

SEMMELWEIS EGYETEM
DOKTORI ISKOLA

Ph.D. értekezések

3174.

KRETZER BALÁZS DÁVID

Celluláris és molekuláris biofizika
című program

Program- és témavezető: Dr. Kellermayer Miklós, egyetemi tanár

DNS-TMPyP kölcsönhatás nanomechanikai vizsgálata

Doktori értekezés

Kretzer Balázs Dávid

Semmelweis Egyetem
Elméleti és Transzlációs Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Kellermayer Miklós, DSc., egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Kovács Mihály, DSc., egyetemi tanár
Dr. Müllner Nándor, egyetemi docens

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Alpár Alán, DSc., egyetemi tanár

Tagok: Dr. Kovács Mihály, DSc., egyetemi tanár

Dr. Cervenák László, tudományos tanácsadó

Budapest
2024

Tartalomjegyzék

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	4
1. BEVEZETÉS	5
1.1. EGYMOLEKULA VIZSGÁLATI MÓDSZEREK	5
1.1.1. Lézercsipesz	5
1.1.1.1. Történelmi háttér	6
1.1.1.2. Geometriai optikai közelítés.....	6
1.1.1.3. Dipólus közelítés	8
1.1.1.4. Erőmérés	9
1.1.1.5. Fluoreszcens mikroszkópiával kombinált lézercsipesz	9
1.1.2. Atomerő-mikroszkópia (AFM).....	10
1.2. A DNS NANOMECHANIKÁJA	11
1.2.1. Biopolimerek mechanikáját jellemző paraméterek.....	11
1.2.2. Erő-távolság görbe	12
1.2.3. Polimermodellek.....	14
1.2.3.1. Szabadon csatolt lánc („freely jointed chain”; FJC).....	14
1.2.3.2. Féregszerű lánc („worm-like chain”; WLC)	14
1.2.3.3. Csavarható féregszerű lánc („twistable worm-like chain”; tWLC).....	15
1.3. DNS-KÖTŐ MOLEKULÁK	16
1.3.1. Interkalátorok.....	17
1.3.2. A DNS árkaiba kötő molekulák	18
1.3.3. Egyszálú DNS-t kötő molekulák	19
1.3.4. Többféle kötődést mutató molekulák	19
1.4. A TMPyP	19
1.4.1. TMPyP alkalmazásai.....	20
1.4.2. Molekulasokaságon végzett kutatások eddigi eredményei	21
1.5. A MIKROFLUIDIKAI CELLÁBAN FELLÉPŐ DIFFÚZIÓ	22
2. CÉLKITŰZÉSEK	26
3. MÓDSZEREK.....	28

3.1. MINTÁK ÉS OLDATOK	28
3.2. LÉZERCSIPESSZEL VÉGZETT KÍSÉRLETEK MÓDSZEREI.....	28
3.2.1. DNS-erőgörbék mérése.....	30
3.2.2. Molekuláris erőlépcső.....	32
3.2.3. Egyszálú DNS nyújtása.....	32
3.2.4. Koncentrácioprofil feltérképezése	34
3.2.5. Koncentrációlépcső.....	36
3.3. ATOMERŐ-MIKROSKÓPIÁVAL (AFM) VÉGZETT KÉPAKOLTÁS	37
3.4. A KÖTÉSI FOLYAMATOK KINETIKAI ELEMZÉSE	39
3.5. ADATELEMZÉS ÉS VIZUALIZÁCIÓ	39
4. EREDMÉNYEK.....	40
4.1. A DNS-TMPyP ÁLTAL ALKOTOTT KOMPLEX ERŐ-TÁVOLSÁG GÖRBÉI	40
4.1.1. Az erőgörbék TMPyP-koncentrációtól, NaCl-koncentrációtól és húzási sebességtől való függése	40
4.1.2. Nanomechanikai részletek parametrizálására létrehozott modell	45
4.1.2.1. A nanomechanikai modell paraméterei	48
4.1.3. Differenciált erőgörbék.....	53
4.1.4. eWLC modell illesztése az erőgörbékre	55
4.1.5. Mechanikai reverzibilitás vizsgálata.....	58
4.1.6. Reprodukálhatóság vizsgálata	62
4.1.7. Egyszálú DNS-erőgörbék.....	64
4.2. TMPyP-HATÁS ATOMERŐ-MIKROSKÓPIÁVAL (AFM) TÖRTÉNŐ VIZSGÁLATA.....	66
4.3. A MOLEKULÁRIS ERŐLÉPCSŐ KINETIKAI ANALÍZISE	68
4.4. KONCENTRÁCIÓPROFIL MENTÉN VÉGZETT KÍSÉRLETEK	70
4.4.1. A koncentrácioprofil karakterizálása.....	70
4.4.2. A koncentrácioprofil alkalmazása a perturbációs kinetikai kísérletben (TMPyP-koncentrációugrás)	74

5. MEGBESZÉLÉS.....	76
5.1. A KETTŐSSZÁLÚ DNS-TMPyP KOMPLEX NANOMECHANIKÁJA	76
5.1.1. A kettősszálú DNS megnyúlása a TMPyP bekötődésének hatására	76
5.1.2. A TMPyP-bekötődés hatása a kettősszálú DNS nyújthatóságára	78
5.1.3. A TMPyP-bekötődés hatása a túlnyújtási átmenetre.....	79
5.2. DNS-TMPyP KÖTÉS KINETIKÁJA	81
5.3. A TMPyP EGYSZÁLÚ DNS-T KÖTŐ TULAJDONSÁGA	82
5.4. A MIKROFLUIDIKAI KONCENTRÁCIÓPROFIL EGYMOLEKULA KÍSÉRLETEKBEN TÖRTÉNŐ ALKALMAZHATÓSÁGA.....	82
6. KÖVETKEZTETÉSEK	85
7. ÖSSZEFOGLALÁS	87
8. SUMMARY	88
9. IRODALOMJEGYZÉK.....	89
10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE	107
10.1. A DISSZERTÁCIÓHOZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK	107
10.2. A DISSZERTÁCIÓHOZ NEM KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK.....	107
11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	108

Rövidítések jegyzéke

ActD	aktinomicin-D
AFM	atomierő-mikroszkópia
APD	lavina fotodióda ("avalanche photodiode")
DNS	dezoxiribonukleinsav
EMCCD	elektronsokszorozó töltés-csatolt eszköz ("electron multiplying charge-coupled device")
eWLC	nyújtható féregszerű lánc ("extensible worm-like chain")
FJC	szabadon csatolt lánc ("freely jointed chain")
GC	guanin-citozin
HCl	hidrogén-klorid
NaCl	nátrium-klorid
PDT	fotodinamikus terápia („photodynamic therapy”)
PLL	poli-L-lizin
poli(dG-dC)	poli-(deoxiguanilát-deoxicitidilát) sav
SxO	SYTOX Orange
STED	stimulált emisszió-depléción ("stimulated emission depletion")
TIRF	teljes belső visszaverődéses fluoreszcencia ("total internal reflection fluorescence")
TMPyP	tetrakis(4-N-metil)-piridil-porfin
TRIS	tris-(hidroximetil)-aminometán
Tween-20	polioxietilén(20)-szorbitán-laurát
tWLC	csavarható féregszerű lánc ("twistable worm-like chain")
UV-VIS	ultraibolya-látható (spektroszkópia)
WLC	féregszerű lánc ("worm-like chain")
YO	oxazol sárga

1. Bevezetés

A DNS támadáspontú molekulákat, különösen a terápiákban betöltött szerepük miatt kiterjedten vizsgálják. E kutatásokat nagyban elősegíti az egymolekula vizsgálati technikák elterjedése és fejlődése, melyek lehetővé teszik a folyamatok molekuláris szintű megismerését és megértését. A porfirinek és származékaikat nagy tudományos érdeklődés övezi széleskörű – köztük DNS-kötő – tulajdonságaiknak és felhasználhatóságuknak köszönhetően. Doktori munkámban egy porfirinmolekula (TMPyP; tetrakis(4-N-metil)-piridil-porfin) DNS-hez történő kötődését tanulmányoztam egymolekula vizsgálati módszerekkel.

E fejezetben elsőként a főbb egymolekula vizsgálati eszközöket ismertetem, külön kiemelve a lézercsipeszt, mellyel kísérleteim jelentős hányadát végeztem. Ezt követően kitérek a DNS mechanikai tulajdonságaira, majd bemutatom, hogyan módosítják azt az egymolekula technikával vizsgált, DNS-sel kölcsönható molekulák. Továbbá röviden bemutatom az általam vizsgált TMPyP-molekula jellemzőit, felhasználását, és az eddigi ismereteinket DNS-kötő tulajdonságairól. Végezetül irodalmi áttekintést adok a mikrofluidikával kombinált lézercsipesz mérések során felmerülő problémákról, illetve lehetőségekről, melynek metodikai jellemzésével szintén doktori munkám keretében foglalkoztam.

1.1. Egymolekula vizsgálati módszerek

Az egymolekula vizsgálati módszerek használatával lehetőség nyílik arra, hogy egyetlen molekulát vizsgáljunk megismerve annak mechanikáját és szerkezetét. E módszerek nagy előnye, hogy az adott molekula olyan tulajdonságairól is információt kaphatunk, melyek egy molekulásokaságon végzett vizsgálat során az átlagolás következtében elvesznének. További előny, hogy e módszerekkel maga a molekula nagy precizitással, mechanikailag manipulálható, így képet kaphatunk például arról is, hogy a molekula mozgása, nyújtása, valamint csavarása révén milyen szerkezeti változások játszódnak le benne.

1.1.1. Lézercsipesz

A lézercsipesz – vagy más néven optikai csipesz – egy olyan lézertechnikán alapuló eszköz, mellyel különböző, mikroszkopikus méretű, dielektromos részecskéket

csapdázhatunk, illetve mozgathatunk. A módszer alapját képező jelenség a csapdázandó részecskével kölcsönható fotonok impulzusváltozásának következtében fellépő erőkön alapul.

1.1.1.1. Történelmi háttér

Arról, hogy a fény képes lehet nyomást kifejteni először Johannes Kepler írt 1619-ben [1]. Feltételezte, hogy a fénynyomással magyarázható az, hogy az üstökösök csóvája minden esetben a Nappal ellenkező irányba mutat. A fény e tulajdonságának elméleti levezetése James Clerk Maxwellnek köszönhető [2], amit John Henry Poynting fejlesztett tovább [3,4]. Kísérleti úton ezt a 20. század elején Pyotr N. Lebedevnek [5], Ernest F. Nicholsnak és Gordon F. Hullnak sikerült bizonyítania [6]. A hatás azonban olyan elenyésző, hogy a gyakorlati alkalmazhatósága jelentéktelennek bizonyult [7].

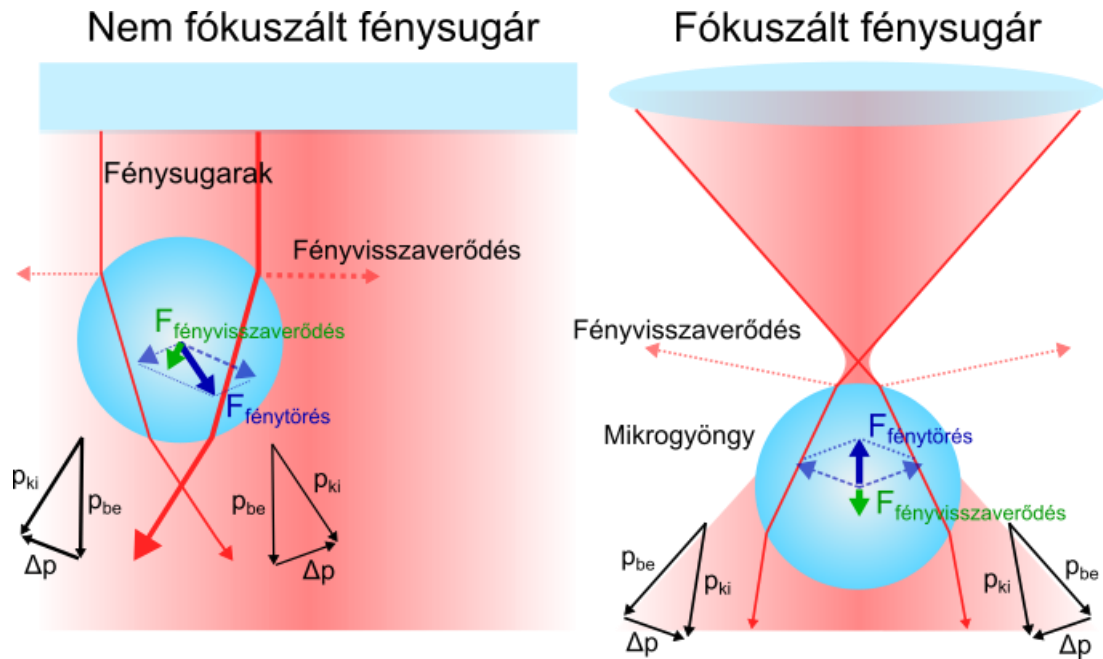
A fordulatot a lézer feltalálása, majd Arthur Ashkin 1970-es felfedezése hozta, melynek során demonstrálta, hogy keskeny nyalábban fókuszált lézerfény segítségével lehetséges mikrométer nagyságú dielektromos részecskék mozgatása [8]. E felfedezés vezetett végül az első lézercsipeszek megalkotásához [7,9–11]. Arthur Ashkin 2018-ban kapott Nobel-díjat „az optikai csipesz megalkotásáért és a biológiai rendszerekben történő felhasználásáért” [12].

