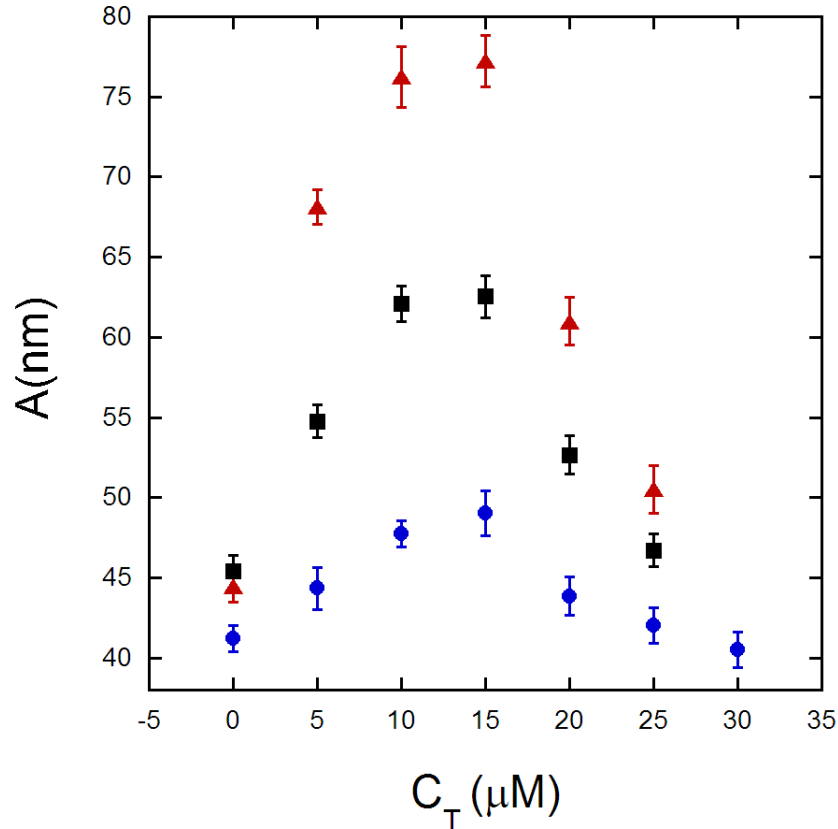


Figura 5.10: Comprimento de persistência do complexo LYZ–DNA em função da concentração de LYZ na amostra. *Pontos azuis:* valores medidos para $[\text{Na}] = 250$ mM; *quadrados pretos:* valores medidos para $[\text{Na}] = 150$ mM; *triângulos vermelhos:* valores medidos para $[\text{Na}] = 100$ mM.

Esta ideia de que as cargas positivas blindam os fosfatos da cadeia do DNA e o torna mais flexível juntamente com o fato de não conseguirmos um bom ajuste para a concentração de sódio mais baixa com o modelo proposto por Siman *et al.* nos conduziu a explicar o comportamento do comprimento de persistência por uma combinação de duas coisas: algo local que aumenta a rigidez do complexo e algo não local, forças eletrostáticas de longo alcance, que diminui a rigidez do complexo ao enfraquecer a carga total repulsiva dos fosfatos. E talvez por isto o modelo local proposto por Siman *et al.* funcione melhor para as concentrações mais altas de sódio, em que a blindagem da carga da lisozima é mais forte e o efeito eletrostático de longo alcance é menor.

Assim, revisitamos os trabalhos do Manning que propõem que além da densi-

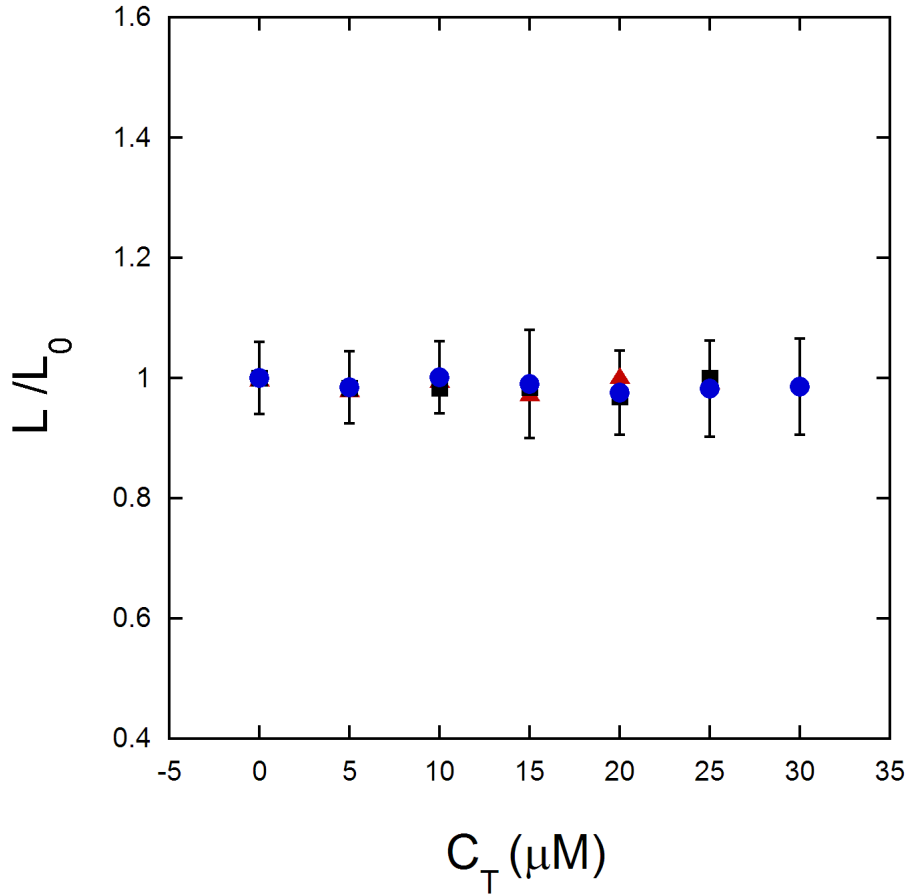


Figura 5.11: Comprimento de contorno do complexo LYZ – DNA em função da concentração de LYZ na amostra. *Pontos azuis:* valores medidos para $[\text{Na}] = 250$ mM; *quadrados pretos:* valores medidos para $[\text{Na}] = 150$ mM; *triângulos vermelhos:* valores medidos para $[\text{Na}] = 100$ mM.

dade de carga o raio do polímero também possui uma contribuição importante para o comprimento de persistência do DNA. Na Ref. [25], é deduzida uma expressão para o comprimento de persistência do DNA com essas considerações:

$$A = \left(\frac{\pi}{2}\right)^{\frac{2}{3}} R^{\frac{4}{3}} (A^*)^{\frac{2}{3}} Z^{-2} l_B^{-1} \left[(2Z\xi - 1) \frac{\kappa b e^{-\kappa b}}{1 - e^{-\kappa b}} - 1 - \ln(1 - e^{-\kappa b}) \right]; \quad (5.8)$$

nesta equação, R é o raio do polímero, A^* é comprimento de persistência do *null isomer*, uma estrutura hipotética análoga ao DNA mas sem carga eletrostática. Z é

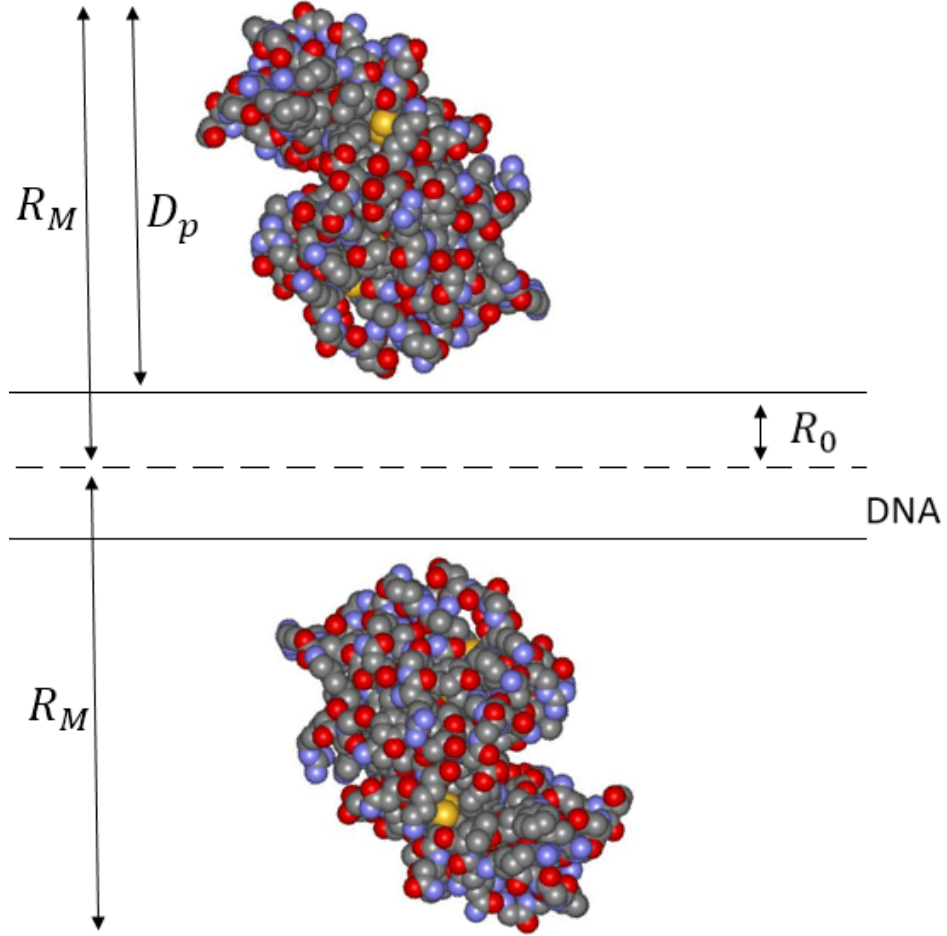


Figura 5.12: Sistema de referência usado no complexo LYZ – DNA.

a valência dos íons de sal que compõem a solução salina onde o DNA está imerso. l_B é o comprimento de Bjerrum ¹ para o solvente puro, ξ é a densidade de carga linear do polímero ($\xi = l_B/b$), em que b é o espaçamento entre as cargas do polímero e κ é o inverso do comprimento de Debye ², $1/\kappa$.

