

# DNA kondenzace sledovaná pomocí fluorescenční korelační spektroskopie (FCS)

Aleš Benda

*(oddělení biofyzikální chemie;*

*T: 266053142, 3484, 3187; ales.benda@jh-inst.cas.cz)*

Tato přednáška navazuje na přednášku Jana Sýkory „Fluorescenční mikroskopie a fluorescenční korelační spektroskopie jako nástroje pro měření velikosti a pohyblivosti nanočástic.”

Ve virech, bakteriích a prokaryotických buňkách je molekula DNA sbalena do kompaktní struktury pomocí kladně nabitých polyaminových molekul, jako je například spermine<sup>1</sup>. Důvod je ten, že volný (rozbalený) řetězec DNA by zabíral příliš mnoho místa a nebyl by chráněn před účinky štěpících enzymů. V nevirální genové terapii (Non-viral gene therapy – NVGT) se řeší podobný problém. Jakým způsobem sbalit velkou molekulu DNA nesoucí potřebnou genetickou informaci (vytvořit doručovací vektor), aby se nezachytávala v krevním řečišti, nebyla předčasně rozštěpena enzymy, aby se dostala do cílových buněk a tam se navíc úspěšně rozbalila a předala nesenou informaci.

Navržení vhodných vektorů není jednoduchá záležitost z důvodu komplexnosti celého procesu. Jedním z kritérií účinnosti vektoru je jeho schopnost sbalit (zkondenzovat) molekulu DNA do nanometrového komplexu, a případně ji z daného komplexu po změně vnějších podmínek (pH, koncentrace iontů) zase uvolnit. NVGT vektory většinou nesou kladný náboj, interagují se záporně nabitými fosfátovými skupinami DNA, neutralizují je, a tím indukují kondenzaci. Přesný mechanismus kondenzace (postupná versus náhlá, čistě elektrostatická či spojená s hydrofóbními interakcemi, atd.) záleží na použitém kondenzatoru a není pro mnoho z nich ještě znám.

V praxi se pro určení mechanismu a konečného stavu nanostruktury používá např. kryoelektronová mikroskopie, rozptyl světla či rychlá a citlivá fluorescenční mikroskopie. V případě vzorků středně dlouhých a krátkých DNA řetězců, které nejdou z důvodů limitovaného rozlišení fluorescenční mikroskopie vizualizovat a jež mají příliš malou koncentraci pro rozptyl světla, je pro určení mechanismu třeba použít alternativních metod. Jednou z nich je fluorescenční korelační mikroskopie (FCS).

Molekula DNA sama o sobě nefluoreskuje. Abychom ji mohli měřit pomocí fluorescenčních metod, je třeba ji nejprve označit. Existují dvě možnosti: pomocí kovalentně vázaných fluoroforů, které se napevno zabudují do struktury DNA (značené nukleotidy), anebo častěji pomocí námi používaných interkalačních barviv. Fluorescence interkalačního barviva je ve vodě velmi potlačena, výrazně vzroste až po vmezezení planární struktury barviva mezi báze do šroubovice DNA. Výhodou interkalačního značení je jeho jednoduchost – barvivo se jednoduše přidá do roztoku libovolné DNA.

Jak bylo zmíněno v předchozí přednášce, FCS je metoda vhodná pro měření mobility a koncentrace fluorescenčně značených molekul ve vodném prostředí při nízkých (nanomolárních) koncentracích. Protože při kondenzaci dochází ke změně terciární struktury DNA, zejména k jejímu sbalení a tím i zmenšení hydrodynamického poloměru a zvětšení mobility, metoda FCS je vhodná pro monitorování kondenzačního procesu (Obr.1)<sup>2,3</sup>.

Prvním krokem měření je nalezení vhodného interkalačního barviva. Některá barviva totiž ovlivňují konformaci DNA, případně dostatečně nesvítlí při nízkých koncentracích. Z dostupných barviv ethidium bromide, propidium bromide, DAPI, YOYO, etc...se nejvíce osvědčilo barvivo PicoGreen.

Druhým krokem je proměření kondenzační titrační křivky. K obarvenému roztoku DNA se postupně přidává kondenzor a pozoruje se změna korelačních křivek. Kondenzace se projevuje zkracováním difusního času a snižováním zjevného počtu částic (zvyšování amplitudy). Snižování zjevného počtu částic je způsobeno omezením vnitřních pohybů řetězce. Typické korelační křivky na začátku a na konci kondenzace jsou uvedeny na Obr.2<sup>4</sup>.

Dobrý kondenzor je obecně ten, který vytvoří kompaktnější finální nanostrukturu a při nižších celkových koncentracích. Z testovaných kondenzorů vykazuje nejlepší výsledky N<sup>4</sup>,N<sup>9</sup>-Dioleoylspermine<sup>5,6</sup>.