1.1.1.2. Geometriai optikai közelítés

A lézercsipesz részecskéket csapdázó hatásának leírásánál két esetet kell figyelembe venni, amit a csapdázandó részecskének a megvilágító fény hullámhosszához képest vett mérete határoz meg, továbbá a közeg törésmutatója az alábbi összefüggés szerint, mely a ξ méretparamétert adja meg [11]:

$$\xi = 2\pi a n_m / \lambda_0 , \quad (1)$$

ahol a a részecske karakterisztikus mérete, n_m a közeg törésmutatója és λ_0 a csapdázó lézerfény hullámhossza vákuumban. Amennyiben $\xi \gg 1$, akkor a geometriai optika használatával leírható a csapdázás. Ebben az esetben a csapdázandó tárgyat érő lézerfényt fotonok összességéként lehet tekinteni. Ezek a beeső fotonok megtörhetnek, visszaverődhetnek, vagy elnyelődhetnek a tárggyal való kölcsönhatás során, aminek következtében megváltozik az impulzusuk. Az impulzusmegmaradás értelmében ezen impulzusváltozások eredőjét a csapdázandó tárgy ellenkező előjelű és azonos nagyságú impulzusváltozásának kell kísérnie (1. ábra).



1. ábra. Fókuszálatlan és fókuszált, Gauss intenzitásprofilú lézernyalábok csapdázó hatásának sematikus rajza geometriai optikai közelítéssel, $n_{\text{gyöngy}} > n_{\text{közeg}}$ esetében [10,13]. A nyalábból szemléltetesként kiemelt fénysugarak pirossal, az impulzusuk és annak fénytörés következtében történő megváltozása feketével, míg a fénytörés és a fényvisszaverődés következtében gyöngyre ható erők rendre kézzel és zölddel vannak jelölve. A feltüntetett fénysugarak eltérő intenzitását az eltérő vonalvastagság szemlélteti.

A fénytörés következtében fellépő erők egy Gauss intenzitásprofilú lézernyaláb esetében a nagyobb intenzitás felé, illetve a sugár terjedési irányába mozgatják a tárgyat, míg a fényvisszaverődés és az abszorpció miatt kialakuló erők a tárgyat a kisebb intenzitás felé, illetve szintén a sugár terjedési irányába mozgatják kisebb mértékben ($n_{\text{tárgy}} > n_{\text{közeg}}$). Ennek eredményeként a tárgy egy fókuszálatlan Gauss intenzitásprofilú lézernyalábnál, noha a középponti tengely irányába mozog, ezzel egyidőben annak terjedési irányában tovább halad, tehát nem jöhet létre csapdázás. Ez kiküszöbölhető két, egymáshoz képest ellentétes irányú nyalábot kibocsátó lézer segítségével. A csapdázás azonban megoldható egyetlen lézernyaláb segítségével is, ha azt nagy numerikus apertúrájú lencsével fókuszáljuk. Ebben az esetben a fénytörés következtében fellépő erők a tárgyat mindig a fókuszpontba próbálják mozgatni, míg a fényvisszaverődés következtében lévő erők továbbra is a fény terjedési irányába hatnak. Mivel stabil állapot

esetében a tárgyra ható erők kiegyenlítik egymást, az egyensúlyi pont így kicsivel a fókusz alatt található (1. ábra) [10,13].

1.1.1.3. Dipólus közelítés

Abban az esetben ha $\zeta \ll 1$ és $|n_{t,k}|\xi \ll 1$, ahol $n_{t,k}$ a tárgynak a közegre vonatkozó relatív törésmutatója, teljesülnek a Rayleigh-szórás feltételei és a tárgy pontdipólusnak tekinthető [14]. Ekkor az $\mathbf{E}$ elektromos térerősség, a $\mathbf{p}$ indukált dipólusmomentum, valamint annak U energiája a következőképp írható le:

$$\mathbf{E}(\mathbf{r}, t) = \text{Re}[\mathbf{E}_0(\mathbf{r})e^{i\omega t}] \quad (2)$$

$$\mathbf{p}(\mathbf{r}, t) = \alpha \mathbf{E}(\mathbf{r}, t) \quad (3)$$

$$U = -\mathbf{p}(\mathbf{r}, t) \cdot \mathbf{E}(\mathbf{r}, t) = -\alpha \mathbf{E}(\mathbf{r}, t) \cdot \mathbf{E}(\mathbf{r}, t), \quad (4)$$

ahol Re a valós rész, $\mathbf{r}$ a helyvektor, ω a körfrekvencia és t az idő jelölésére szolgál. A lézernyaláb intenzitása I arányos az elektromos térerősség amplitúdójának négyzetével.

$$I = |\langle \mathbf{S}(\mathbf{r}) \rangle| = \frac{1}{T} \int_0^T |\mathbf{S}(\mathbf{r})| dt = \frac{1}{2} c n_{\text{közeg}} \epsilon_0 |\mathbf{E}_0|^2, \quad (5)$$

ahol $\mathbf{S}$ a Poynting-vektort, $\langle \rangle$ az időátlagolást, továbbá c a fénysebességet vákuumban, $n_{\text{közeg}}$ a közeg törésmutatóját, ϵ_0 pedig a vákuum permittivitását jelöli [15]. Gauss-nyaláb esetén, ahol inhomogén az elektromágneses tér olyan erő lép fel, mely a tárgyat – pozitív polarizálhatóság esetén – a nyaláb nagyobb intenzitású része felé vonzza, hogy minimalizálja az indukált dipólus energiáját. Ez az erő a fényintenzitás gradiensével arányos [13]:

$$\begin{aligned} F_{\text{grad}} &= -\langle (-\alpha \mathbf{E}(\mathbf{r}, t) \cdot \nabla) \mathbf{E}(\mathbf{r}, t) \rangle = \frac{\alpha}{2} \nabla \langle \mathbf{E}^2(\mathbf{r}, t) \rangle = \frac{\alpha}{4} \nabla |\mathbf{E}_0|^2 = \\ &= \frac{\alpha}{2 c n_{\text{közeg}} \epsilon_0} \nabla I(\mathbf{r}) \end{aligned} \quad (6)$$

A másik, tárgyra ható erő a szórási erő, mely a lézersugár terjedési irányába próbálja mozgatni a csapdázandó tárgyat.

$$F_{\text{szórási}} = \frac{n_{\text{közeg}} \sigma_{\text{ext}}}{c} \langle \mathbf{S}_i \rangle = \frac{n_{\text{közeg}} (\sigma_{\text{absz}} + \sigma_{\text{szórási}})}{c} \langle \mathbf{S}_i \rangle \quad (7)$$

A σ_{ext} , σ_{absz} és $\sigma_{szórási}$ rendre az extinkciós, abszorpciós és a szórási keresztmetszeteket jelölik. Tehát összefoglalva, ebben az esetben elmondható, hogy a gradiens erő a csapdázandó részecskét a sugár fókusza felé próbálja mozgatni, ellensúlyozva a szórási erő hatását, ami a sugár terjedési iránya mentén próbálja eltolni.

1.1.1.4. Erőmérés

A csapda középpontját jellemző egyensúlyi pont körüli kis kitérések esetében a részecskére ható erő arányos az elmozdulással. Mivel ez az erő (F) ellentétes irányú az elmozdulással (x), a csapda egyensúlyi pontjába próbálja visszahúzni a részecskét, ezért az optikai csapda e tartományon belül felfogható egy virtuális lineáris rugóként [13,16,17].

$$F = -kx \quad (8)$$

A k arányossági tényező az optikai csapda merevségét (rugóállandóját) jelenti. Megfelelő kalibráció után, k ismeretében tehát a lézercsipesz erőmérésre is alkalmas a csapdázott részecske külső erők hatására történő, kis elmozdulásai alapján [13,16,17].

1.1.1.5. Fluoreszcens mikroszkópiával kombinált lézercsipesz

A lézercsipesz kombinálható fluoreszcens mikroszkópiával, ezzel lehetőséget teremtve arra, hogy az erőméréssel egy időben nagy felbontású képet is alkothassunk a vizsgálandó molekulákról, folyamatokról. Ez nagyban segíthet a kötőhelyek és a kötési módok feltérképezésénél, reakciókinetikai folyamatok nyomon követésénél és erőhatásra történő szerkezeti átalakulások részletesebb vizsgálatánál. Ennél a technikánál számos mikroszkópiai eljárás alkalmazható, mint például epifluoreszcens, TIRF, konfokális és STED mikroszkópia [13].

Ezen eszközökben a csapdázó lézerek mellett egy fluoreszcencia gerjesztő lézer is alkalmazásra kerül, mellyel egy adott hullámhosszon gerjeszthetők a fluoreszcens molekulák, majd az emittált fotonok az alkalmazott technikának megfelelő detektorokkal (EMCCD („Electron Multiplying Charge-Coupled Device”), lavina (avalanche) fotodióda (APD)) érzékelhetők. Így akár egyetlen fluorofór által kibocsátott fény is érzékelhető [13].

A minta fluoreszcens jelölése is számos lehetőséget ad különböző vizsgálatok elvégzéséhez. Például más fluorofórok használatával elérhető a „többszínű” képalkotás is, ami hasznos lehet többféle kötőhely egyidőben történő detektálására [18] vagy adott

molekula specifikus jelölésével szerkezet-, vagy helyváltoztatásának nyomon követésére [19].

1.1.2. Atomierő-mikroszkópia (AFM)

Az atomierő-mikroszkópia egy pásztázó tűszondás mikroszkópai módszer, amely lehetővé teszi a nanométeres felbontású vizsgálatokat, információt szolgáltatva sejtek, vírusrészecskék vagy molekulák topográfiájával és más fizikai tulajdonságaival kapcsolatban.

A pásztázó alagútmikroszkópiát Heinrich Rohrer és Gerd Binnig találta fel 1981-ben. Munkájukért 1986-ban Nobel-díjat kaptak [20]. Ezt követően Binnig és munkatársai 1985-ben fejlesztették ki a pásztázó atomierő-mikroszkópiát [21]. Míg az előbbi módszer az alagúteffektuson alapszik és elektromosan vezetőképes minták esetében használatos, addig az AFM nagy előnye, hogy elektromosan nem vezető minta esetében is alkalmazható a topográfia feltérképezésére.

Az AFM tűszondája egy rugólapka, melynek végén egy rendkívül hegyes tű található. A pásztázás, vagy erőmérés során történő változásokat a rugólapka hátoldalára vetített, majd onnan visszavert, pozícióérzékeny fotodiódára érkező lézersugár által lehet detektálni.

Képalkotás során, biológiai minták esetében leginkább a non-kontakt, vagy tapogató üzemmód a használatos. Ilyenkor a rugólapkát a sajátfrekvenciájához közeli frekvencián rezgetjük a minta felett egy beállított amplitúdóval. A tű hegye és a minta közötti atomi kölcsönhatások révén a rugólapka sajátfrekvenciája eltolódhat, ami amplitúdóváltozást okoz, mely eltérést az előbb említett fotodiódán detektáljuk. A rugólapkán keltett kényszerrezgés történhet többek között piezoelektromos módon, illetve a rugólapkára érkező lézernyomás segítségével is. Ez utóbbi esetben a rezgetés a rugólapka felhevítésével jön létre. Egy visszacsatoló rendszer azonban olyan távolságban igyekszik tartani a rugólapkát a minta felszínétől, hogy az előre beállított amplitúdó állandó maradjon. Így a rugólapka helyzetének változásaiból – a megfelelő program felhasználásával – kirajzolódik a minta topográfiai képe.

Az AFM felhasználható sejtek, vírusok és molekulák topográfiájának meghatározására [22–31]. Ezen felül az AFM erőmérésre is alkalmas kontakt módban. A minta tűvel történő nyomásából, vagy az adott molekulának a húzásából származó erő-távolság görbéből következtetni lehet annak mechanikai tulajdonságaira [22,23,31,32].

1.2. A DNS nanomechanikája

A dezoxiribonukleinsav (DNS) – a genetikai információ tárolása révén – kitüntetett szereppel bír a molekuláris tudományokban. Felépítésében is egy különleges polimerről van szó: két polinukleotid láncból áll (kettősszálú DNS esetében), melyek egymás köré tekeredve kettős spirált alkotnak. A láncon belüli nukleotidok kovalensen kapcsolódnak egymáshoz, míg a komplementer szálon lévő nukleotidok hidrogénkötésekkel kapcsolódnak a bázisokon keresztül.