Adaptando este modelo para o nosso caso que envolve o complexo LYZ – DNA, podemos escrever a razão entre o comprimento de persistência do complexo e o comprimento de persistência do DNA puro:

$$\frac{A}{A_0} = \left(\frac{R}{R_0} \right)^{\frac{4}{3}} \left[\frac{(2\xi - 1) \frac{\kappa b e^{-\kappa b}}{1 - e^{-\kappa b}} - [1 + \ln(1 - e^{-\kappa b})]}{(2\xi_0 - 1) \frac{\kappa b e^{-\kappa b}}{1 - e^{-\kappa b}} - [1 + \ln(1 - e^{-\kappa b})]} \right], \quad (5.9)$$

para o nosso caso, $Z = 1$ pois o íon envolvido na solução salina é o Na^+ . Definindo:

¹ $l_B = q^2/Dk_B T$, sendo q a carga do próton e D a constante dielétrica do solvente.

²Para uma solução salina univalente de molaridade c , $1/\kappa = (0,304/\sqrt{c})$ nm.

$$c_1 \equiv \frac{\kappa b e^{-\kappa b}}{1 - e^{-\kappa b}} \qquad c_2 \equiv 1 + \ln(1 - e^{-\kappa b}) \quad (5.10)$$

temos,

$$\frac{A}{A_0} = \left(\frac{R}{R_0}\right)^{\frac{4}{3}} \left[\frac{(2\xi - 1)c_1 - c_2}{(2\xi_0 - 1)c_1 - c_2} \right]. \quad (5.11)$$

Propomos para o raio do complexo LYZ – DNA:

$$R = R_0 \left(1 + m_1 \frac{r}{r_{\max}} \right), \quad (5.12)$$

sendo R_0 o raio do DNA, m_1 um parâmetro e $\frac{r}{r_{\max}}$ a razão entre a fração de ligantes ligados e a fração máxima de ligantes ligados. Quando o DNA está todo coberto, $\frac{r}{r_{\max}} = 1$ e o novo raio do complexo é $R_M = R_0 + D_P$, em que D_P é a dimensão da proteína e desta forma, o parâmetro m_1 fornece-nos uma estimativa da dimensão da lisozima. A Figura 5.12 ilustra esta situação e o sistema de referência.

Para a parte da blindagem eletrostática, propomos modelar a densidade linear de carga ξ do complexo como:

$$\xi = \xi_0 \left(1 - f \frac{r}{r_{\max}} \right), \quad (5.13)$$

ξ_0 é a densidade linear de cargas para o DNA sem ligantes e f é a fração da carga total neutralizada. Para o DNA, $\xi_0 = l_B/b = 0,7 \text{ nm}/0,17 \text{ nm} \approx 4,2$ [25]. Nesta proposta, se $f = 1$ as lisozimas neutralizam todos fosfatos do DNA, tornando-o mais flexível; se $f < 1$, há uma neutralização de parte das cargas e a carga resultante do complexo LYZ – DNA ainda é negativa. Finalmente, se $f > 1$ implica em uma inversão da carga do complexo que adquire uma carga resultante positiva.

Assim, para explicar o comportamento do comprimento de persistência, A , em função da concentração de lisozima, propomos a competição entre esses dois fatores: o aumento de R que aumenta o A e a diminuição de ξ que diminui o A do complexo LYZ – DNA. Substituindo o raio do complexo dado pela Eq. 5.12 e a densidade de carga

dada pela Eq. 5.13 na Eq. 5.11, temos:

$$\begin{aligned} \frac{A}{A_0} &= \left(1 + m_1 \frac{r}{r_{\max}}\right)^{\frac{4}{3}} \left[\frac{(2\xi_0 - 1) \left(1 - f \frac{r}{r_{\max}}\right) c_1 - c_2}{(2\xi_0 - 1) c_1 - c_2} \right] \\ &= \left(1 + m_1 \frac{r}{r_{\max}}\right)^{\frac{4}{3}} \left[1 - \frac{(2\xi_0 - 1) f c_1}{(2\xi_0 - 1) c_1 - c_2} \frac{r}{r_{\max}} \right]. \end{aligned} \quad (5.14)$$

Definindo

$$m_2 = \frac{(2\xi_0 - 1) f c_1}{(2\xi_0 - 1) c_1 - c_2}, \quad (5.15)$$

$$\frac{A}{A_0} = \left(1 + m_1 \frac{r}{r_{\max}}\right)^{\frac{4}{3}} \left(1 - m_2 \frac{r}{r_{\max}}\right). \quad (5.16)$$

Lembrando que r é a isoterma de Hill, seção 3.3.1, $r = \frac{r_{\max} (K_a C_f)^n}{1 + (K_a C_f)^n}$.

Vários ajustes foram feitos com a Eq. 5.16 que retornavam parâmetros consistentes contanto que o parâmetro m_1 permanesse fixo para cada [Na]. Nesses ajustes, o expoente de Hill $n \rightarrow 1$, indicando que a interação da lisozima com o DNA é um processo não cooperativo. O parâmetro m_1 nos fornece uma estimativa de como a proteína se liga ao DNA e como a proteína pode mudar a conformação com o comprimento iônico, esperamos valores distintos deste parâmetro para cada [Na]. Assim, buscamos um ajuste com todos os parâmetros livres. Propomos usar o modelo *quenched* que usamos para o complexo β -CD–DNA³ considerando o comprimento de persistência local variável, como sugerido por Manning [25], devido a presença das interações eletrostáticas de longo alcance. Desta forma, ajustamos o comprimento de persistência A para o complexo LYZ – DNA por:

$$\frac{A_0}{A} = 1 + r \left(\frac{A_0}{A_{\text{Man.}}} - 1 \right), \quad (5.17)$$

em que a razão $A_0/A_{\text{Man.}}$ é dada pelo inverso da Eq. 5.16 e r é a isoterma de Hill com

³Note que o modelo que usamos para o complexo β -CD–DNA:

$$\frac{1}{A} = \frac{P_0}{A_0} + \frac{P_1}{A_1} \Rightarrow \frac{A_0}{A} = 1 + r \left(\frac{A_0}{A_1} - 1 \right)$$

Sendo r a probabilidade do segmento assumir o comprimento de persistência A_1 e $(1 - r)$ a probabilidade do segmento assumir A_0 .

$n = 1$.

A Figura 5.13 apresenta o ajuste do comprimento de persistência A do complexo LYZ – DNA em função da concentração total de lisozima na amostra usando a Eq. 5.17. Nesta figura, o comprimento de persistência do complexo, A , foi normalizado pelo comprimento de persistência do DNA puro, A_0 , para cada $[\text{Na}]$; os valores não normalizados são apresentados na Figura 5.10. Os parâmetros obtidos para cada concentração de sódio estão apresentados na tabela 5.1.

$[\text{Na}]$ mM	K_a M ⁻¹	m_1	m_2
100	$(2,5 \pm 0,5) \times 10^5$	$6,9 \pm 0,8$	$1,1 \pm 0,1$
150	$(1,3 \pm 0,4) \times 10^5$	$4,4 \pm 0,9$	$1,1 \pm 0,1$
250	$(1,1 \pm 0,5) \times 10^5$	$2,1 \pm 0,5$	$1,0 \pm 0,1$

Tabela 5.1: Resultado do ajuste apresentado na Figura 5.13.

O alto valor de K_a ($\sim 10^5$) M⁻¹ reflete o fato de que para baixas concentrações de lisozima na amostra, da ordem de micromolar, uma quantidade considerável de lisozima se liga ao DNA. Note que a medida que aumentamos a concentração de sódio esta constante diminui, como esperado. Isto porque aumentando $[\text{Na}]$ a blindagem das cargas da proteína aumenta e por consequência a afinidade entre a lisozima e o DNA diminui pelo enfraquecimento da atração eletrostática. O parâmetro m_1 fornece-nos uma ideia de como a proteína se liga a dupla hélice. Quando o DNA está todo coberto com a proteína, $r = r_{\text{max}}$, temos que o raio médio do complexo é $R_M = R_0(1 + m_1)$, como vemos no sistema de referência apresentado na Figura 5.12, $R_M = R_0 + D_P$ e desta forma $m_1 R_0$ é o diâmetro da lisozima perpendicular a fita do DNA. Como o raio do DNA é $R_0 \sim 1,2$ nm, $(m_1 \times 1,2)$ nm representa o diâmetro da lisozima. Desta forma, vemos que a conformação da proteína muda ao alterarmos a concentração $[\text{Na}]$. A lisozima pode ser considerada um elipsóide cujas dimensões são $3,3 \text{ nm} \times 3,3 \text{ nm} \times 5,5 \text{ nm}$ [51]; então, esses resultados indicam que para $[\text{Na}] = 100$ mM a lisozima se liga ao DNA com o diâmetro maior perpendicular ao DNA e quando aumentamos $[\text{Na}]$, a proteína muda sua conformação até se ligar com o diâmetro menor perpendicularmente a fita do polímero para $[\text{Na}] = 250$ mM.