Třetím krokem je identifikace mechanismu kondenzace. Zde se kromě standardní FCS používá její modifikace, tzv. časově rozlišená FCS (FLCS). Kromě změn počtu částic, difusního času a intenzity umožňuje měřit změnu doby života excitovaného stavu a odlišit od sebe částice s různými dobami dohasínání.

Experimenty ukázaly, že během kondenzace dochází jednak k uvolňování interkalačního barviva, jednak ke zkracování doby života excitovaného stavu neuvolněného barviva (Obr.3), což je způsobeno změnou uspořádání jeho mikrookolí – ve více stočeném DNA řetězci je interkalační barvivo vytlačováno z optimální pozice. Důsledek je ten, že fluorescenčně označená volná a zkondenzovaná DNA mají jinou dobu života excitovaného stavu, a dají se tak pomocí FLCS sledovat odděleně.

Zda se jedná při kondenzaci o postupný či náhlý proces, tj. sbaluje-li se molekula celá najednou či po částech, není možné klasickou FCS určit. Signál je totiž zprůměrován přes mnoho událostí, a tak nejsme schopni určit, zda se v podmínkách rovnováhy mezi sbalenou a kondenzovanou formou vyskytují v roztoku částice částečně sbalené nebo směs rozbalených a sbalených částic. Pomocí FLCS jsme však schopni od sebe odlišit signál pocházející z různých konformací, a tím i určit mechanismus sbalení<sup>7</sup>. V případě kondenzoru sperminu se jedná o náhlý proces (all-or-none transition), v případě HTAB o postupné sbalení<sup>8</sup>.

Shrnu-li výše uvedené řádky, metoda FCS se velmi osvědčila pro sledování kondenzačního procesu DNA, pro určení kvality jednotlivých kondenzorů a pro určení mechanismu kondenzace.

(1) Bloomfield, V. A. *Biopolymers* **1997**, 44, (3), 269-82.

(2) Kral, T.; Hof, M.; Langner, M. *Biol. Chem.* **2002**, 383, (2), 331-335.

(3) Kral, T.; Langner, M.; Benes, M.; Baczynska, D.; Ugorski, M.; Hof, M. *Biophys. Chem.* **2002**, 95, (2), 135-144.

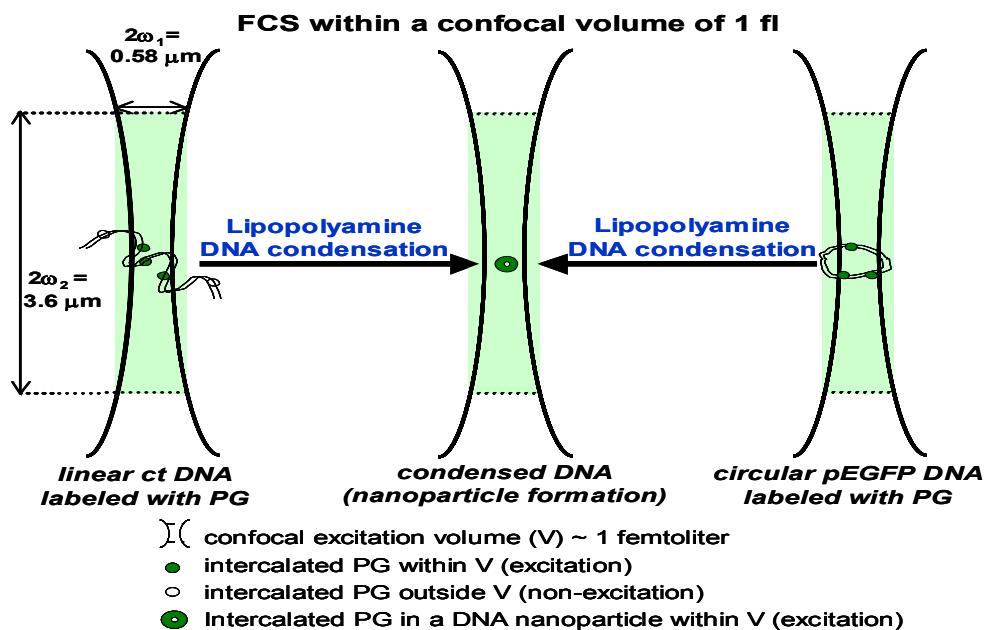
(4) Kral, T.; Benda, A.; Hof, M.; Langner, M., Some aspects of DNA condensation observed by fluorescence correlation spectroscopy. In *Review in Fluorescence 2005*, XXIV ed.; Geddes, C. D.; Lakowicz, J. R., Eds. 2005; Vol. Annual volumes 2005.

(5) Adjimatera, N.; Benda, A.; Blagbrough, I. S.; Langner, M.; Hof, M.; Kral, T., Fluorescence correlation spectroscopic studies of a single lipopolyamine-DNA nanoparticle. In *Fluorescence of supermolecules, polymers and nanosystems*, Berberan-Santos, M. N., Ed. 2006.