A DNS amellett, hogy csupán 2 nm széles (kettős szál esetén), rendkívül hosszú is lehet. Érdekességgéppen megemlítendő, hogy az ember esetében ~2 métert adna ki a DNS-állomány összhossza (egyetlen sejt esetében) [33]. Mivel a molekula rendkívül kis térrészben helyezkedik el, ezért elengedhetetlen, hogy a sejtmag belsejében folyamatosan hajlításon, csavaráson és nyújtáson menjen keresztül számos folyamat során, mint például a DNS-csomagolás vagy a molekuláris motorok által végzett replikáció és transzkripció.

Ezen mechanikai hatások eredményét ráadásul tovább befolyásolhatja a DNS bázisösszetétele, az ionerősség, valamint DNS-kötő fehérjék és gyógyszermolekulák.

Ennek okán a DNS nanomechanikai tulajdonságainak és azok különböző környezeti hatásokra bekövetkező változásainak vizsgálata kulcsfontosságú a DNS-t érintő molekuláris folyamatok részletesebb és teljesebb körű megértéséhez.

1.2.1. Biopolimerek mechanikáját jellemző paraméterek

A polimerláncok tulajdonságainak megértése során fontos definiálni néhány alapvető mennyiséget, melyek segítenek abban, hogy jobban megértsük a biopolimerek mechanikai viselkedését. Ezek a mennyiségek többek között a vég-vég távolság, a kontúrhossz, a perzisztenciahossz és a nyújtási modulus.

A polimer végpontjai közötti távolság az ún. vég-vég távolság, míg a kontúrhossz a polimer szál teljes hosszát jelenti. Ez a két mennyiség akkor egyezik meg, ha a szál teljesen kinyújtott állapotban van. A gyakorlatban legtöbbször azonban a biopolimerek összehajtott, összetekeredett állapotban vannak, így a vég-vég távolságuk rövidebb, mint a kontúrhosszuk.

A perzisztenciahossz a polimer hajlítási merevségétől függő mennyiség. Azt fejezi ki, hogy a szál mentén mekkora elmozdulás az, amelynél a szál iránya már számottevően megváltozik (lásd még: 1.2.3.2. fejezet). A perzisztenciahosszuknál

rövidebb kontúrhosszú szálakat merevnek tekinthetjük, míg a jóval nagyobb kontúrhosszú polimerek flexibilis szálként értelmezhetők.

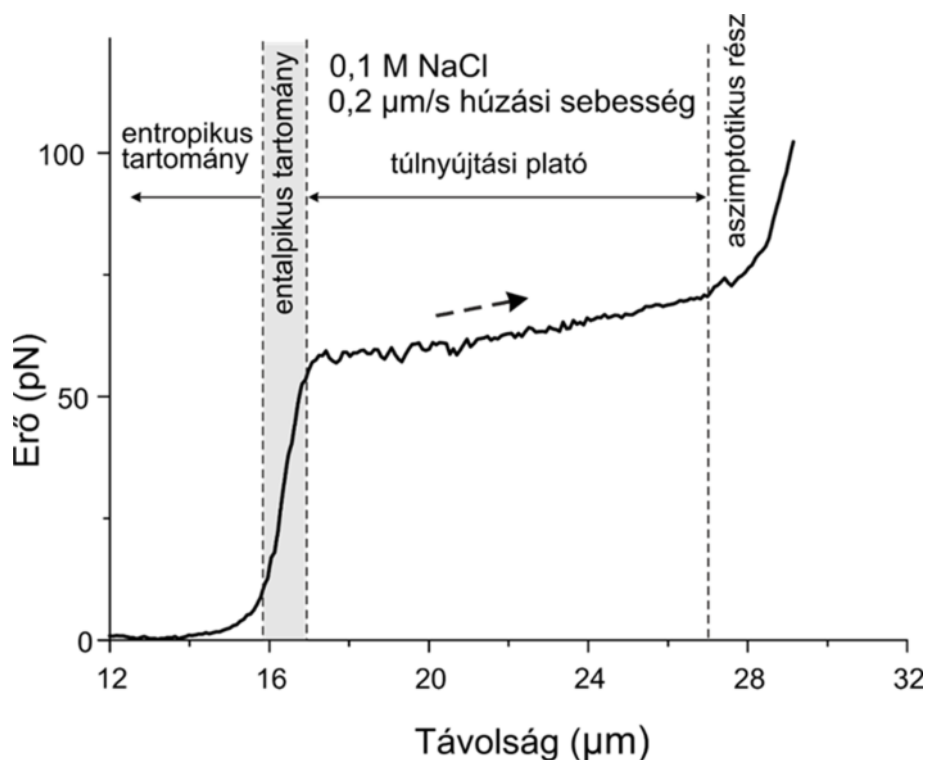
A biopolimerek nyújtási modulusa az alkalmazott erő hatására történő megnyúlással, illetve deformációval szembeni ellenállást hivatott számszerűsíteni. Más szóval megmutatja, hogy a polimer mennyire nyúlik meg tengelyirányú feszítőerő hatására. A nyújtási modulus analóg a Young-modulussal, azonban mértékegysége – az eWLC („extensible Worm-Like Chain”) modellből is következően (lásd: 1.2.3.2. fejezet) – Newton, és nem Pascal. Ennek oka az, hogy a nyújtási modulus egy tengelyirányú feszítőerő és a polimerszál megnyúlása között teremt kapcsolatot, jellemezve a szál hosszanti irányú merevségét, és nem mechanikai feszültséget vesz alapul a relatív deformáció leírására, tehát nem veszi figyelembe a polimerszál keresztmetszetét. Elmondható tehát, hogy a dolgozatban szereplő nyújtási modulus a Young-modulussal szemben egy specifikusabb mennyiség a polimerszálak vizsgálatára, azonban szerepük hasonló, innen az analógia.

1.2.2. Erő-távolság görbe

A lézercsipeszben a két gyöngy közé kifeszített DNS-t – vagy más polimert – az egyik gyöngy mozgatásával lehet megnyújtani. A két gyöngy közötti távolság ebben az esetben megegyezik a molekula vég-vég távolságával. A molekula által kifejtett ellenérőt a statikus gyöngyön lehet mérni a két gyöngy közötti távolság függvényében. Ezzel meghatározhatóvá válik az erő-távolság görbe, vagy rövidebben az erőgörbe, ami a kettősszálú DNS esetén az alábbiakban tárgyalt jellemzőkkel bír.

A kettősszálú DNS erőgörbéje 4 főbb tartományra osztható. Az első tartományban a DNS viselkedését termikus fluktuációk határozzák meg. A DNS ebben a tartományban egy szemiflexibilis rúdként modellezhető, mely végpontjainak egymáshoz viszonyított távolságát (vég-vég távolság) az említett fluktuációk csökkentik. Ezen hatások ellenében, a molekula nyújtása során kifejtett erő pN-os nagyságú, a tartomány megközelítőleg 5 pN-ig tart. A rugalmasság elsősorban entrópikus hatásoknak köszönhető, ezért ezt a tartományt entrópikus tartománynak nevezzük (2. ábra) [13,32].

10 pN-os nyújtóerő környékén az entalpiikus tartomány következik, melyben a megnyúlás és az erő közötti kapcsolat megközelítőleg lineáris. Ebben a tartományban, 30-35 pN-nál éri el a DNS a kontúrhosszát (2. ábra szürkével jelzett tartománya) [13,32].



2. ábra. A kettősszájú λ -DNS (λ -bakteriofág DNS-e) kísérletesen kapott erő-távolság görbéje 0,1 M NaCl-koncentrációnál és 0,2 $\mu\text{m/s}$ húzási sebességnél az erőgörbére jellemző tartományok feltüntetésével: entropikus tartomány, entálpikus tartomány, túlnyújtási átmenet, vagy más néven túlnyújtási plató és aszimptotikus rész [34].

A molekula további nyújtásával elérhető az ún. túlnyújtási átmenet, vagy túlnyújtási plató. Torzionálisan nem korlátozott DNS-szál esetében (a molekula szabadon elforoghat a lehorgonyozott végei körül) ez az átmenet ~ 65 pN-nál, ellenkező esetben ~ 110 pN-nál kezdődik, azonban ez függ az adott közeg sókoncentrációjától is [35,36]. Az átmenet során a molekula jelentősen, kontúrhosszán felül mintegy 70%-kal túlnyúlik a húzóerő minimális, néhány pN-os növekedése mellett (2. ábra) [37]. Ezalatt 3 folyamat játszódik le: i) a DNS egyik, nem gyöngyhöz kötött vagy egyszálú törés („nick”) következtében szabadvégű szála a hidrogénkötések felszakadása révén lefejtődik a komplementer szálról, így mechanikai denaturáció következtében két egyszálú DNS szakasz jön létre; ii) nem szabad szálvég esetében ún. olvadási buborék jön létre a két szál között a hidrogénkötések felszakadása következtében; iii) a két szál nem válik szét, a bázispárosodás megmarad, azonban a szálak kitekerednek, a DNS szerkezete megnyúlik, és az eredeti B-forma DNS úgynevezett S-formába alakul át [37]. E három folyamat

egyidejűleg jelen van a szál túlnyújtása során, azonban arányuk függ a DNS topológiájától, a sókoncentrációtól, továbbá a láncok nukleotid-összetételétől is [18].

A negyedik, aszimptotikus, vagy második entalpikus régiónak is nevezhető részen a DNS-molekula további megnyúlása újbóli, jelentős húzóerő-növekedés mellett érhető el. A két szálat néhány GC-gazdag régió tartja össze a túlnyújtási átmenet után (2. ábra).

1.2.3. Polimermodellek

1.2.3.1. Szabadon csatolt lánc („freely jointed chain”; FJC)

A szabadon csatolt lánc (FJC) esetében a szálat alkotó szegmensek egymáshoz képest függetlenül állhatnak a tér bármely irányában. A vég-vég távolság és erő közötti kapcsolatot ebben az esetben az alábbi összefüggés adja meg:

$$x = L_c \left[\coth \left(\frac{2FL_p}{k_B T} \right) - \frac{k_B T}{2FL_p} \right] \left(1 + \frac{F}{S} \right) \quad (9)$$

Itt x a vég-vég távolságot, L_c a kontúrhosszat, L_p a perzisztenciahosszat, F az erőt, S , a nyújtási modulust, k_B a Boltzmann-állandót és T a hőmérsékletet jelöli [37].

1.2.3.2. Féregszerű lánc („worm-like chain”; WLC)

A féregszerű lánc (WLC) modell a polimert egy rigid, de hajlítható szálként írja le (a Kratky-Porod polimermodell [38] folytonos változata). Ez a modell különösen alkalmas a merevebb polimerek leírására, ahol az egymást követő szegmensek egyfajta kooperativitást mutatnak: a közeli szegmensek megközelítőleg egymáshoz igazodnak, emiatt a szál folytonosnak tekinthető.

Egy L hosszúságú polimer esetében a $\mathbf{t}(s)$ érintővektor az $\mathbf{r}(s)$ pozícióban, a lánc mentén s távolságban a következőképpen írható fel [17]:

$$\mathbf{t}(s) = \frac{d\mathbf{r}(s)}{ds} \quad (10)$$

Az irány-autokorreláció függvény a WLC modell esetében exponenciális lecsengést mutat [39]:

$$\langle \mathbf{t}(0) \mathbf{t}(s) \rangle = \exp \left(-\frac{s}{L_p} \right), \quad (11)$$

ahol L_p a perzisztenciahosszat jelöli. A WLC modell a következőképp írja le az erő és megnyúlás közötti kapcsolatot [40]:

$$F = \left(\frac{k_B T}{L_p} \right) \left[\frac{1}{4(1 - x/L_c)^2} - \frac{1}{4} + \frac{x}{L_c} \right] \quad (12)$$

Az eWLC („extensible Worm-Like Chain”) modell a WLC továbbfejlesztése, amely már figyelembe veszi a polimerek hosszanti irányú rugalmasságát is. Emiatt ez a modell már nagyobb húzóerők esetében is jó leírást ad jelentősen megnyújtható szálak esetében, mint például amilyen a DNS.