Substituindo os valores na equação da definição do parâmetro m_2 , Eq. 5.15, encontramos os valores para a fração de cargas neutralizadas f , apresentados na tabela 5.2. Este resultado indica que as lisozimas neutralizam todos os fosfatos deixando o complexo LYZ – DNA mais flexível na saturação das lisozimas ligadas.

[Na] mM	m_2	f
100	$1,1 \pm 0,1$	$1,2 \pm 0,2$
150	$1,1 \pm 0,1$	$1,2 \pm 0,2$
250	$1,0 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,2$

Tabela 5.2: Fração de cargas neutralizadas.

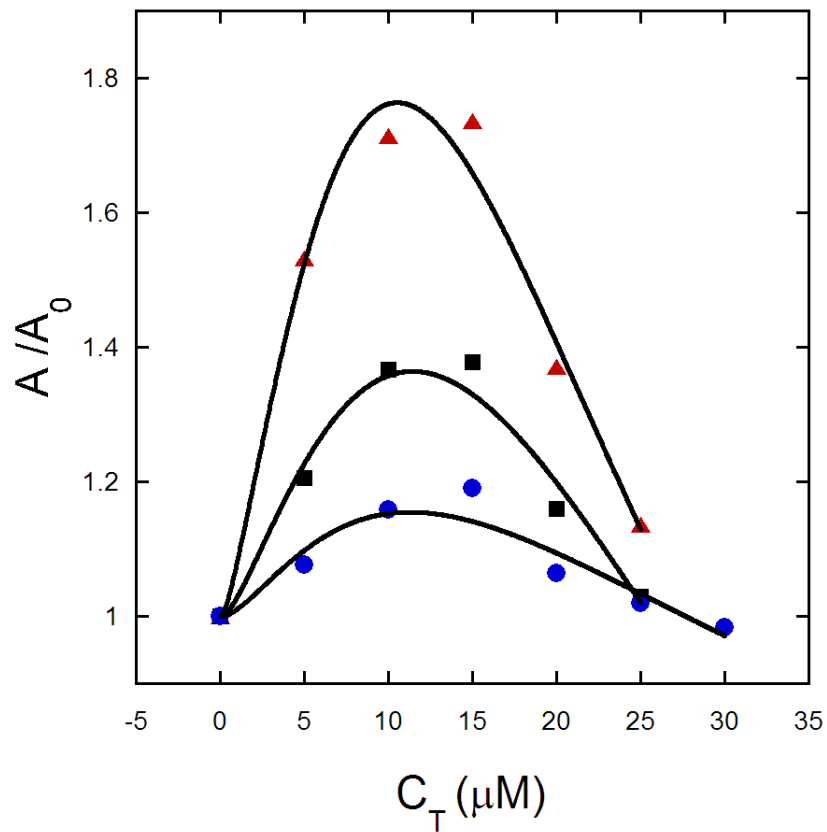


Figura 5.13: Ajuste do comprimento de persistência do complexo LYZ– DNA em função da concentração total de LYZ na amostra usando a Eq. 5.17. *Pontos azuis:* valores medidos para $[\text{Na}] = 250$ mM; *quadrados pretos:* valores medidos para $[\text{Na}] = 150$ mM; *triângulos vermelhos:* valores medidos para $[\text{Na}] = 100$ mM.

Capítulo 6

Conclusões

Caracterizamos a interação entre a β -CD neutra e a molécula de DNA realizando estiramentos de moléculas únicas com a pinça óptica. Os resultados experimentais sugerem que esta interação ocorre em dois modos, sendo que o segundo aparece após a saturação do primeiro. Para baixas concentrações de β -CD ($0 \leq C_T \leq 6$ mM) há a formação de *clusters* grandes, compostos por aproximadamente quinze moléculas de CD, aumentando o comprimento de persistência local do complexo CD-DNA. Os pares de bases ao girarem para fora da molécula de DNA, por flutuações térmicas, podem formar pontes de hidrogênio com os *clusters* de β -CD. Este efeito aparece significativamente para concentrações mais altas de CD ($6 \leq C_T \leq 16$ mM) devido ao aumento do número de *clusters*. Esta ligação que envolve um ou dois pares de bases (expoente de Hill $n \sim 1,6$) impede os pares de bases girarem de volta para dentro da molécula de DNA desnaturando-o localmente, o que explica o decréscimo do comprimento de persistência neste intervalo de concentração de β -CD neutra.

Nossa ideia de que a cooperatividade pode ser controlada mudando a carga superficial da molécula de β -CD foi confirmada pelos expoentes de Hill obtidos. No caso da β -CD catiônica $n \approx 4$ e para a β -CD neutra $n \approx 15$. Nossos resultados indicam que os *clusters* de β -CD ligados ao DNA tem a característica da fase de *clusters* em equilíbrio proposta por Stradner [43].

Por meio do pinçamento óptico, caracterizamos também a interação entre a lisozima e a molécula de DNA realizando estiramentos de moléculas únicas em diferentes concentrações de sódio. Os resultados experimentais sugerem que o comportamento não monotônico do comprimento de persistência do complexo LYZ – DNA em função da concentração de lisozima na amostra se deve a competição entre dois fatores: o aumento do raio do complexo que aumenta a rigidez do mesmo e a diminuição da densidade de carga ξ que diminui o comprimento de persistência do complexo LYZ –

DNA.

A ideia da mudança da conformação da lisozima ao alterarmos a blindagem desta proteína, mudando a concentração de sódio na amostra, na interação com o DNA é confirmada pelos valores dos parâmetros m_1 para as diferentes $[\text{Na}]$. A medida que aumentamos a blindagem da proteína, esta muda a conformação de forma a aumentar sua área próxima a molécula de DNA. Isto, por diminuirmos a repulsão eletrostática entre as cargas negativas do DNA e as cargas negativas polarizadas da lisozima.

A

Cálculo da $\langle r_{ee}^2 \rangle$ para um polímero

O vetor cujo módulo é a distância entre as duas extremidades do polímero é dado por:

$$\vec{r}_{ee} = \vec{r}(L) - \vec{r}(0), \quad (\text{A.1})$$

sendo $\vec{r}(0)$ o vetor posição da primeira extremidade da cadeia polimérica e $\vec{r}(L)$ o vetor posição da outra extremidade. Neste sistema de referência, como a primeira extremidade em $s = 0$, a outra estará em $s = L$, o comprimento de contorno da molécula. Desta forma,

$$\langle |\vec{r}_{ee}|^2 \rangle = \langle |\vec{r}(L) - \vec{r}(0)|^2 \rangle. \quad (\text{A.2})$$

Além disso, sabemos que

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

assim,

$$\vec{r}(s) = \vec{r}(0) + \int_0^s \hat{t}(s') ds' \quad (\text{A.4})$$

Usando a Eq. A.2:

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

Como vimos no Capítulo 3,

$$\langle \hat{t}(s') \cdot \hat{t}(s'') \rangle = \exp \left(-\frac{|s' - s''|}{A} \right). \quad (\text{A.6})$$

Substituindo a Eq. A.6 na Eq. A.5, podemos dividir a integral em duas partes iguais:

$$\langle r_{ee}^2 \rangle = 2 \int_0^L \exp\left(\frac{-s''}{A}\right) \int_0^{s''} \exp\left(\frac{s'}{A}\right) ds' ds'' . \quad (\text{A.7})$$

Resolvendo esta integral obtemos:

$$\langle r_{ee}^2 \rangle = 2AL - 2A^2 \left[1 - \exp\left(-\frac{L}{A}\right) \right] . \quad (\text{A.8})$$

Assim, para o polímero nos limites flexível e muito rígido temos:

(i) no limite flexível, $L \gg A$,

$$\langle r_{ee}^2 \rangle \cong 2AL \quad (\text{A.9})$$

(ii) no limite muito rígido¹, $L \ll A$,

$$\langle r_{ee}^2 \rangle \cong 2AL - 2A^2 \left[1 - \left(1 - \frac{L}{A} + \frac{L^2}{2A^2} \right) \right] \quad (\text{A.10})$$

$$\langle r_{ee}^2 \rangle \cong L^2 \quad (\text{A.11})$$

Estes resultados são apresentados no Capítulo 3 para a distância quadrática média entre as duas extremidades do polímero nos limites rígido e flexível. Observe que no limite rígido, esta distância depende predominantemente do comprimento de contorno da molécula, como esperado, visto que neste caso o polímero se assemelha a uma haste rígida.

¹Neste limite expandimos a exponencial até segunda ordem.