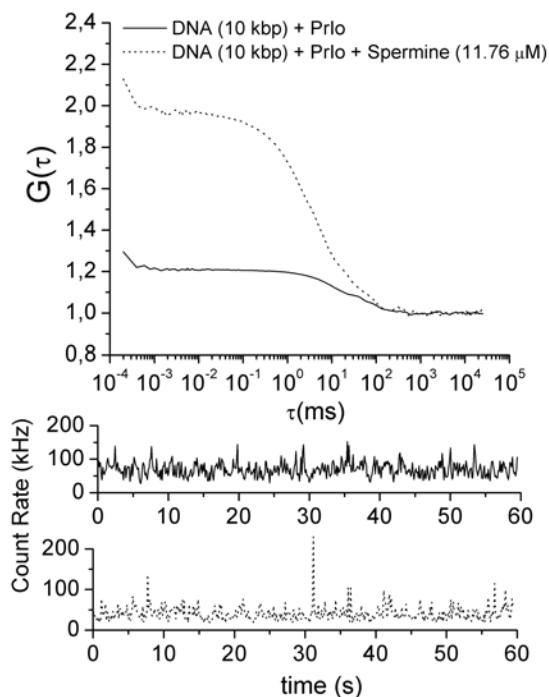
(6) Adjimatera, N.; Kral, T.; Benda, A.; Hof, M.; Blagbrough, I. S. *Journal of American Chemical Society* **2006**, submitted to.

(7) Humpolickova, J.; Stepanek, M.; Kral, T.; Benda, A.; Prochazka, K.; Hof, M. *J Fluoresc* **2008**.

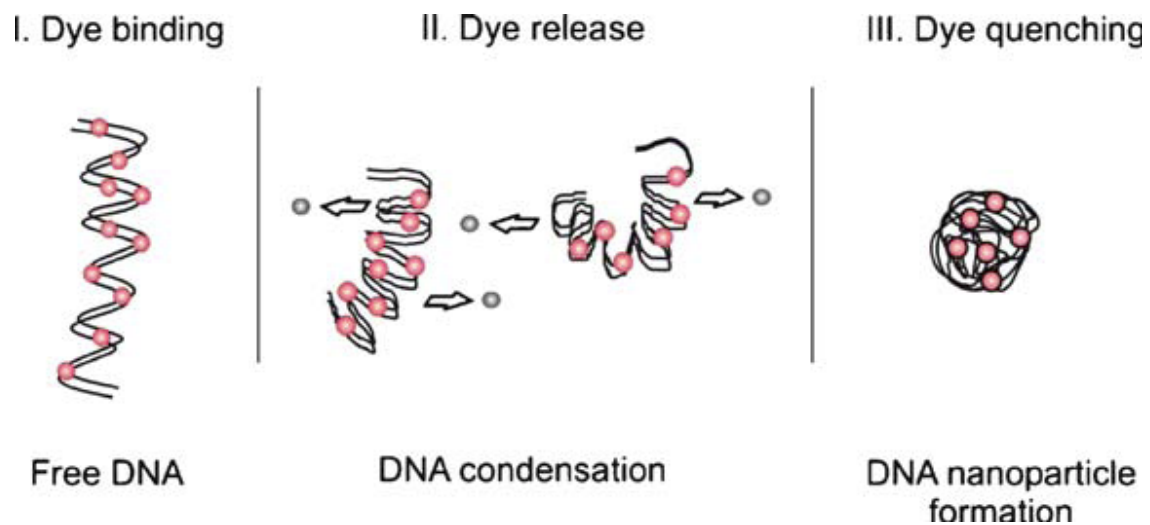
(8) Humpolickova, J.; Benda, A.; Sykora, J.; Machan, R.; Kral, T.; Gasinska, B.; Enderlein, J.; Hof, M. *Biophys. J.* **2008**, 94, (3), L17-L19.



Obr.1 Schématické znázornění měření kondenzace DNA pomocí FCS. Volná pomalu se pohybující DNA molekula, o velikosti rovné či větší než detekční konfokální objem, se vlivem kondenzorů sbalí do rychle se pohybující nanočástice.



Obr.2 Typické autokorelační křivky a časové vývoje intensity pro volnou a zkondensovanou DNA. Korelační křivka volné DNA má nižší amplitudu, delší difusní čas a vyšší průměrnou intensitu než zkondensovaná molekula.



Obr.3 Schématické znázornění vývoje fluorescenčního značení v průběhu kondenzace. Interkalační barvivo se nejdříve naváže na volnou DNA (I). V průběhu kondenzace je částečně vypuzeno z vazebných míst z důvodů změny konformace DNA (II). Po vzniku nanočástice je zbylé barvivo zhášeno vlivem změny uspořádání vazebného místa.