Két elterjedt típusa is van az eWLC modellnek, amelyek nem sokban különböznek egymástól és mindkettő felhasználja a nyújtási modulust (S) a hosszanti irányú rugalmasság leírására. Az Odijk-féle modell [41]:

$$x = L_c \left[1 - \frac{1}{2} \left(\frac{k_B T}{F L_p} \right)^{\frac{1}{2}} + \frac{F}{S} \right] \quad (13)$$

és a módosított Marko-Siggia-féle modell [42]:

$$F = \left(\frac{k_B T}{L_p} \right) \left[\frac{1}{4 \left(1 - \frac{x}{L_c} + \frac{F}{S} \right)^2} - \frac{1}{4} + \frac{x}{L_c} - \frac{F}{S} \right] \quad (14)$$

1.2.3.3. Csavarható féregszerű lánc („twistable worm-like chain”; tWLC)

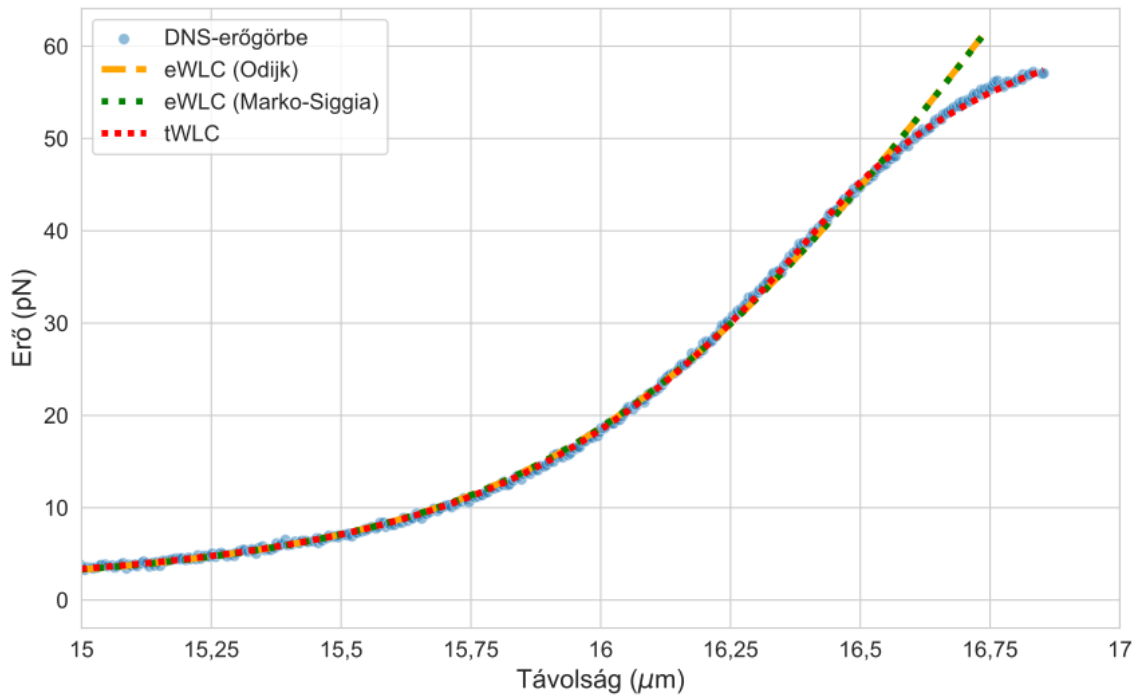
A teljesség igénye miatt megemlítendő még a csavarható féregszerű lánc modell (tWLC). Ebben a modellben a DNS spirális, rugalmas egységnek tekinthető, amely a feszültségre nyúlással és csavarodással reagál. Ez eltér a korábbi modellektől, mint például a nyújtható féregszerű lánc (eWLC), amely nem veszi figyelembe a DNS spirális szerkezetét és szekvenciáját. A tWLC modell így a DNS mechanikájának átfogóbb és pontosabb leírását nyújtja, amely a DNS korábban figyelmen kívül hagyott kulcsfontosságú fizikai jellemzőit is magában foglalja [43].

A modell jelentősége a közepesebb és magasabb erőknél figyelhető meg, mikor a DNS megnyúlását már nem lehet a szál csavarodásától elkülönítve tárgyalni, mivel ez a két paraméter magasabb húzóerőknél (a túlnyújtási plató előtt) szorosan összefügg (3. ábra).

$$x = L_c \left(1 - \frac{1}{2} \sqrt{\frac{k_B T}{F L_p}} + \frac{C}{-g(F)^2 + SC} \cdot F \right) \quad (15)$$

$$g(F) = \begin{cases} g_0 + g_1 F_c & F < F_c \\ g_0 + g_1 F & F \geq F_c \end{cases} \quad (16)$$

Itt C a csavarási merevséget jelöli, mely a kettős hélix torziós erővel szembeni ellenállását jellemzi, $g(F)$ a csavarás-megnyúlás kapcsolatot leíró lineáris függvény, melynek tengelymetszetét g_0 , meredekségét g_1 jelöli, valamint F_c a kritikus erő, amelynél a DNS megnyúlása és csavarodása közötti kapcsolat megváltozik [43].



3. ábra. *Különböző polimermodellek illesztései 0,1 M NaCl és 0,2 μm/s húzóerő esetében mért DNS-erőgörbére. Magasabb erőknél lényeges különbség mutatkozik az eWLC és tWLC modellek között, mely a kettősszálu DNS hélixének kicsavarodása miatt bekövetkező további megnyúlással magyarázható.*

1.3. DNS-kötő molekulák

A DNS-kötő molekulák megváltoztathatják a DNS nanomechanikáját, ezáltal hatással lehetnek olyan folyamatokra, mint a transzkripció vagy a replikáció. Ennek következtében e molekuláknak fontos szerepük van a sejtszintű folyamatok szabályozásában a DNS-sel való kölcsönhatás révén. Az, hogy e DNS-kötő molekulák

hogyan hatnak a DNS-re és ezáltal a DNS-t érintő molekuláris folyamatokra, kulcsszerepet játszik adott betegségeknél a megfelelő gyógyszermolekula kiválasztásában, illetve fejlesztésében. Emellett a genetikai diagnosztikában és a biológiai szerkezetvizsgálatban is kiemelkedő szerepet játszanak. A nanomechanikai változások feltérképezése azért is bír nagy jelentőséggel, mert míg terápiás szempontból a DNS mechanikai vagy szerkezeti módosítása lehet a cél, addig a diagnosztikai és szerkezetvizsgálati esetekben épp ellenkezőleg, a DNS eredeti állapotának fenntartása lehet fontosabb [17].

A DNS-kötő molekulákat többféleképpen lehet csoportosítani, például a kötődés reverzibilitása szerint, vagy a kötési hely alapján. Az utóbbi alapján háromféle főbb kötési módot lehet megkülönböztetni: interkaláció, árokkötés és egyszálú DNS kötés. Bizonyos DNS-kötő molekulák többféle kötési módot is mutatnak, mint például a TMPyP. E kötési módok azonosíthatóak a DNS bekötődés hatására megváltozott erőgörbéjének egyedi jellemzői alapján [17,32].

1.3.1. Interkalátorok

Az interkalátorok a kettősszálú DNS szomszédos bázispárjai közé ékelődnek, így stabilizálva a kettősszálú DNS szerkezetét, ami megakaszthatja a replikációs folyamatot. Példák interkalátorokra az etídium-bromid, a SYTOX Orange (SxO) és az oxazol sárga (YO), amelyeket DNS jelölésére használnak [17,32,44–46]. További példák még a proflavin [47,48], psolaren [47], daunomicin (daunorubicin) [44,49] és aktinomicin D [50], amelyeket különböző terápiás eljárásokban alkalmaznak [17].

Általánosságban elmondható, hogy az interkalátorok kötése megnöveli a DNS hosszát, továbbá növeli a túlnyújtási plató eléréséhez szükséges erőt, ezzel stabilizálva a DNS-t [17,44,47,49,51–54]. További vizsgálatok [51,53,54], melyeknél különböző koncentrációk mellett mérték az erőt, a túlnyújtási plató eltűnését egyszerű termodinamikai hatásokkal magyarázzák, amely nagyon magas ligandumkoncentráció esetén következhet be. Megemlítendő még, hogy az interkalátorok a túlnyújtási plató rövidülését is okozzák a DNS hossznövekedésének eredményeként [17].

Polimermodell-illesztésekkel meghatározható az interkaláció hatására módosult DNS perzisztenciahossza és kontúrhossza (lásd 1.2.3. fejezet). A vizsgált interkalátorok mindegyikénél megnőtt a DNS kontúrhossza a hatóanyag nélküli DNS-hez képest [44,52,55]. Általánosan elmondható, hogy a perzisztenciahossz a szaturációt elérő

koncentrációknál alacsonyabb [44,52,56]. Ezt kiegészítendő fontos megjegyezni azonban, hogy egy kutatásban alacsony erőknél (< 2 pN) azt mutatták ki, hogy a perzisztenciahossz fokozatosan nőtt egy kritikus koncentrációig, majd e kritikus érték felett hirtelen csökkent, ezt követően nagyobb koncentrációknál megközelítőleg állandó maradt [55]. A nyújtási modulus szintén csökken interkaláció hatására [17,32,51,56].

Habár az interkaláció jelentős szerkezeti és mechanikai változásokat okoz, reverzibilis folyamat. E tulajdonság az interkalátorokat ígéretes jelöltekké teszi a DNS-t célzó alkalmazások széles körére [32,45].

1.3.2. A DNS árkaiba kötő molekulák

Azon molekulák, amelyek pozitív töltéssel rendelkeznek, valószínűleg elektrosztatikus kölcsönhatás révén kapcsolódnak a DNS-hez, a DNS negatívan töltött kis és nagy árkaiba kötődve. Ezeket a molekulákat árokkötőknek nevezik. Többféle molekula is ismert, amely ezt a kötési módot használja, legyen az a teljes kötődési folyamatban egy köztes vagy végleges kötési állapot [17,32,49,57].

A netropszin [17], a disztamicin A [58] és alacsony koncentrációknál a berenil [59] mind kötődnek a DNS kis árkába. Az első két molekula esetében kimutatták, hogy a túlnyújtási platóhoz szükséges erő megemelkedik a kis árokba kötődés hatására [17]. Ennek ellentmond azonban egy tanulmány, ahol a disztamicin A poli(dG – dC) esetében 50 pN-ra csökkentette a túlnyújtási platóhoz tartozó erőt [49]. Ennek feloldására lézercsipeszes kísérletekben, λ -DNS-t (a λ -bakteriofág DNS-ét) használva megvizsgálták a disztamicin A hatását [44], és azt találták, hogy a túlnyújtási platóhoz szükséges erő megnőtt, ezzel igazolva, hogy a DNS kis árkaiba történő kötés valóban stabilizálja a DNS-t a túlnyújtási plató megemelésével. A perzisztenciahossz a kötés hatására megváltozik, de nem mutatható ki minden esetben növekedés vagy csökkenés [17]. A netropszin és alacsony berenil koncentrációnál végzett kísérletekben nem mutattak ki számottevő kontúrhossz változást < 15 pN-nál végzett illesztésekből [52].

A DNS nagy árkába kötő molekulák például a metilzöld [60] és a SYBR Green [61]. Korábbi vizsgálatok alapján megállapítást nyert, hogy a nagy árokba történő kötés megemeli a túlnyújtási platót, csökkenti a túlnyújtási átmenet során fellépő kooperativitást, amit a túlnyújtási plató erőtartományának kiszélesedése jelez [17,44,49,61]. Szintetikus peptid esetében azt találták, hogy a kötődés megnöveli a peptid-DNS-komplex kontúrhosszát, míg a perzisztenciahosszát csökkentette [17,44].

1.3.3. Egyszálú DNS-t kötő molekulák

Számos fehérjemolekuláról kimutatták már, hogy képes az egyszálú DNS-hez kötni [17,62–69]. Ezen felül az aktinomicin D [70–73] és a glioxál [74–78] is rendelkezik ezzel a tulajdonsággal. A glioxál hatására a lézercsipessel mért λ -DNS nyújtási-relaxációs erőgörbéken a túlnyújtási plató csökkenése és jelentős hiszterézis figyelhető meg [79], mely hasonló az egyszálú DNS-kötő fehérjéknél megfigyelt eredményekhez [17,65–69].

1.3.4. Többféle kötődést mutató molekulák

Bizonyos DNS-kötő molekulák többféle módon is képesek kötődni a DNS-hez [17]. Példaként említhető a berenil, mely alacsony koncentrációban a DNS kis árkába köt be, míg magas koncentrációknál az interkaláció a jellemző kötéstípus. A berenil DNS-hez történő kötését egymolekula szinten először AFM segítségével vizsgálták [47,57]. A DNS nyújtási erőgörbéit vizsgálva azt találták, hogy alacsony koncentrációknál némi megnyúlás volt tapasztalható, míg a túlnyújtási plató megemelkedett, mely változások a kis árokkötésre utalnak. Magasabb koncentrációknál jelentős DNS-hossznövekedést tapasztaltak, míg a túlnyújtási átmenetre jellemző kooperativitás jelentősen csökkent, melyek jellemzően az interkalációt jelzik. A berenil DNS erőgörbéjére gyakorolt hatását lézercsipeszes kísérletekben is vizsgálták [52]. Az erőgörbékre alacsony erőknél ($F < 15$ pN) WLC modellt illesztve vizsgálták a perzisztencia- és a kontúrhosszak koncentrációtól függő változását. Alacsony koncentrációknál a kontúrhosszban elhanyagolható eltérés mutatkozott, azonban a koncentráció növelésével növekedést tapasztaltak. Ezzel szemben a perzisztenciahossz közel megkétszereződött alacsony koncentrációknál, míg magasabb koncentrációkon lecsökkent a kontroll – berenil nélküli – DNS perzisztenciahosszának értéke alá [17].