B

Cálculo do valor médio de $|t_{\perp}|^2$

Como discutido no Capítulo 3, para decompor a energia dada pela Eq. 3.19 em modos normais, usamos a transformada de Fourier $\tilde{t}_{\perp}(q) = \int e^{iqs} t_{\perp}(s) ds$. Assim, a transformada inversa e a derivada desta serão:

$$t_{\perp}(s) = \frac{1}{2\pi} \int e^{-iqs} \tilde{t}_{\perp}(q) dq \quad (\text{B.1})$$

$$\Rightarrow \frac{\partial t_{\perp}(s)}{\partial s} = \frac{1}{2\pi} \int e^{-iqs} (-iq) \tilde{t}_{\perp}(q) dq. \quad (\text{B.2})$$

Substituindo estas equações na Eq. 3.18, temos:

$$\begin{aligned} E_{\text{WLC}} &= \frac{1}{2} k_{\text{B}} T \int_0^L \left[A \left| \frac{\partial \hat{t}_{\perp}}{\partial s} \right|^2 + \frac{F}{k_{\text{B}} T} |t_{\perp}|^2 \right] ds - FL \\ &= \frac{1}{2} k_{\text{B}} T \int_0^L A \frac{1}{4\pi^2} \left| \int e^{-iqs} (-iq) \tilde{t}_{\perp}(q) dq \right|^2 + \\ &\quad \frac{F}{k_{\text{B}} T} \frac{1}{4\pi^2} \left| \int e^{-iqs} \tilde{t}_{\perp}(q) dq \right|^2 ds - FL. \end{aligned} \quad (\text{B.3})$$

Usando a definição da delta de Dirac, $\delta(q - q') = \frac{1}{2\pi} \int e^{is(q' - q)} ds$, obtemos a equação da energia apresentada na Eq. 3.19,

$$E_{\text{WLC}} = \frac{1}{2} k_{\text{B}} T \int \frac{1}{2\pi} \left[Aq^2 + \frac{F}{k_{\text{B}} T} \right] |\tilde{t}_{\perp}|^2 dq - FL. \quad (\text{B.4})$$

Escrevendo-a para cada modo normal:

$$E_{\text{WLC}(i)} = \frac{k_{\text{B}} T}{2} \left(Aq^2 + \frac{F}{k_{\text{B}} T} \right) |\tilde{t}_i(q)|^2. \quad (\text{B.5})$$

A função partição Z pode ser escrita como:

$$\begin{aligned}
 Z &= \int \exp\left(-\frac{E_{\text{WLC}(i)}}{k_{\text{B}}T}\right) d|\tilde{t}_i(q)| \\
 &= \int \exp\left[-\frac{1}{2}\left(Aq^2 + \frac{F}{k_{\text{B}}T}\right)|\tilde{t}_i(q)|^2\right] d|\tilde{t}_i(q)| \\
 &= \sqrt{\frac{2\pi k_{\text{B}}T}{Aq^2 k_{\text{B}}T + F}}.
 \end{aligned} \tag{B.6}$$

Assim, por definição podemos calcular o valor médio de $|\tilde{t}_i(q)|^2$:

$$\langle |\tilde{t}_i(q)|^2 \rangle = \frac{1}{Z} \int |\tilde{t}_i(q)|^2 \exp\left[-\frac{1}{2}\left(Aq^2 + \frac{F}{k_{\text{B}}T}\right)|\tilde{t}_i(q)|^2\right] d|\tilde{t}_i(q)|, \tag{B.7}$$

uma integral gaussiana cuja solução é tabelada. Substituindo a função partição Z , Eq. B.6, no denominador da Eq. B.7, temos:

$$\langle |\tilde{t}_i(q)|^2 \rangle = \frac{k_{\text{B}}T}{Aq^2 k_{\text{B}}T + F} \tag{B.8}$$

e desta forma, obtemos o valor médio de $|t_{\perp}|^2$ integrando o valor médio de $|\tilde{t}_i(q)|^2$ sobre todos os modos e multiplicando o resultado por um fator 2, que corresponde às duas componentes (x e y) de \vec{t}_{\perp} . Assim,

$$\begin{aligned}
 \langle |\vec{t}_{\perp}(q)|^2 \rangle &= 2 \int \frac{1}{2\pi} \langle |\tilde{t}_i(q)|^2 \rangle dq \\
 &= \frac{1}{\pi} \int \frac{k_{\text{B}}T}{Aq^2 k_{\text{B}}T + F} dq,
 \end{aligned} \tag{B.9}$$

e com uma simples mudança de variável, identificamos que o resultado da integral é uma função arco tangente. Aplicando os limites de integração ($-\infty$ a $+\infty$) temos a Eq. 3.20 apresentada no capítulo 3:

$$\langle |t_{\perp}|^2 \rangle = \sqrt{\frac{k_{\text{B}}T}{FA}}. \tag{B.10}$$

C

Artigo publicado

Neste apêndice apresentamos o artigo publicado na revista *The Journal of Physical Chemistry Letters* referente a uma parte do trabalho apresentado nesta tese: caracterização da interação da β -CD neutra com a molécula de DNA.

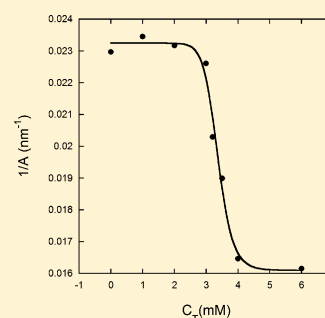
Controlling Cooperativity in β -Cyclodextrin–DNA Binding Reactions

P. S. Alves,[†] O. N. Mesquita,[†] and M. S. Rocha^{*,‡}

[†]Departamento de Física, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Belo Horizonte, Minas Gerais 31270-901, Brazil

[‡]Departamento de Física, Universidade Federal de Viçosa, Av. P. H. Rolfs s/n, Viçosa, Minas Gerais 36570-900, Brazil

ABSTRACT: We have investigated the interaction between the native neutral β -cyclodextrin (CD) and the DNA molecule by performing single-molecule stretching experiments with optical tweezers. In particular, we have monitored the changes of the mechanical properties of the CD–DNA complexes as a function of the CD concentration in the sample. By using a quenched disorder statistical model, we were also capable to extract important physicochemical information (equilibrium binding constants, cooperativity degree) of such interaction from the mechanical data. In addition, we have found that the interaction occurs by two different mechanisms, first with the formation of relatively large CD clusters along the double helix, which thereafter can locally denature the DNA molecule by forming hydrogen bonds with the base pairs that eventually flip out. A prediction of our quenched disorder model was that cooperativity could be controlled by adjusting the surface charge of β -CD molecules. This prediction is confirmed in the present work.



Cyclodextrins (CDs) are cyclic oligosaccharides widely used in food, pharmaceutical, and chemical industries and also in agriculture and environmental engineering. The three common subtypes of CDs are called α -, β -, and γ -cyclodextrins, which consist, respectively, of six, seven, and eight D-glucose units joined by glucosidic linkages. The spatial structure of the three CD subtypes resembles a truncated cone with a relatively hydrophobic inner cavity and a hydrophilic outer surface. Such structure gives CDs the important properties to be a water-soluble molecule with an inner cavity that is able to accommodate hydrophobic compounds forming host–guest inclusion complexes. Therefore, CDs can be used to increase the solubility and bioavailability of hydrophobic molecules.¹

Although well used in the applications previously mentioned, the interaction between CDs and the DNA molecule has been a subject of intense discussion along the past years,^{1–5} with some contradictory results found in the literature. α -CD, for example, has been studied in the past years by Komiyama,⁶ Tee,⁷ Jaffer et al.,⁴ and others. Some of these works suggest that α -CD cannot interact with DNA because the inner cavity of this molecule is too small to accommodate flipped-out DNA base pairs;^{1,6,7} however, the more recent work of Jaffer et al. has found that α -CD aggregates can form hydrogen bonds with the DNA base pairs that flip out spontaneously at room temperature, thus inducing DNA denaturation.⁴

The investigation of the molecular aspects of the DNA interactions with the various types of CDs is important to evaluate possible intracellular effects caused by CDs because they are used in the composition of consumable products. In addition, modified cationic CDs are known to interact strongly with DNA,⁸ being used to condense this biopolymer and to introduce it into small vesicles for gene therapy applications.⁹

In our previous work on the interaction of monocationic β -CD (6-monodeoxy-6-monoamine- β -cyclodextrin) and DNA,⁸ we were able to demonstrate very general aspects of this reaction. Our experimental data could only be explained when we considered, in our two-sites quenched statistical model, that the cationic CD–DNA reaction was positively cooperative. Positive cooperativity occurred because as the cationic CD interacts with a flipped-out DNA base, it locally denatures DNA, causing an increase in the complex flexibility. This effect increases polymer statistical fluctuations with consequent increase in the rate of flipped-out DNA bases, which, in turn, increases the binding rate of CD–DNA in a positive manner. We obtained a Hill exponent, which is a measure of cooperativity, near four, indicating that about four molecules of cationic CD were binding to DNA as clusters, decreasing locally the value of the persistence length of the complex. When two such clusters are nearest-neighbors (about eight CDs molecules) the complex becomes stiffer as seen in the data, explaining the nonmonotonic dependence of the persistence length curve as a function of cationic CD concentration. The model suggests that the size of such clusters is fixed because there is an attractive short-range interaction mediated by DNA elasticity, competing with a long-range repulsion because the cationic CDs are positively charged, such that when the ligand concentration is increased, the number of clusters are increased but not their size. This was a very important ingredient in our model.