Többféle kötést mutató molekulaként megemlíthető még a psoralen, melyet bizonyos bőrbetegségek kezelésére használnak [80]. A psoralen elsőként interkalációval kötődik a DNS-hez, azonban a kezelés során használt UV-A fény hatására a molekula keresztkötéseket hoz létre a DNS-en belül [17].

1.4. A TMPyP

A porfirinek a DNS-kötő molekulák jelentős és széles körben vizsgált csoportját alkotják, köszönhetően strukturális sokféleségüknek és kötési tulajdonságaiknak. Közülük kiemelkedik a doktori munkám tárgyát képező TMPyP, amely erős affinitással

kötődik a DNS-hez, valamint figyelemre méltó fluoreszcens tulajdonságokkal rendelkezik. E jellemzők lehetővé teszik széleskörű alkalmazhatóságát a biológiai és gyógyszerészeti kutatásokban.

1.4.1. TMPyP alkalmazásai

A porfirinek és származékaikat a fotodinamikus terápiában („Photodynamic Therapy”; PDT) betöltött szerepük miatt nagy tudományos érdeklődés övezi. A módszer lényege az, hogy a kiválasztott molekulát megfelelő hosszúságú fénnel gerjesztve reaktív oxigéngyökök keletkeznek, melyek módosíthatják, illetve károsíthatják a fehérjéket, membránalkotókat és a nukleinsavakat, ezzel akár sejthalált is eredményezve [81,82]. A PDT lehetőséget biztosít lokális, nagy precizitással elvégezhető, felületi, terápiás kezelésekre daganatterápiáknál.

A TMPyP-nél számos esetben megállapították, hogy több előnyös tulajdonsággal rendelkezik a PDT-ben való alkalmazhatóságát illetően [81]. A normális sejtek a daganatos sejtekhez képest kevesebb porfirint halmoznak fel [83–85]. Ennek oka valószínűleg az, hogy lassabb anyagcseréjük miatt kevesebb fényérzékenyítő anyagot vesznek fel, ami a fotoaktiválás során kevesebb reaktív oxigéngyök termelődéséhez vezet [81,86].

Ezen felül a kationos porfirinek – mint amilyen a TMPyP is – széleskörű antimikrobiális hatással bírnak, mind Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumok esetében is [81]. A TMPyP kationos tulajdonságai előnyt jelentenek a mikrobiális sejtekhez való szelektív kötődésben, valamint gyorsabb kötődés jöhet létre, mint az emlős sejtek esetében. Ennek következtében rövidebb megvilágítási idő is elég a fotodinamikus hatás elérésére, ami tovább minimalizálja az egészséges sejtek kezelés során elszenvedett károsodását [87,88]. Az antimikrobiális fotodinamikus kezelés az antibiotikum-rezisztens kórokozók ellen is hatékonynak bizonyult [89], továbbá *E. coli* esetében azt tapasztalták, hogy a porfirinalapú fotoszenzibilizáló anyaggal történő részleges inaktiválás után sem volt tapasztalható újránövekedés vagy rezisztencia, még 10 ismételt besugárzási ciklus után sem. [90]. A fotodinamikus vírusinaktiváció szintén fontos kutatási területe a porfirineknek [91], a TMPyP-t vizsgálták kifejezetten vírusinaktivációs tulajdonságai miatt is [92–94].

A TMPyP kölcsönhatása a G-kvadruplexekkel szintén nagy tudományos érdeklődést váltott ki, mivel a TMPyP megváltoztatja a G-kvadruplex mechanikai

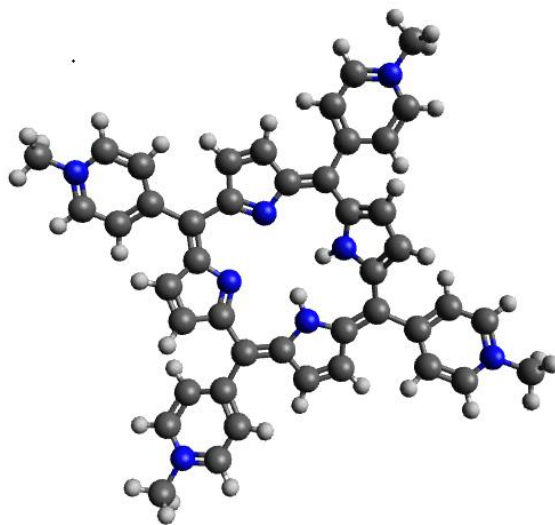
tulajdonságait, ezáltal megzavarja a telomeráz aktivitását, ami tovább növeli annak a lehetőségét, hogy a TMPyP és származékai sikeresen alkalmazhatók legyenek a daganatos megbetegedések kezelésében [81,95–100].

Ezekén felül a TMPyP-t és származékait felhasználják építőkövekként is funkcionális szerkezetekben [101–104]

1.4.2. Molekulasokaságon végzett kutatások eddigi eredményei

A TMPyP (tetrakis(4-N-metil)-piridil-porfin) a kationos porfirinek közé tartozik, egy heterociklusos vegyület, amely négy pirrolgyűrűt tartalmaz, melyek négy metinhíddal kapcsolódnak egymáshoz, a négy metilpiridil szubsztituens pedig a metin-hidak szénatomjához kapcsolódik (4. ábra). A TMPyP négy pozitív töltéssel rendelkezik és vízben jól oldódik. Ezen felül kiemelkedő DNS-affinitással és fluoreszcens tulajdonságokkal rendelkezik.

Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy a TMPyP planáris szerkezetének köszönhetően képes interkalálódni a bázispárok közé, és a kettősszalú DNS kis árkaihoz is képes kötődni [92–94,105]



4. ábra. A TMPyP (tetrakis(4-N-metil)-piridil-porfin) molekula pálcikamodellje.

A kötés típusa függ az ionerősségtől, a DNS-szekvenciától és a TMPyP-koncentrációtól, valamint érdemes megjegyezni, hogy már alacsony TMPyP/bázispár arány mellett is kimutatható a különböző kötési módok egyidejű jelenléte [92–94]. A TMPyP képes kötődni az egyszalú DNS-hez is, és katalizálja a kettősszalú DNS

képződését [106,107]. A kötési reakciók 10-500 ms időskálán játszódnak le, melyek közül az interkaláció lassabbnak bizonyult, mint az árokkötés [108].

1.5. A mikrofluidikai cellában fellépő diffúzió

A lézercsipeszt gyakran kombinálják mikrofluidikai cellával, melyben a kísérletet végzik. A cellában a lamináris áramlás lehetővé teszi a különböző csatornákon beérkező folyadékáramok szétválasztását. Egy precíz mikroállványra szerelt cella mozgásával lehetőség nyílik a csapdázó lézerek relatív mozgására a különböző folyadékáramok között. Ez lehetővé teszi például csapdázott mikrogöngyökhöz kihorgonyozott DNS mozgását puffer és DNS-kötő festéket tartalmazó folyadékáramok között. Ez többek között lehetőséget biztosít arra, hogy például a csatornaváltás irányától függően a DNS-kötő molekulák asszociációs és disszociációs kinetikáját mérjük.

A folyadékáramok közötti váltáskor azonban fontos figyelembe venni, hogy a szomszédos csatornák között egy nem elhanyagolható kiterjedésű koncentrácioprofil alakulhat ki. Ez a molekuláris festék beáramoltatásával, mesterségesen létrehozott koncentrációgradiens következtében kialakuló diffúzió eredménye. Ezt a hatást figyelembe véve kijelenthető, hogy a két csatorna közötti átmenet nem lesz azonnali a koncentrációváltozás szempontjából, különösen a gyorsan kötődő molekulák esetében. A koncentrácioprofil az áramlási sebességtől, a puffer- és a DNS-kötő molekulákat tartalmazó csatornák találkozási pontjától mért távolságtól, a molekula diffúziós állandójától és kezdeti koncentrációjától függ [109–113].

A koncentrációgradienst a szomszédos mikrocsatornák között a mikrofluidikai cellában Fick II. törvénye alapján lehet meghatározni, mely egydimenziós esetben a következőképp adható meg:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} \quad (17)$$

Itt c a koncentrációt, t az időt, x a távolságot és D a diffúziós állandót jelöli. A fenti összefüggés megadja, hogyan változik a koncentráció a tér és idő függvényében. Ez egy másodrendű parciális differenciálegyenlet, melynek megoldása természetesen függ a kezdeti feltételtől és két határfeltételtől. Az egyik megoldás, mely leginkább alkalmazható a lézercsipeszes mikrofluidikai kísérleti elrendezésre a következő [114]:

$$c(x, t) = \frac{c_s}{2} \left[1 + \operatorname{erf} \left(\frac{x}{2\sqrt{Dt}} \right) \right] = \frac{c_s}{2} \left[1 + \operatorname{erf} \left(\frac{x}{\sqrt{2\bar{x}}} \right) \right], \quad (18)$$

ahol c az oldott anyag koncentrációja és c_s a kezdeti, maximum koncentráció a festéket tartalmazó csatornában. Az összefüggés által kirajzolt koncentrációprofilokat szemlélteti az 5. ábra. Az egydimenziós távolság ebben az esetben az áramlás irányára merőlegesen értelmezendő, úgy, hogy értéke 0 a puffer-festék csatornák határán és pozitív a festéket tartalmazó csatorna irányában (5. ábra x tengelye). Az erf a Gauss-féle hibafüggvényt jelöli, mely egy szigmoid alakú függvény és az alábbi összefüggéssel definiálható:

$$\operatorname{erf}(x) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^x e^{-t^2} dt \quad (19)$$

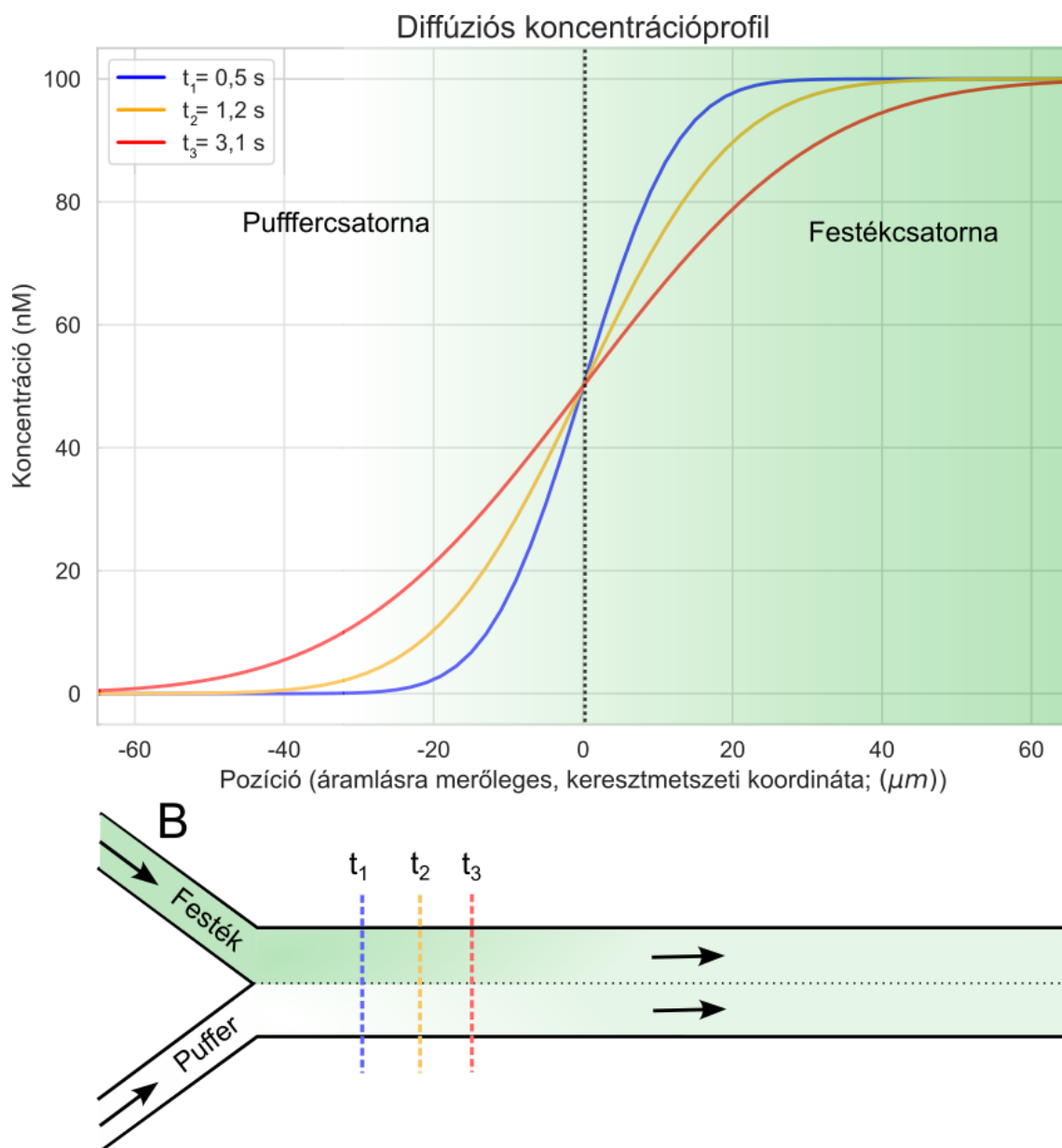
Figyelembe véve, hogy Einstein diffúziós elmélete szerint a Brown-részecske négyzetes középérték elmozdulásának négyzetgyöke $\bar{x} = \sqrt{2Dt}$, a (18) egyenletben szereplő $2\sqrt{Dt}$ tag helyettesíthető a következővel: $\sqrt{2\bar{x}}$ [115]. Fontos megjegyezni, hogy a különböző molekulák eltérő mozgékonyága megváltoztatja a koncentrációprofil végső alakját. A határfeltételek olyanok, hogy a koncentrációgradiensek végtelen távolságra a két csatorna határfelületétől mindkét irányban 0-val egyenlőek [114].

$$\left. \frac{\partial c}{\partial x} \right|_{x=-\infty, t} = 0; \quad \left. \frac{\partial c}{\partial x} \right|_{x=\infty, t} = 0 \quad (20)$$

A kezdeti feltétel pedig a következő:

$$c(x, 0) = \begin{cases} 0 & x < 0 \\ c_s & x \geq 0 \end{cases} \quad (21)$$

A koncentráció időben is változik Fick II. törvénye szerint, ezért a koncentrációprofilnak lesz egy időbeli fejlődése, ahogy a szomszédos oldatok párhuzamosan, előre beállított sebességgel áramlanak lefelé a mikrofluidikai eszközön. Emiatt a két mikrocsonk találkozásától vett adott távolságban lévő mintavételezési pont egy adott időpillanatnak felel meg. Ezt az időfejlődést szemlélteti az 5. ábrán 3 időpillanatban feltüntetett koncentrációprofil, melyek megfelelnek az áramlás irányában vett 3 pozíciónak.



5. ábra. Diffúzió következtében kialakuló koncentrációprofilok mikrofluidikai cellában. **(A)** A mikrofluidikai cellában, a puffer- és festékcatorna között, az áramlás irányára merőleges, egy dimenzió mentén vett koncentrációprofilok a (18) összefüggés alapján 3 időpillanatban, $c_s = 100 \text{ nM}$ maximális koncentrációnál. A két csatorna elméleti határát függőleges, szaggatott vonal jelöli, a festékcatornában lévő, illetve a puffercsatornába átdiffundáló festéket halványzöld háttér jelöli. **(B)** Kétcatornás mikrofluidikai cella sematikus rajza, a 3 időpillanatban vett koncentrációprofillal (t_1 kék, t_2 sárga és t_3 piros). A két csatorna elméleti határát itt is szaggatott vonal jelöli, míg az áramlás irányát nyilak jelzik.

Emiatt a koncentrációprofil alakja az áramlási sebesség beállításával és/vagy a mikrocsatorna összefolyása utáni mintavételi pozíció kiválasztásával választható meg. Megjegyzendő, hogy a fentiekben tárgyalt módon kialakuló koncentrációprofilok inflexiós pontja az 5. ábrán szemléltetett esetben marad ugyanazon pozícióban. Több, puffert tartalmazó csatorna esetében az áramlás mentén előrehaladva az inflexiós pont áramlásra merőleges koordinátája változik.

Sejtek vizsgálatára használtak már korábban mikrofluidikában kialakított koncentrációprofil [109,116,117], munkám során azonban egymolekuláris perspektívából vizsgáltam meg azt, a feltérképezésétől kezdve annak különböző, egymolekula biofizikában történő alkalmazhatóságainak lehetőségéig.

2. Célkitűzések

Doktori munkám középpontjában a TMPyP-molekula és a DNS kölcsönhatásainak egymolekula vizsgálati módszerekkel történő átfogó tanulmányozása állt, különös tekintettel a DNS-TMPyP által alkotott komplex nanomechanikai tulajdonságaira. Célul tűztem ki a TMPyP kötődési folyamatának, továbbá a kötődés hatására a DNS-ben kialakuló változások molekuláris szintű megismerését különböző kísérleti paraméterek mellett. Ezen felül vizsgálataim kiterjedtek a mikrofluidikai cellában, folyadékáramok között kialakuló koncentrációprofil fluoreszcencián és nanomechanikai elven alapuló karakterizálására és egymolekula szinten, lézercsipesszel végzett kísérletekben történő alkalmazhatóságára.

A munka során az alábbi főbb kérdések és szempontok adták meg a kutatás irányát:

1. Hogyan változik meg a kettősszalú DNS erőgörbéje TMPyP hatására?
2. Hogyan módosul a DNS-TMPyP által alkotott komplex erőgörbéje a kísérleti paraméterek (TMPyP-koncentráció, NaCl-koncentráció és húzási sebesség) megváltozásának függvényében?
3. A számos paramétertől függő nanomechanikai változások parametrizálására olyan modell kidolgozása, mely az erőgörbék teljes tartományára jól illeszthető minden vizsgált TMPyP- és NaCl-koncentráció, valamint húzási sebesség mellett.
4. A kettősszalú DNS-TMPyP komplex polimermodell-illesztésekből (eWLC) kapott nanomechanikai paramétereinek (kontúrhossz, perzisztenciahossz, valamint nyújtási modulus) értékei hogyan változnak a TMPyP-koncentráció és húzási sebesség függvényében?
5. Milyen módon befolyásolja a TMPyP az egyszalú DNS nanomechanikai tulajdonságait?

6. Hogyan térképezhető fel a mikrofluidikai cellában, diffúzió következtében létrejövő keresztmetszeti koncentrációprofil fluoreszcens, valamint előfeszített, kettősszálú DNS-molekulát alkalmazó pásztázás módján?
7. Milyen módokon alkalmazható a koncentrációprofil egymolekula kísérletekben?

3. Módszerek

3.1. Minták és oldatok

A kettősszájú DNS-en végzett nanomechanikai mérésekhez 3'-3' végeken biotinilált λ -fág DNS-t használtam (Lumicks, Amszterdam, Hollandia). A DNS az egyik szál 3' végén 6 biotinnal, a másik szál 3' végén pedig 4 biotinnal volt jelölve. A molekula 48502 bázispárból állt. Az egyszájú DNS-en végzett kísérleteket 3'-5' végeken biotinált DNS-en végeztem, melyek mindegyike 20452 bázisból állt. Az AFM képalkotáshoz 300 bázispár hosszú λ -fág DNS fragmentumokat használtunk. Minden lézercsipesszel végzett kísérletben a DNS-t 20-30 ng/ml végső koncentrációra hígítottam. A DNS-ek végeit két 3,11 μm átmérőjű, sztreptavidinnel bevont polisztirol mikrogöngyhöz horgonyoztam ki (Kisker Biotech, Steinfurt, Németország) úgy, hogy egy adott vég egy göngyhöz kötődjön.

A puffer minden mérés esetében Tris-HCl (20mM Tris, 7,4 pH) volt, mely eltérő mennyiségben tartalmazott NaCl-ot (0,01, 0,1 és 1 M). Az alkalmazott NaCl-koncentrációk az ábrákon külön feltüntetésre kerültek. A TMPyP-t (Porphychem, Dijon, Franciaország) az ábrákon feltüntetett különböző koncentrációkban használtam, 3 nagyságrendet felölelve 5 és 5120 nM között. A Sytox Orange fluoreszcens festéket (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) a koncentrációprofil feltérképezésére végzett kísérletben használtuk 100 nM mennyiségben. Ez utóbbi kísérletet leszámítva, az összes lézercsipeszt érintő mérés esetében, a pufferek 0,01% Tween-20-at is tartalmaztak. Erre a pozitív töltésű TMPyP, negatív töltésű üvegfelületekhez való nem specifikus kötődésének gátlása, és ezáltal az áramlási cellán belüli effektív TMPyP-koncentráció megváltozásának elkerülése érdekében volt szükség.

A TMPyP koncentrációját a 423 nm-en mért abszorbancia alapján, 4E UV-VIS abszorpciós spektrofotométer (Varian, Inc., Palo Alto, CA) segítségével mértem.

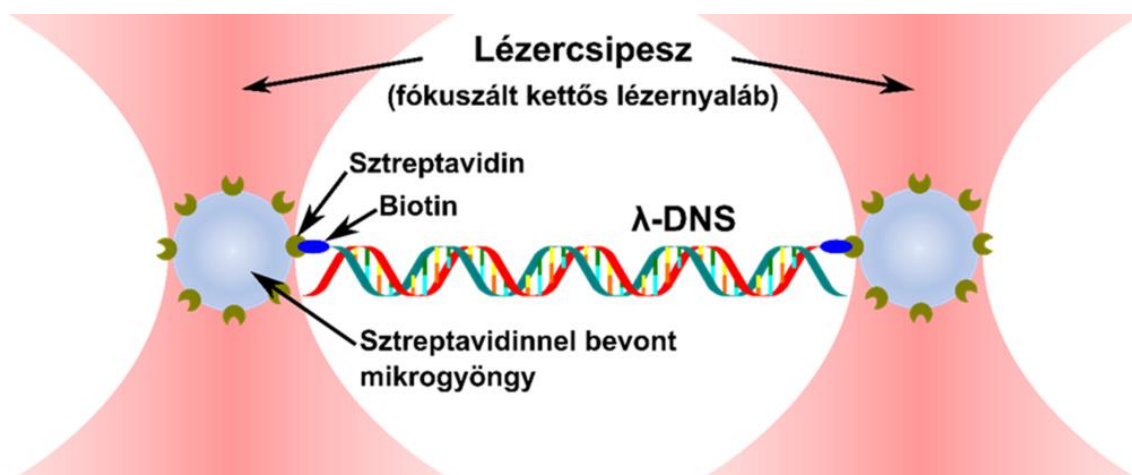
3.2. Lézercsipesszel végzett kísérletek módszerei

A λ -fág DNS-ek mechanikai vizsgálatához egy kétcsapdás optikai csipeszt használtam, mely egy többcsatornás mikrofluidikai cellával és pásztázó, konfokális, fluoreszcens mikroszkóppal volt felszerelve („C-Trap”, Lumicks, Amszterdam, Hollandia).

A mikrofluidikai cella inkubációját minden esetben úgy végeztem, hogy a DNS-kötő molekulák számára kijelölt csatornában az adott anyagot (SxO vagy TMPyP), a többi csatornában pedig az adott méréshez szükséges mennyiségű NaCl-ot tartalmazó puffert áramoltattam 45 percen keresztül. Ez azért szükséges, mert a cella falához adszorbeálódó festékmolekulák miatt a cella belsejében lévő koncentráció jelentősen eltérhet az előzőleg kimért, névleges koncentrációtól. Továbbá a megfelelő idejű inkubáció biztosítja a DNS-kötő anyagok állandó koncentrációját a mérések során, így azok nagy pontossággal összehasonlíthatóak akár hosszú méréssorozatok esetén is.

A mikrogöngyöket a fókuszált lézerfény segítségével áramlásban csapdáztam, majd átvittem a puffert tartalmazó csatornába, ahol az áramlást leállítva kalibráltam a csapdákat az erők detektálásához. Ezt követően a göngyöket – már ismét áramlásban – átmozgattam a DNS-eket tartalmazó csatornába, hogy kihorgonyozzam a molekulákat a göngyökre a sztreptavidin-biotin kötést felhasználva (6. ábra). A mikrofluidikai cellán belül az áramlás lamináris, ezért a különböző csatornákbán folyó folyadékok minimális mértékben keverednek csak egymással. A jelen esetben elhanyagolhatónak vett keveredés diffúzió következtében léphet fel a folyadékok határán (lásd 1.5. fejezet). További fontos szempont, hogy a csapdázott göngyök szabadon mozgathatóak a cellán belül.

Minden elvégzett mérésnél ezek az elsődleges lépések, és a kiinduló molekula is kettősszálú DNS, azonban a kísérletek módszerei ettől a ponttól kezdve eltérnek egymástól, melyeket az alábbi alfejezetekben ismertetek.