This sort of clusterized-phase has been reported by some authors along the past years for colloidal and protein solutions

Received: July 25, 2015

Accepted: August 26, 2015

Published: August 26, 2015

and has been a subject of intense discussion.^{10–12} In fact, to interpret their experiments on colloidal and lysozyme solutions, Stradner et al. proposed the existence of an equilibrium clusterized-phase for a certain range of concentrations, where the size of formed long-lived clusters remains constant independently of solute concentration but not their number, which increases as the solute concentration increases;¹⁰ however, this interpretation of long-lived clusters has been questioned by Shukla et al., who claimed that the system contains largely repulsive individual lysozyme proteins,¹² and also by Porcar et al., who claimed that the formed clusters in concentrated lysozyme solutions are dynamical, with a lifetime of 25 ns.¹¹ In our model, the clusters are formed when CD binds to flipped-out basis of DNA. Such a process was considered to be irreversible (quenched statistical model).⁸ Our results indicate that the type of clusters needed to explain our data have the characteristics of the clusters proposed by Stradner et al.¹⁰ Nevertheless, one should note that these clusters are bound to the DNA molecule, and the nature of similar clusters free in solution can be different. In addition, our model suggests that cooperativity for the CD–DNA reaction could be controlled by changing the surface charge of the CD molecules. In the present work, we study the reaction between neutral CD and DNA. Because there is no Coulomb repulsion between the neutral CDs, we would then expect that larger clusters will be formed. In our model, larger clusters mean larger Hill exponents and larger cooperativity. Our data and analysis for the binding reaction between neutral CD on DNA, which will be presented later, confirm this prediction, showing that one can control the cooperativity of the CD–DNA binding reaction by changing the surface charge of the CD molecules. Such discovery can be extended to improve the investigation of other similar DNA–ligand systems. This type of information can be of great impact in drug design and applications, allowing one to control more precisely the binding reactions and the overall processes in which a ligand binds to the DNA molecule.

The samples here consist of λ -DNA molecules (Promega) end-labeled with biotin in a phosphate-buffered saline (PBS) solution with $[\text{Na}] = 150 \text{ mM}$. The DNA base-pair concentration used in all experiments was $C_{\text{bp}} = 2.4 \mu\text{M}$. One end of the DNA molecules is attached to a streptavidin-coated glass coverslip using the procedure described by Amitani,¹³ while the other end of the molecule is attached to a streptavidin-coated polystyrene bead with a diameter of $3 \mu\text{m}$ (Bangs Laboratories).

We use optical tweezers consisting of a 1064 nm ytterbium-doped fiber laser with maximum output power of 6.0 W (IPG Photonics) mounted in a Nikon TE-300 inverted microscope with an infinite corrected objective (100 \times NA 1.4). The apparatus is previously calibrated by two independent methods using free beads in solution: Stokes force calibration and by analyzing the Brownian fluctuations of the bead in the potential well of the tweezers, from which we determine its trap stiffness κ .^{14,15} Once calibrated, the tweezers are used to trap the polystyrene bead attached to a DNA molecule. By moving the microscope stage and consequently the coverslip using a piezoelectric actuator, we stretch the DNA while monitoring the changes of the bead position in the tweezers' potential well by using videomicroscopy.

We limit the maximum stretching forces to $\sim 3 \text{ pN}$ in all experiments, working therefore within the entropic regime. The Marko–Siggia worm-like chain¹⁶ expression for the entropic

force is used to fit the experimental data and to extract the basic mechanical parameters: the persistence and contour lengths.

The buffer solution containing the DNA molecules can be changed by using micropipettes, such that one can easily change the CD concentration in the sample chamber, and therefore monitor the mechanical properties of the CD–DNA complexes for each situation maintaining the same DNA molecule trapped in the tweezers. All measurements were carried out at room temperature (25 °C). More details of the experimental methods and procedures were can be found in our refs 15 and 17.

First, we have studied the kinetics of the interaction between native neutral CD and the DNA molecule. From these measurements we obtained the typical time scale for the CD–DNA complexes attain the chemical equilibrium under our experimental conditions, after the addition of a certain concentration of CD in the sample chamber. Moreover, we have also monitored the changes on the mechanical properties of the CD–DNA complexes as a function of the drug diffusion time in the sample chamber. We start stretching a bare DNA molecule 5 times to obtain the mean values of the mechanical properties and the associated error bars (standard deviation of the mean value). Next, we change the PBS solution, introducing CD at a chosen concentration C_T . While we performed this procedure the bead is maintained trapped in the optical tweezers to guarantee that the entire experiment is performed with the same DNA molecule. The next measurements are performed sequentially to study the changes in the persistence and contour lengths of the CD–DNA complexes as a function of time, with a fixed CD concentration.

Figure 1 shows the typical behavior of the persistence length for a CD–DNA complex, obtained using a CD concentration $C_T = 2 \text{ mM}$ in the sample. Observe that the persistence length exhibits a nonmonotonic behavior as a function of time: It increases until $\sim 3 \text{ min}$ and then decreases until reaching the chemical equilibrium, remaining constant thereafter.

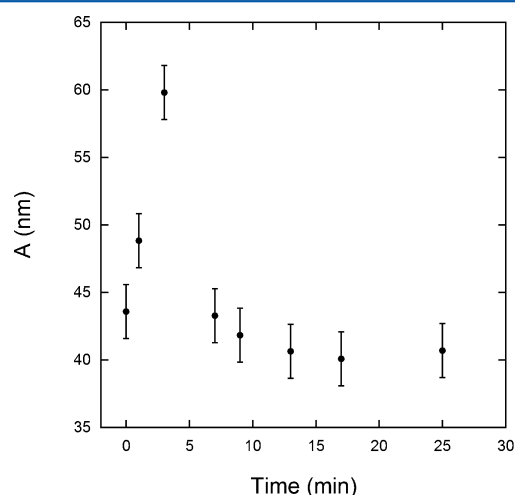


Figure 1. Persistence length A of a CD–DNA complex as a function of time, obtained for a CD concentration $C_T = 2 \text{ mM}$. Observe that such mechanical property exhibits a nonmonotonic behavior as a function of time: It increases until $\sim 3 \text{ min}$ and then decreases until reaching the chemical equilibrium, remaining constant thereafter.

The contour length of the complex, on the contrary, remains constant as a function of time and equal to the value found for the bare λ -DNA ($\sim 16.5 \mu\text{m}$, data not shown).

Once we have determined the typical time scale for the CD–DNA complexes to achieve the chemical equilibrium, the changes on the mechanical properties of such complexes as a function of the CD concentration in the sample (C_T) can now be studied under the equilibrium situation. Figure 2 shows the

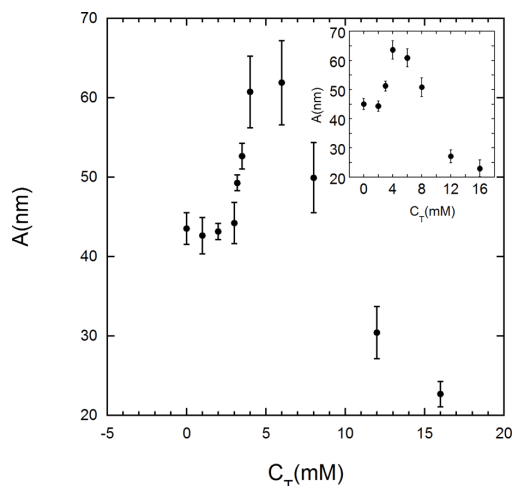


Figure 2. Persistence length A of CD–DNA complexes as a function of the CD concentration in the sample C_T . Observe that the persistence length of the CD–DNA complexes exhibits a non-monotonic behavior: It first increases for small concentrations from the bare DNA value ($\sim 42 \text{ nm}$) until reaching $\sim 61 \text{ nm}$ at $C_T \approx 6 \text{ mM}$ and then decreases for higher concentrations. Inset: data obtained for a single CD–DNA complex, that is, without averaging over different DNA molecules.

persistence length (A) behavior as a function of the CD concentration in the sample (C_T). Each data point is an average over three different DNA molecules, each one stretched five times for each value of C_T , as previously explained. We wait $\sim 20 \text{ min}$ after changing the CD concentration in the sample before starting the next set of stretching measurements. This time interval is sufficient for the complexes to achieve the constant equilibrium values of the mechanical properties, as shown in Figure 1.

For comparison purposes, the inset of Figure 2 shows the data obtained for a single CD–DNA complex, that is, without averaging over different DNA molecules. In this case, each point is the mean value obtained from five stretchings.

Observe that the persistence length of the CD–DNA complexes exhibits a nonmonotonic behavior: It first increases for small concentrations from the bare DNA value ($\sim 42 \text{ nm}$) until reaching $\sim 61 \text{ nm}$ at $C_T \approx 6 \text{ mM}$ and then decreases for higher concentrations.

The contour length of the CD–DNA complexes otherwise remains constant within the error bars for the concentration range studied here. Figure 3 shows such behavior.

For the cationic CD–DNA interaction studied in ref 8 we observed first a decrease in the persistence length and later an increase as a function of the cationic CD concentration. Finally, we observed an abrupt transition to very a small persistence

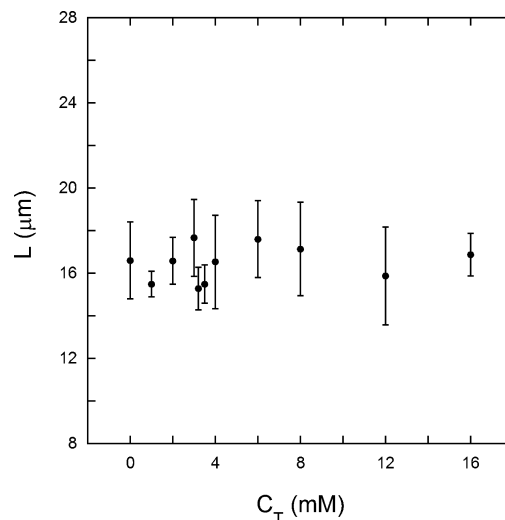


Figure 3. Contour length L of CD–DNA complexes as a function of the CD concentration in the sample C_T . Observe that L remains constant within the error bars for the concentration range studied here.

length ($\sim 10 \text{ nm}$), which was consistent with a nearly complete DNA denaturation. The results of that work are in agreement with the picture that CD captures flipped-out DNA basis, locally denaturing the DNA and consequently decreasing the persistent length of the complexes. In fact, our model fitted well the data if one considers that the binding of cationic CD to DNA is a cooperative process with a Hill exponent of around four, which indicates that clusters of about four CDs bind to DNA. When two clusters are nearest-neighbors (about eight cationic CD molecules) the complex becomes stiffer with an increase in the local persistence length, until finally the whole DNA becomes denatured. In the data of Figure 2 for the neutral CD–DNA interaction we observe that the complex becomes stiffer and later becomes more flexible as a function of the neutral CD concentration. In comparison with the cationic case, the initial more flexible phase does not occur for the neutral case, suggesting that larger clusters (more than eight CD molecules) are cooperatively binding to DNA. This is what one would expect from the clusterized-phase¹⁰ hypothesis because in the presence of Coulomb repulsion smaller clusters are stabilized, whereas for the neutral case larger clusters can occur. Our assumption is that we can control cooperativity in the CD–DNA reaction by controlling the surface charge of the CD molecules. Later we will apply our quenched disorder statistical model^{8,17,18} to obtain quantitative parameters for this binding reaction that confirms our previously described assumption.

Basically, the approach consists in fitting the persistence length data to a quenched disorder equation for the effective persistence length that contains a binding isotherm. Such fitting allows one to effectively extract physicochemical information on the interaction from the persistence length data.¹⁸

This model has been applied successfully to investigate the interactions of the DNA molecule with various ligands that induce nonmonotonic behaviors in the persistence length.^{8,17,19} In general, this type of behavior arises when one has different binding modes that change the local persistence length of the

complex in different ways or when nearest-neighbor bound ligands change the local persistence length differently from the change introduced by an isolated ligand molecule.¹⁸ When there are two or more binding modes that coexist, a two-sites quenched disorder equation^{8,17} is necessary to fit the data. On the contrary, when the second binding mode starts to play a role only after the saturation of the first one, one can split the nonmonotonic persistence length into two monotonic data to perform separate fittings, each one with a simpler one-site quenched disorder equation.¹⁵ We have tested these two approaches on the data of Figure 2. When using the two-sites approach the fitting returns inconsistent results (unrealistic physicochemical parameters), which strongly indicates that the second case is the one that occurs here; that is, there is a strong preference for one type of binding mode, such that a second mode can occur only after the saturation of the first mode. Therefore, we use the one-site version of the model to fit the data of Figure 2.

The one-site quenched disorder model predicts that the effective persistence length A of the DNA–ligand complex can be written as^{15,18}

$$\frac{1}{A} = \frac{1 - r/r_{\max}}{A_0} + \frac{r/r_{\max}}{A_1} \quad (1)$$

where A_0 is the persistence length of the bare DNA, A_1 is the local persistence length that is changed due to ligand binding, r is the bound ligand fraction (bound ligand per DNA base pairs), and r_{\max} is the saturation value of r .

The fraction r/r_{\max} can be expressed by a convenient binding isotherm that captures the physical chemistry of the interaction. Here we have chosen the Hill binding isotherm, which effectively takes cooperative binding into account.⁸ Such isotherm reads

$$r = \frac{r_{\max}(K_i C_f)^n}{1 + (K_i C_f)^n} \quad (2)$$

where K_i is the equilibrium association constant, C_f is the free (not bound) CD concentration in the sample, and n is the Hill exponent. Furthermore, $C_f = C_T - C_b$, where C_b is the bound concentration of CD on DNA. Because $C_b < C_{bp} = 2.4 \mu\text{M} \ll C_T$ (mM), then $C_f \approx C_T$.

The Hill exponent is a parameter that measures the cooperativity degree of the reaction. If $n > 1$, the interaction is positively cooperative; that is, a bound ligand molecule increases the affinity of DNA for subsequent ligand binding. If $n < 1$, otherwise, the interaction is negatively cooperative and a bound ligand molecule decreases the affinity of DNA for subsequent ligand binding. If $n = 1$, the interaction is noncooperative and the affinity is independent of the number of bound ligand molecules. The Hill exponent is also a lower bound for the number of cooperating ligand molecules involved in the reaction.^{18,20}

A complete detailed discussion about the model and its application in extracting physicochemical information on the interaction from the persistence length data can be found in ref 18.

In Figure 4, we show the fitting corresponding to the concentration range in which the persistence length monotonically increases as a function of the CD concentration in the sample ($0 \leq C_T \leq 6$ mM). For convenience to fitting with eq 1, we plot the inverse of the persistence length as a function of C_T .

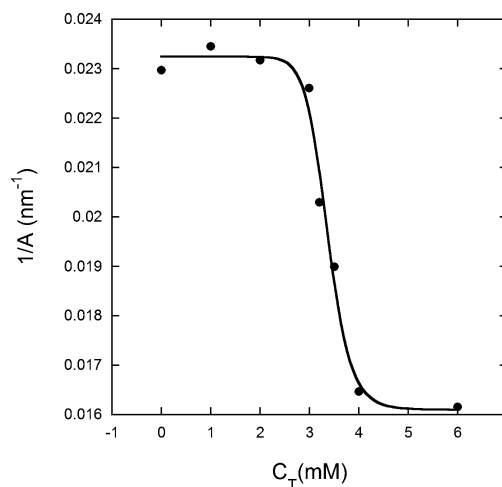


Figure 4. Points: inverse persistence length of the CD–DNA complexes as a function of the total CD concentration for the range $0 \leq C_T \leq 6$ mM. Solid line: a fitting to the model, which returns the physicochemical parameters for the first binding mode: $K_i = (2.9 \pm 0.5) \times 10^2 \text{ M}^{-1}$, $n = 15 \pm 3$ and $A_1 = (62 \pm 3) \text{ nm}$.

From the fitting, we determine the physicochemical parameters corresponding to this first binding mode: $K_i = (2.9 \pm 0.5) \times 10^2 \text{ M}^{-1}$, $n = 15 \pm 3$, and $A_1 = (62 \pm 3) \text{ nm}$. In this fitting, $A_0 = 42 \text{ nm}$ was maintained as a fixed parameter.

The fact that we have successfully fit the data for $0 \leq C_T \leq 6$ mM with a single equilibrium association constant is a strong indication that a single binding mechanism exists in this concentration range.^{18,19} In addition, the low value found for the equilibrium constant K_i ($\sim 10^2 \text{ M}^{-1}$) reflects the fact that one needs a very high concentration of CD molecules in the sample (in the range of millimolar, that is, 3 orders of magnitude higher than the DNA base-pair concentration) to have a considerable amount of CD molecules bound to the DNA. This result is in agreement with our previous work on the CD–DNA interaction, in which we have used CD concentrations in the range of micromolar and thus have not detected any interaction between neutral β -CD and DNA.⁸ In addition, as previously mentioned, in this work we have also investigated the interaction between a monocationic derivative of β -CD, finding in this case an equilibrium association constant on the order of 10^5 M^{-1} .⁸ This result strongly indicates that electrostatic driven interactions between the cationic CD molecules and the negative charged phosphate backbone of the double helix play an important role in this system. In addition, such results indicate that neutral CDs are much safer to be used in the composition of consumable products due to their much weaker interaction with DNA.

The result obtained for the Hill exponent indicates a high positive cooperativity in this CD–DNA binding mode and also suggests that bound clusters of ~ 15 CD molecules are formed along the DNA double helix.⁸ For comparison purposes, in ref 8 we have found the result $n = 3.45 \pm 0.15$ for the monocationic CD previously mentioned. These results emphasize again the important role of the electrostatic interactions in this system. In fact, it is well established that CDs have a tendency to form clusters in water-based solutions.^{4,21,22} The size of such cluster should be defined by

a balance between an attractive short-range interaction and a repulsive long-range electrostatic interaction that allows its stabilization.¹⁰ For neutral CDs there are no repulsive forces such that we expect a much higher value for the Hill exponent, as we have obtained, confirming our assumption that cooperativity in β -CD–DNA binding reactions can be controlled by changing the surface charge of β -CD molecules.

Finally, the value obtained for the local persistence length, $A_1 = (62 \pm 3)$ nm, indicates that this first binding mode increases the local persistence length of the complexes.