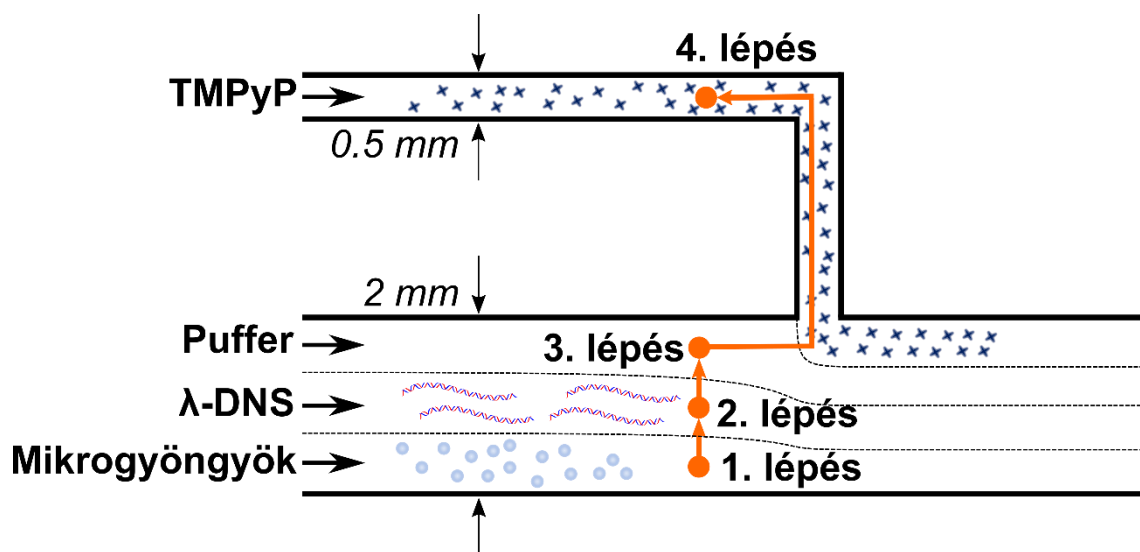


6. ábra. Biotinált, kettőszálú DNS kihorgonyzását bemutató sematikus ábra. A 3'-3' végein biotinált DNS a sztrepavidinnel bevont, lézersipesszel csapdázott mikrogönggyökhöz kötődik. A csapdázó lézer mozgatásával így lehetőség van a DNS-molekula nanomechanikai manipulációjára [34].

3.2.1. DNS-erőgörbék mérése

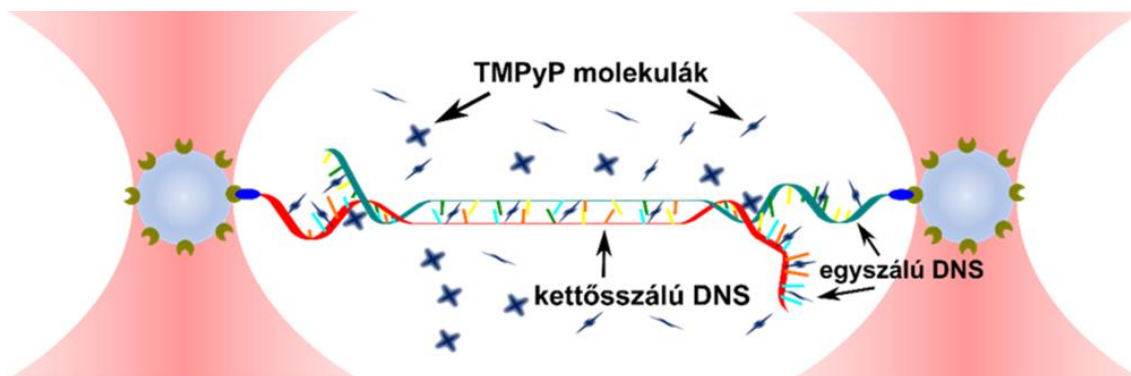
Az egyik gyöngy mozgatásával a két gyöngy közé kikötött DNS-molekula megnyújtható, és az ennek hatására a molekulában ébredő erő meghatározható. Az erő és a gyöngyök közötti távolság egyidejű mérését követően megkaphatóak az egyes DNS-molekulák erő-távolság görbéi, vagy rövidebben az erőgörbéi.

Egyetlen DNS-molekula erőgörbéjének meghatározásához először TMPyP nélküli pufferben (kontrollmérés) húztam a molekulát előre beállított, a nyújtás során végig állandó sebességgel. Ezt követően a molekulát az adott koncentrációjú TMPyP-t tartalmazó mikrofluidikai csatornába vittem. A mérések során a hidrodinamikai perturbációkat elkerülendő, leállítottam az áramlást. Emiatt azonban a diffúzió következtében fellépő koncentrációcsökkenés idővel befolyásolhatja a mérés pontosságát. Emiatt a TMPyP-vel végzett kísérletet a molekulát tartalmazó csatornának a többi csatornához képest lévő betorkollásától távol végeztem (7. ábra). Ez a hatás ugyanis a puffer-TMPyP csatornák határfelületéhez közel a legjelentősebb, attól távolodva csökken a hatás, továbbá áramlás nélkül ez a koncentrációprofil az idővel arányosan kiszélesedik, ezért az adott kísérlet folyadékcellán belüli helyének figyelembevétele különösen fontos hosszú időtartamú mérések elvégzésénél [45,46]. A DNS nyújtási ciklust a TMPyP csatornában is ugyanolyan sebességgel ismételt meg, mint a kontroll esetben.



7. ábra. A DNS-TMPyP kölcsönhatás mérési útvonalának sematikus ábrázolása. Narancssárga pontok jelölik a főbb kísérleti lépéseket, míg a nyílak a kísérlet során bejárt útvonalakat szemléltetik. A szaggatott vonalak a csatornák között lévő elméleti (átjárható) határt jelölik, míg a vastagított fekete vonalak a mikrofluidikai cella üvegfalait ábrázolják [34].

A DNS-erőgörbék TMPyP-től való függését 3 különböző NaCl-koncentrációnál (0,01, 0,1 és 1 M) végzett méréssorozat esetében vizsgáltam. Egy méréssorozaton belül 5-től 5120 nM-ig terjedő TMPyP-koncentrációkkal dolgoztam, duplázva a megelőző koncentrációt. Adott méréssorozaton belül, és adott TMPyP-koncentrációnál 3 különböző nyújtási sebesség mellett vizsgáltam a TMPyP hatását. Más szóval 9 különböző esetben (NaCl-koncentráció és húzási sebesség) vizsgáltam meg, esetenként 11 különböző TMPyP-koncentrációnál a DNS nyújtási erőgörbéit. A TMPyP-molekulák kettősszálú DNS szerkezetére gyakorolt hatásának egymolekula szinten történő vizsgálatát a 8. ábra szemlélteti sematikusán. A DNS-TMPyP komplex kettősszálú DNS-től eltérő szerkezetére annak nanomechanikáján keresztül következtethetünk, melyről az erőgörbék, illetve az azok közötti eltérések adnak lényeges információt.



8. ábra. *A csapdázott mikrovöngyök közé kihorgonyzott kettősszálú DNS-TMPyP komplexet bemutató sematikus ábra [34].*

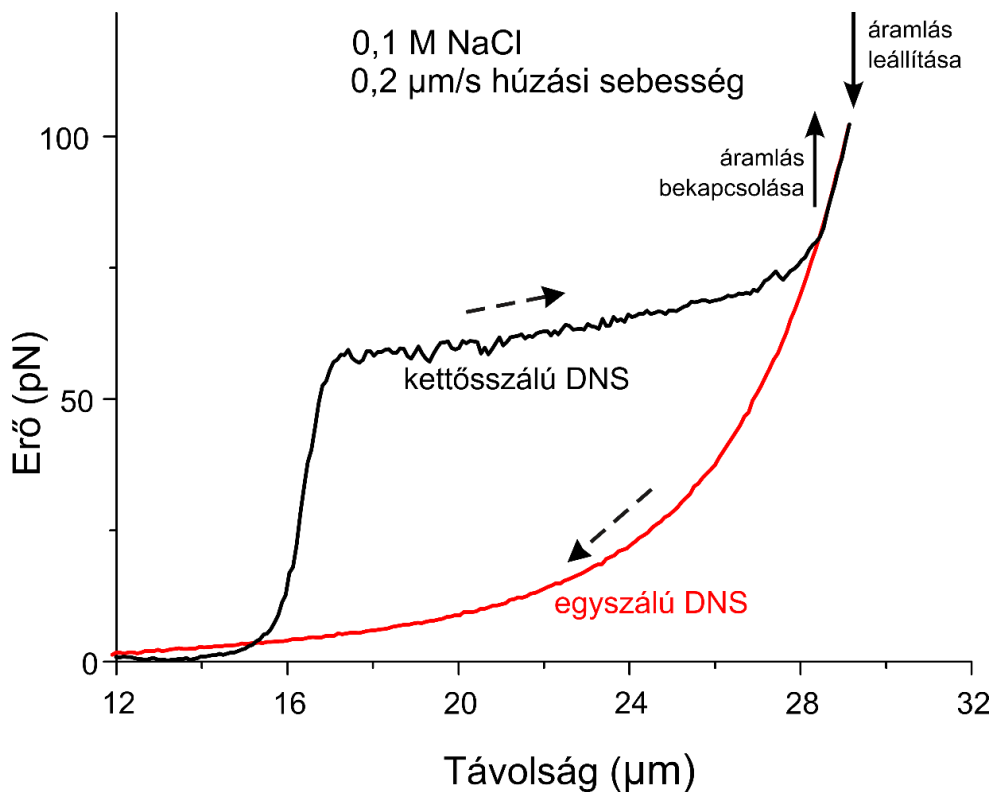
3.2.2. Molekuláris erőlépcső

A kettősszálú DNS-TMPyP kölcsönhatást olyan tekintetben is vizsgáltam, hogy a DNS-t hirtelen, különböző erőkkel megnyújtottam és közben detektáltam a DNS megnyúlását az idő függvényében, míg az erőt állandóan tartottam. Az erőt egy ún. „Force Clamp” rendszer 500 Hz frekvenciájú visszacsatolással tartotta állandóan. Miután a szál már nem nyúlt tovább a bekötődő TMPyP hatására, az erőt ~ 5 pN-os lépésben növeltem, ami minden esetben ~ 30 ms-ot igényelt. Emiatt a kiértékelésnél csak azokat a hosszadatokat vettük figyelembe, melyeket a műszer az erő stabilizálódása után regisztrált. A húzóerő ilyen módon történő lépésenkénti növelését 5-60 pN-ig végeztem. A méréseket szintén áramlásmentes környezetben hajtottam végre. Ennek okán szintén fontos volt a kísérleteket a TMPyP-puffer határtól távol, a TMPyP csatorna belsejében végezni, mivel a DNS-hossz stabilizálódásának függvényében egy-egy mérés hosszabb időt vett igénybe.

3.2.3. Egyszálú DNS nyújtása

Az egyszálú DNS-molekula vizsgálatához a kiinduló molekula egy kettősszálú, λ -fág DNS volt, melynek egyik szála volt a 3'-5' végein biotinálva. Mivel a molekula egyik szálának két vége biotinált, ezért belőle lézercsipesszel is előállítható az egyszálú DNS. Ehhez a kettősszálú DNS-t annyira meg kell nyújtani, hogy a túlnyújtási átmenet végéhez legyen közel (az erőgörbéken ez a túlnyújtási plató végét jelenti), hogy a kettős szál stabilizáló, bázispárok közötti hidrogénkötések jelentős része felszakadjon. Ezt követően, egy alacsonyabb sebességű, a kifeszített DNS-re merőleges irányú áramlás segítségével a maradék hidrogénkötések is felszakíthatók, így leválasztható a

komplementer szál. A két gyöngy közötti távolság csökkentésével, a DNS-szál relaxációja során keletkező erőgörbéből látható, hogy ha az az egyszálú DNS erőgörbéjét veszi fel. Ennek alapján már a kísérlet közben megállapítható, hogy sikerült-e a komplementer szál leválasztása, és így az egyszálú DNS előállítása (9. ábra).



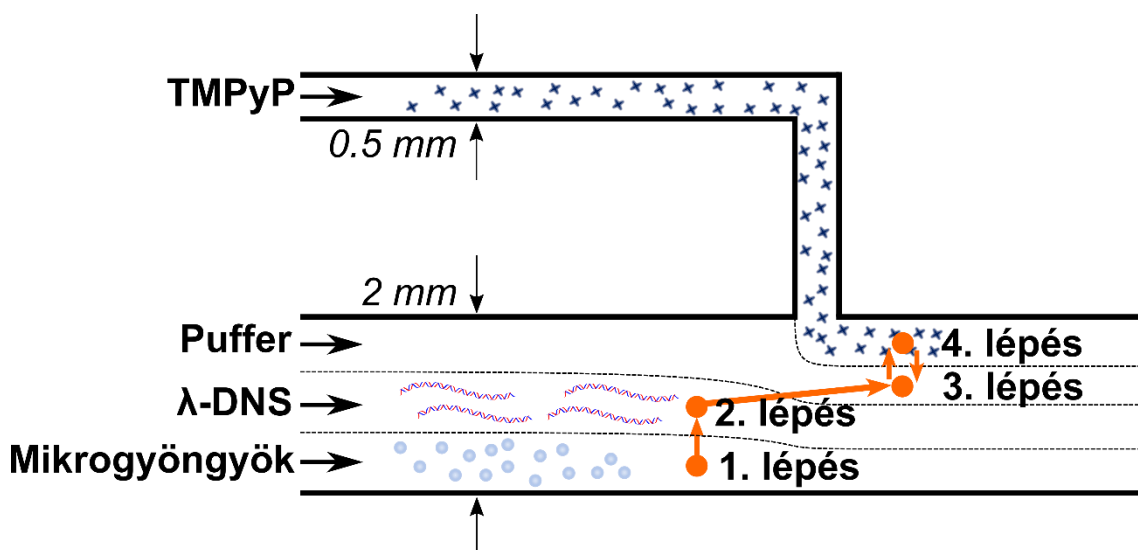
9. ábra. Az egyszálú DNS kettősszálú DNS-ből történő előállításának menetét reprezentáló ábra a DNS-ek erőgörbéin keresztül. A 3' 5' végein (egyetlen szálon) biotinált kettősszálú DNS-t húzzuk, egészen a túlnyújtási átmenet végéig, mikorra a legtöbb hidrogénkötés a bázisok között felszakadt a túlnyújtási átmenet során. Ezt követően a komplementer szálát lemoszuk a feszített szálra merőleges áramlás segítségével, majd a már egyszálú DNS-t visszaengedjük az áramlás leállítása után (piros görbe), egy mechanikailag relaxáltabb állapotba [34].