Figure 5 shows the inverse persistence length as a function of the total CD concentration for the range $6 \leq C_T \leq 16$ mM. A

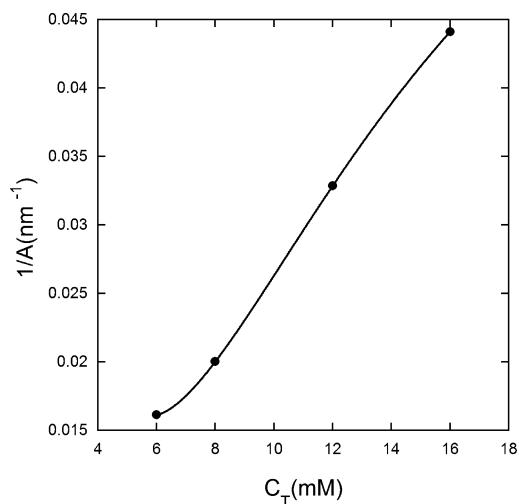


Figure 5. Points: inverse persistence length of the CD–DNA complexes as a function of the total CD concentration for the range $6 \text{ mM} \leq C_T \leq 16 \text{ mM}$. Solid line: a fitting to the model, which returns the physicochemical parameters for the second binding mode: $K_i = (87 \pm 16) \text{ M}^{-1}$, $n = 1.6 \pm 0.3$, and $A_2 = (12.6 \pm 0.5) \text{ nm}$.

fitting similar to the one shown in Figure 4 was performed to study the change of the persistence length from the initial value $A_1 = (62 \pm 3)$ nm (determined from the first fitting and now maintained fixed) up to a final value A_2 . For this second binding mode, the physicochemical parameters obtained are $K_i = (87 \pm 16) \text{ M}^{-1}$, $n = 1.6 \pm 0.3$, and $A_2 = (12.6 \pm 0.5) \text{ nm}$.

These results show that the equilibrium association constant for the second binding mode is about three times lower than the constant of the first binding mode. In addition, the Hill exponent of the second mode (~ 1.6) indicates that there is still a positive cooperativity, even though much smaller than for the first binding mode. Finally, the decrease observed in the persistence length for this concentration range can, in principle, be interpreted in two different ways. In fact, Spies et al. have shown that β -CD can form stable host–guest complexes with flipped-out purine bases, inducing local DNA denaturation.¹ Nevertheless, these authors have performed the experiments at high temperatures (>50 °C), a situation in which the solubility of β -CD increases and the presence of CD self-aggregates becomes smaller.^{1,4} Jaffer et al., on the contrary, have performed experiments at room temperature, showing that the abundant CD aggregates found in this situation can form hydrogen bonds with spontaneously flipped-out DNA base

pairs, prohibiting them from reverting back and thus inducing denaturation.⁴ Because our experiments were all performed at room temperature, we believe that this second hypothesis is the one that occurs in our system, with the formation of CD bound clusters that thereafter induce DNA denaturation.

In summary, by performing single-molecule stretching experiments with optical tweezers, we have characterized the interaction between the native neutral β -CD and the DNA molecule. The experiments performed here suggest that such interaction occurs by two different mechanisms. First, for small CD concentrations ($0 \leq C_T \leq 6$ mM), there is a formation of relatively large clusters (~ 15 molecules in average) that stay in contact with the DNA double helix with a relatively small equilibrium binding constant ($\sim 10^2 \text{ M}^{-1}$), increasing the local persistence length of the CD–DNA complex. When a base pair flips out spontaneously due to thermal fluctuations, it can form hydrogen bonds with the CD clusters. This effect appears to be significant only at higher CD concentrations ($6 \leq C_T \leq 16$ mM) due to the increase in the number of available clusters. These base-cluster linkages, which involve one or two base pairs (Hill exponent ~ 1.6), prevent the base pairs from reverting back and thus the DNA molecule became locally denatured, which explains the decrease observed in the persistence length in this CD concentration range.

Our assumption that cooperativity (value of Hill exponent) could be controlled by changing the surface charge of β -CD molecules was confirmed because for monocationic β -CD $n \approx 4$ and for neutral β -CD $n \approx 1.5$. Our results indicate that the clusters bound to DNA have the characteristics of the equilibrium clusters proposed by Stradner et al.¹⁰

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: marcios.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 Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

REFERENCES

- (1) Spies, M. A.; Schowen, R. L. The Trapping of a Spontaneously “Flipped-Out” Base from Double Helical Nucleic Acids by Host–Guest Complexation with β -Cyclodextrin: The Intrinsic Base-Flipping Rate Constant for DNA and RNA. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14049–14053.
- (2) Hoffman, J. L.; Bock, R. M. The Interaction of Cyclodextrins with Nucleic Acids. A Study of Secondary Structure in Three Transfer Ribonucleic Acids. *Biochemistry* **1970**, *9*, 3542–3550.
- (3) Formoso, C. The Interaction of β -Cyclodextrin with Nucleic Acid Monomer Units. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1973**, *50*, 999–1005.
- (4) Jaffer, S. S.; Ghosh, P.; Das, A.; Purkayastha, P. Opening of DNA Double Helix at Room Temperature: Application of α -Cyclodextrin Self-Aggregates. *Nanoscale* **2010**, *2*, 1420–1422.
- (5) Jessel, N.; Oulad-Abdelghani, M.; Meyer, F.; Lavalle, P.; Haikel, Y.; Schaaf, P.; Voegel, J.-C. Multiple and Time-Scheduled in Situ DNA Delivery Mediated by β -Cyclodextrin Embedded in a Polyelectrolyte Multilayer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 8618–8621.

- (6) Komiyama, M. α -Cyclodextrin-Catalyzed Regioselective Phosphorus-Oxygen(2') Cleavages of 2',3'-Cyclic Monophosphates of Ribonucleosides. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 3046–3050.
- (7) Tee, O. S. The Stabilization of Transition States by Cyclodextrins and Other Catalysts. *Adv. Phys. Org. Chem.* **1994**, *29*, 1–85.
- (8) Siman, L.; Carrasco, I. S. S.; da Silva, J. K. L.; de Oliveira, M. C.; Rocha, M. S.; Mesquita, O. N. Quantitative Assessment of the Interplay between DNA-Elasticity and Cooperative Binding of Ligands. *Phys. Rev. Lett.* **2012**, *109*, 248103.
- (9) Tavares, G. D.; Viana, C. M.; Araujo, J. G. V. C.; Ramaldes, G. A.; Carvalho, W. S.; Pesquero, J. L.; Vilela, J.; Andrade, M. S.; de Oliveira, M. C. Development and Physico-Chemical Characterization of Cyclodextrin-DNA Complexes Loaded Liposomes. *Chem. Phys. Lett.* **2006**, *429*, 507–512.
- (10) Stradner, A.; Sedgwick, H.; Cardinaux, F.; Poon, W. C. K.; Egelhaaf, S. U.; Schurtenberger, P. Equilibrium Cluster Formation in Concentrated Protein Solutions and Colloids. *Nature* **2004**, *432*, 492–495.
- (11) Porcar, L.; Falus, P.; Chen, W.-R.; Faraone, A.; Fratini, E.; Hong, K.; Baglioni, P.; Liu, Y. Formation of the Dynamic Clusters in Concentrated Lysozyme Protein Solutions. *J. Phys. Chem. Lett.* **2010**, *1*, 126–129.
- (12) Shukla, A.; Mylonas, E.; Di Cola, E. D.; Finet, S.; Timmins, P.; Narayanan, T.; Svergun, D. I. Absence of Equilibrium Cluster Phase in Concentrated Lysozyme Solutions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105*, 5075–5080.
- (13) 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.
- (14) Alves, P. S.; Rocha, M. S. Videomicroscopy Calibration of Optical Tweezers by Position Autocorrelation Function Analysis. *Appl. Phys. B: Lasers Opt.* **2012**, *107*, 375–378.
- (15) Crisafulli, F. A. P.; Cesconetto, E. C.; Ramos, E. B.; Rocha, M. S. DNA-Cisplatin Interaction Studied with Single Molecule Stretching Experiments. *Integr. Biol.* **2012**, *4*, 568–574.
- (16) Marko, J. F.; Siggia, E. D. Stretching DNA. *Macromolecules* **1995**, *28*, 8759–8770.
- (17) Cesconetto, E. C.; Junior, F. S. A.; Crisafulli, 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**, *15*, 11070–11077.
- (18) Rocha, M. S. Extracting Physical Chemistry From Mechanics: a New Approach to Investigate DNA Interactions with Drugs and Proteins in Single Molecule Experiments. *Integr. Biol.* **2015**, DOI: 10.1039/C5IB00127G.
- (19) Silva, E. F.; Ramos, E. B.; Rocha, M. S. DNA Interaction with Hoechst 33258: Stretching Experiments Decouple the Different Binding Modes. *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117*, 7292–6.
- (20) Daune, M. *Molecular Biophysics*, 1st ed.; Oxford University Press: Oxford, U.K., 1999.
- (21) Bonini, M.; Rossi, S.; Karlsson, G.; Almgren, M.; Lo Nostro, P.; Baglioni, P. Self-Assembly of β -Cyclodextrin in Water. Part 1: Cryo-TEM and Dynamic and Static Light Scattering. *Langmuir* **2006**, *22*, 1478–1484.
- (22) He, Y.; Fu, P.; Shen, X.; Gao, H. Cyclodextrin-Based Aggregates and Characterization by Microscopy. *Micron* **2008**, *39*, 495–516.

REFERÊNCIAS

- [1] J. D. Watson e F. H. C. Crick. The structure of dna. *Cold spring harbor symposia on quantitative biology*, 18:123–131, 1953.
- [2] K. R. Chaurasiyaa, P. Thayaparan, J. M. Micah, and C. W. Mark. Biophysical characterization of dna binding from single molecule force measurements. *Phys. of Life Rev.*, 7:299–341, 2010.
- [3] M. S. Rocha. Extracting physical chemistry from mechanics: a new approach to investigate dna interactions with drugs and proteins in single molecule experiments. *Integr. Biol.*, 7:967–986, 2015.
- [4] A. Ashkin. Acceleration and trapping of particles by radiation pressure. *Phys. Rev. Lett.*, 24(4):156–159, 1970.
- [5] A. Ashkin. Optical trapping and manipulation of neutral particles using lasers. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94:4853–4860, 1997.
- [6] A. Ashkin. *Optical trapping and manipulation of neutral particles using lasers: a reprint volume with commentaries*. World Scientific, 2006.
- [7] A. Ashkin. Forces of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime. *Biophys. J.*, 61:569–582, 1992.
- [8] G. Roosen. La lévitation optique de sphères. *Can. J. Phys.*, 57(9):1260–1279, 1979.
- [9] P. S. Alves. *Teoria e Calibração de Pinças Ópticas*. dissertação de Mestrado, UFV, 2012.
- [10] M. S. Rocha. Optical tweezers for undergraduates: theoretical analysis and experiments. *Am. J. Phys.*, 77:704–712, 2009.
- [11] J. K. G. Dhont. *An introduction to dynamics of colloids*. Elsevier, 1996.
- [12] A. Mazolli. *Teoria das pinças ópticas: uma aplicação da teoria de espalhamento Mie*. Tese de Doutorado, UFJR, 2003.

-
- [13] M. S. Rocha. *Pinças Ópticas: Experimento e Teoria*. Dissertação de Mestrado, UFMG, 2004.
- [14] J. D. Jackson. *Classical Electrodynamics*. John Wiley e Sons. Inc., 1975.
- [15] P. A. M. Neto and H. M. Nussenzveig. Theory of optical tweezers. *Europhys. Lett.*, 50(5):702–708, 2000.
- [16] A. Mazolli, P. A. M. Neto, and H. M. Nussenzveig. Theory of trapping forces in optical tweezers. *Proc. R. Soc. Lon. A*, 459:3021–3041, 2003.
- [17] R. S. Dutra. *Parametrizando uma Pinça Óptica: Efeitos de Aberrações e Absorção*. Tese de Doutorado, UFJR, 2011.
- [18] A. Ashkin and J. M. Dziedzic. Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria. *Science*, 235:1517–1520, 1987.
- [19] A. Ashkin, J. M. Dziedzic, and Yamane. Optical trapping and manipulation of single cells using infrared laser beams. *Nature*, 330:769–771, 1987.
- [20] R. E. Franklin and R. G. Gosling. Evidence for 2-chain helix in crystalline structure of sodium deoxyribonucleate. *Nature*, 172:156–157, 1953.
- [21] M. S. Rocha. *Pinças Ópticas: Experimento, Teoria e Aplicação no estudo da interação DNA-fármacos*. Tese de Doutorado, UFMG, 2008.
- [22] C. Bustamante, J. F. Marko, E. D. Siggia, and S. Smith. Entropic elasticity of λ – phage dna. *Science*, 265:1599–1600, 1994.
- [23] S. Geggier and A. Vologodskii. Sequence dependence of dna bending rigidity. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 107:15421–15426, 2010.
- [24] J. Lipfert, S. Klijnhout, and N. H. Dekker. Torsional sensing of small-molecule binding using magnetic tweezers. *Nucleic Acids Res.*, 38:7122–7132, 2010.
- [25] G. S. Manning. The persistence length of dna is reached from the persistence length of its null isomer through an internal electrostatic stretching force. *Biophys. J.*, 91:3607–3616, 2006.
- [26] R. K. Pathria. *Statistical Mechanics*. Butterworth-Heinemann, 1996.
- [27] C. Bustamante, J. Liphardt, and F. Ritort. The nonequilibrium thermodynamics of small systems. *Phys. Today*, 58:43–48, 2005.

-
- [28] J. F. Marko and E. D. Siggia. Stretching dna. *Macromolecules*, 28:8759–8770, 1995.
- [29] C. Bustamante, S. B. Smith, J. Lipharda, and D. Smith. Single-molecule studies of dna mechanics. *Nucleic Acid*, 10:279–285, 2000.
- [30] Rudolf Podgornik. Dna off the hooke. *Nature*, 1:10–101, 2006.
- [31] C.D. Scripture and W. D. Figg. Drug interactions in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer*, 6:546–558, 2006.
- [32] A. V. Hill. The possible effects of the aggregation of the molecules of hemoglobin on its dissociation curves. *J. Physiol*, 40:4–7, 1910.
- [33] I. Amitani, B. Liu, C.C. Dombrowski, R. J. Baskin, and S. C. Kowalczykowski. Whatching individual proteins acting on single molecules of dna. *Methods Enzymol*, 472:261–291, 2010.
- [34] M. González, L. A. Bagatolli, I. Echabe, J. L. R. Arrondo, C. E. Argarana, C. R. Cantor, and G. D. Fidelio. Interaction of biotin with streptavidin. *J. Biol. Chem.*, 272:11288–11294, 1997.
- [35] D. G. Grier. A revolution in optical manipulation. *Nature*, 424:21–27, 2003.
- [36] H. Faxen. The resistance against the movement of a rigour sphere in viscous fluids, which is embedded between two parallel layered barriers. *Ann. Phys.*, 68(10):89–119, 1922.
- [37] N. B. Viana, R. T. S. Freire, and O. N. Mesquita. Dynamic light scattering from an optically trapped microsphere. *Phys. Rev. E*, 65(041921):1–11, 2002.
- [38] M. I. M. Feitosa and O. N. Mesquita. Wall-drag effect on diffusion of colloidal particles near surfaces: a photon correlation study. *Phys. Rev. A*, 44(10):6677–6685, 1991.
- [39] P. S. Alves and M. S. Rocha. Videomicroscopy calibration of optical tweezers by position autocorrelation function analysis. *Applied Physics B*, 107:375–378, 2012.
- [40] U. Agero, L.G. Mesquita, B.R.A Neves, R.T. Gazzinelli, and O.N. Mesquita. De-focusing microscopy. *Microscopy Research and Technique*, 65:159–165, 2004.

-
- [41] L. Siman, I.S.S. Carrasco, J.K.L. Silva, M. S. Rocha, and O. N. Mesquita. Quantitative assessment of the interplay between dna elasticity and cooperative bonding of ligands. *Phys. Rev. Lett.*, 109(248103):1–5, 2012.
- [42] G. D. Tavares, C. M. Viana, J.G.V Araújo, G.A. Ramaldes, W. S. Carvalho, J.L Pesquero and J. Vilela, M.S. Andrade, and M.C. de Oliveira. Development and physico-chemical characterization of cyclodextrin-dna complexes loaded liposomes. *Chem. Phys. Lett.*, 429:507–512, 2006.
- [43] A. Stradner, H. Sedgwick, F. Cardinaux, W. C. K. Poon, S. U. Egelhaaf, and P. Schurtenberger. Equilibrium cluster formation in concentrated protein solutions and colloids. *Nature*, 432:492–495, 2004.
- [44] E. C. Cesconetto, F. S. A. Junior, F. A. P. Crisafuli, O. N. Mesquita, E. B. Ramos, and M. S. Rocha. Dna interaction with actinomycin d: mechanical measurements reveal the details of the binding data. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 15:11070–11077, 2013.
- [45] E. F. Silva, E. B. Ramos, and M. S. Rocha. Dna interaction with hoeschst 33258: stretching experiments decouple the different binding modes. *J. Phys. Chem. B*, 117:7292–7296, 2013.
- [46] F. A. P. Crisafuli, E. C. Cesconetto, E. B. Ramos, and M. S. Rocha. Dna-cisplatin interaction studied with single molecule stretching experiments. *Integr. Biol.*, 4:568–574, 2012.
- [47] S. S. Jaffer, P. Ghosh, A. Dasb, and P. Purkayastha. Opening of dna double helix at room temperature: Application of α -cyclodextrin self-aggregates. *Nanoscale*, 2:1420–1422, 2010.
- [48] Y. He, P. Fu, X. Shen, and H. Gao. Cyclodextrin-based aggregates and characterization by microscopy. *Micron*, 39:495–516, 2008.
- [49] M. A. Spies and R. L. Schowen. The trapping of a spontaneously flipped-out base from double helical nucleic acids by host-guest complexation with beta-cyclodextrin: the intrinsic base-flipping rate constant for dna and rna. *J. Am. Chem. Soc.*, 124:14049–14053, 2002.
- [50] P. S. Alves, O. N. Mesquita, and Rocha M. S. Controlling cooperativity in β -cyclodextrin–dna binding reactions. *J. Phys. Chem. Lett.*, 6:3549–3554, 2015.

-
- [51] T. Yang, G. Wei, and Z. Li. Electrotatic assembly of protein lysozyme on dna visualized by atomic force microscopy. *Applied Surfaces Science*, 253:4311–4316, 2007.
- [52] S. Lee-Huang, P. L. Huang, Y. Sun, P. L. Huang, H. Kung, D. L. Blithe, and H. Chen. Lysozyme and rnases as anti-hiv components in β -core preparations of human chorionic gonadotropin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, pages 2678–2681, 1999.
- [53] Lysozyme structure. <http://lysozyme.co.uk/lysozyme-structure.php>, 2006.
- [54] A. Podestà, M. Indrieri, D. Brogioli, G. Manning, P. Milani, R. Guerra, L. Finzi, and D. Dunlap. Positively charged surfaces increase the flexibility of dna. *Biophys. J.*, 89:2558–2563, 2005.
- [55] G. S. Manning. The molecular theory of polyelectrolyte solutions with applications to the electrostatic properties of polynucleotides. *Rev. Biophys.*, 11, 1978.
- [56] G. S. Manning. Self-attraction and natural curvature in null dna. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 7:41–61, 1989.