Az így kapott egyszálú DNS-t először pufferben nyújtottam meg az egyik gyöngy mozgatásának segítségével, felvéve a kontroll erőgörbét, majd az előző fejezetben (3.2.1.) leírtak szerint a TMPyP-t tartalmazó csatornán belül, távol a puffer-TMPyP határtól végeztem a további erőgörbe felvételét. A reverzibilitás vizsgálatához ezt követően a DNS-szálát visszavittem a csak puffert tartalmazó csatornába, majd gyenge áramlás mellett hagytam, hogy az esetlegesen még a szálhoz kötődő TMPyP-molekulák

disszociáljanak a szárlól. Ezután újra áramlás nélkül, pufferben nyújtottam meg a DNS-t vizsgálva, hogy az így kapott erőgörbe eltér-e a kezdeti, kontroll erőgörbétől.

3.2.4. Koncentrácioprofil feltérképezése

A méréseket a TMPyP és a többi csatorna összefolyásától $\sim 100\ \mu\text{m}$ távolságra pozicionáltuk a stabil hidrodinamikai környezet biztosítása érdekében (10. ábra). A kísérletek során végig $1\ \text{mm/s}$ oldatáramlási sebességet tartottunk fenn. A mechanikai méréseket vagy állandó nyújtási sebesség ($500\ \text{nm/s}$) vagy állandó erő ($35\ \text{pN}$) mellett végeztük. Az állandó erő fenntartását a 3.2.2. pontban ismertetett $500\ \text{Hz}$ frekvenciájú erővisszacsatolási mechanizmus biztosította. A fluoreszcencia méréséhez $532\ \text{nm}$ -es Nd:YAG lézert (Lumicks) használtunk gerjesztéshez. A fluoreszcenciaemissiót $545\text{--}620\ \text{nm}$ hullámhossztartományban fotonszámláló lavina fotodiódával mértük. Az idő függvényében vagy az X-Y síkban lévő képeket, vagy a molekuláris távolságot rögzítettük (kymogram).

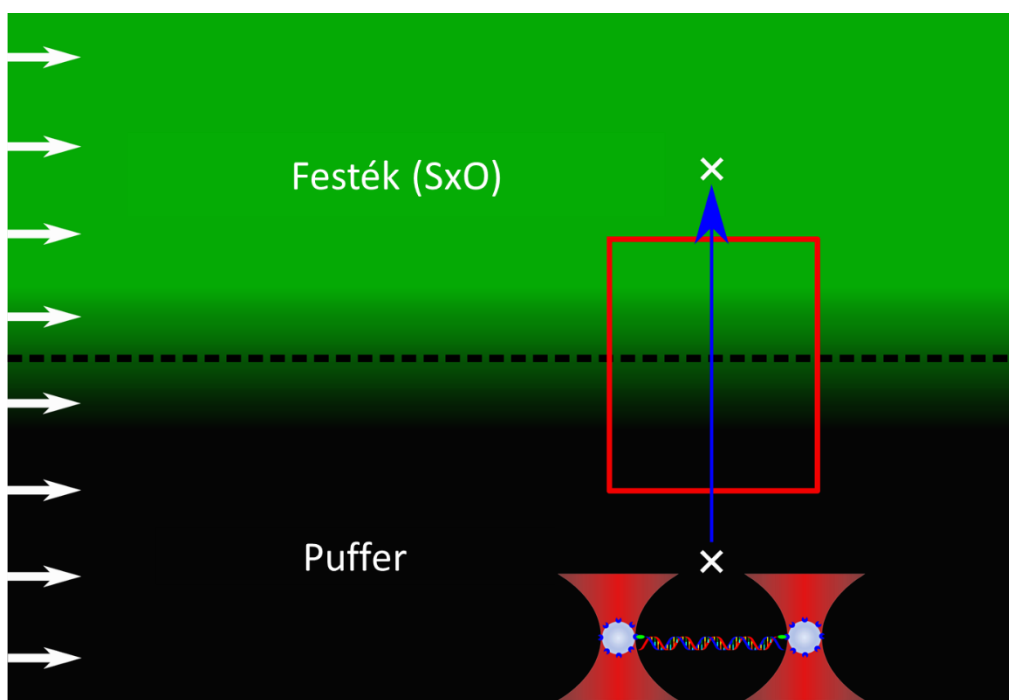


10. ábra. A koncentrációgradiens mérések útvonala a mikrofluidikai cellán belül. A narancssárga pontok szintén a főbb mérési lépéseket jelölik, míg a nyilak a lépések közötti útvonalakat mutatják (a 7. ábrához hasonlóan).

Koncentrációgradienst hoztunk létre a két szomszédos mikrofluidikai csatorna között, melyek közül az egyik a DNS-kötő molekulát tartalmazta (TMPyP vagy SxO), a másik pedig csak puffert tartalmazott (11. ábra). Az ennek következtében fellépő diffúzió során kialakul egy időben (az áramlás mentén, lásd 1.5. fejezet) változó koncentrácioprofil. A koncentrácioprofil alakja a DNS-kötő molekula diffúziós

együtthatójától és a koncentrációjától – ami egy limitáló tényező –, továbbá az áramlási sebességtől és a mikrocatornák összefolyásától mért távolságtól függ. A DNS-kötő molekula koncentrációjának tényleges keresztmetszeti eloszlását az SxO fluoreszcencia intenzitásának a koncentrációprofil mentén (azaz az áramlás irányára merőlegesen) vett egydimenziós leképezésével jellemeztük.

A koncentrációprofil az idő függvényében fejlődik, ahogy a szomszédos oldatok párhuzamosan, előre beállított sebességgel áramlanak a mikrofluidikai cellában. Az így kialakuló koncentrációprofil tehát az áramlási sebesség beállításával és/vagy a mikrocatornák összefolyása utáni mintavételi pozíció kiválasztásával választható meg.



11. ábra. A koncentrációprofil mérések kísérleti elrendezésének sematikus ábrázolása.

A piros téglalap azt a területet jelzi, ahol a méréseket végeztük. A kék nyíl jelöli a megkötött DNS-molekula útját a koncentrációprofil mentén a DNS-sel történő pásztázás során. Az útvonal kezdő- és végpontját fehér keresztek jelölik, míg a festék- puffer-csatornák elméleti határát szaggatott vonal jelöli. A mikrofluidikai rendszerben lévő állandó áramlást a bal oldali fehér nyilak jelzik. A puffercsatorna alján egy optikai úton csapdázott mikrogöngyhöz kötött DNS-molekula sematikus ábrája látható [46].

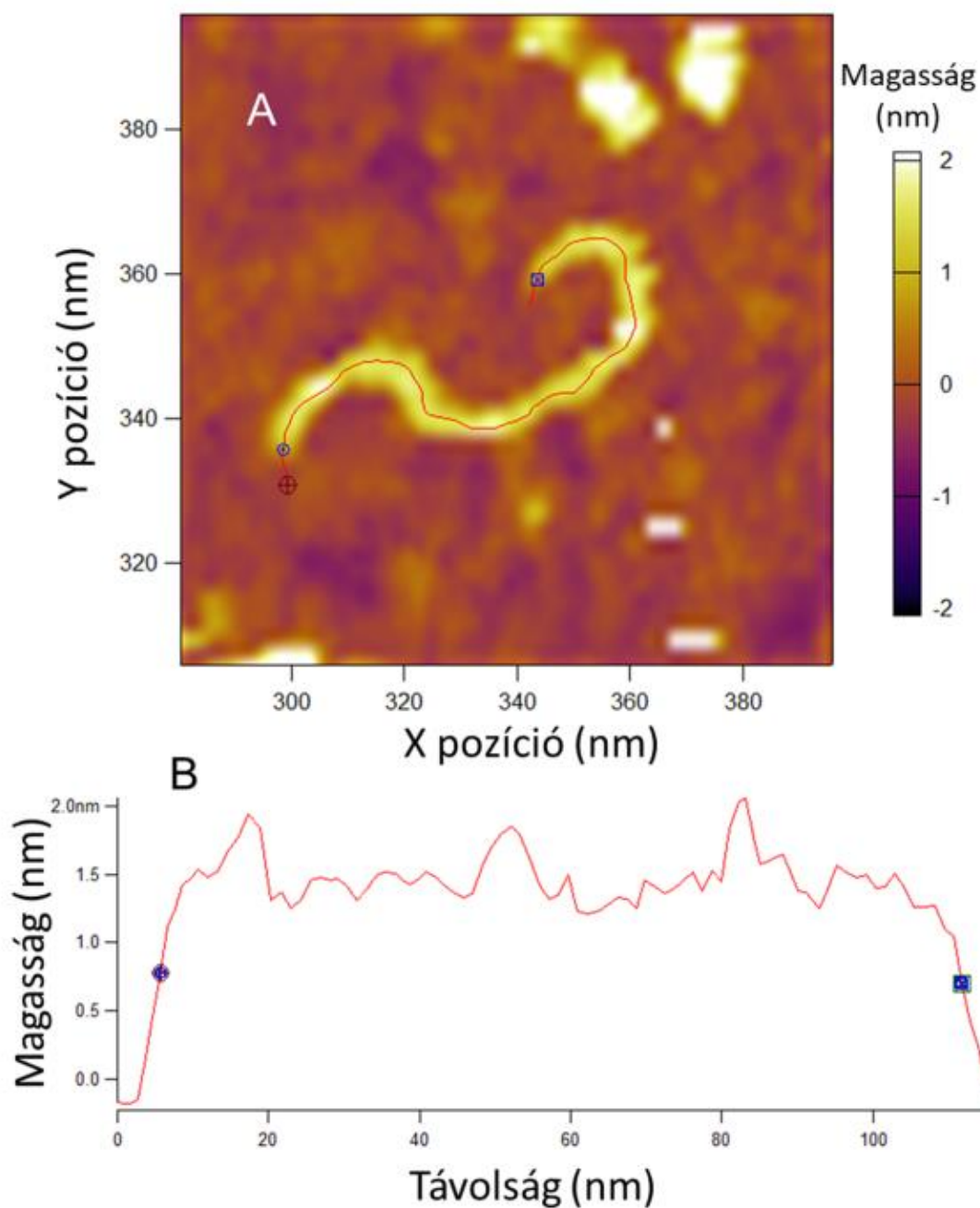
Tekintettel arra, hogy a vizsgált DNS-kötő molekulák (SxO és TMPyP) interkalálódnak a DNS-be [17,45,92–94,105], ezáltal megváltoztatva a kettősszalú DNS kontúrhosszát [17,32,45], a koncentrácioprofil mechanikusan feltérképezhető a befogott DNS-nek a profil mentén történő mozgásával [45]. Megjegyzendő, hogy ahhoz, hogy olyan koncentrácioprofil alakuljon ki, amelyben a manipulált molekula a teljes koncentrációskálán reagál a bekötődő festékmolekulára, az utóbbi koncentrációjának a festékcsatornában a DNS-re nézve telített koncentráció alatt kell maradnia. Más szóval, ha több a DNS-kötő molekula, mint ahány olyan kötőhely van a DNS-molekulán, amibe történő kötődés hosszváltozást idéz elő a DNS-en, akkor azon koncentrációtartományon ez a módszer már nem alkalmazható. Ezen megállapításon alapulva két különböző módszert alkalmaztunk. Az elsőben egyetlen, 35 pN állandó erővel megfeszített kettősszalú DNS-molekulát mozgattunk állandó sebességgel (18,5 $\mu\text{m/s}$) a koncentrácioprofil mentén, úgy, hogy a molekula tengelye párhuzamos volt az áramlás irányával. A normalizált hosszváltozást a megtett távolság függvényében ábrázoltuk. A második módszer során a DNS-molekulát gyorsan (500 $\mu\text{m/s}$ sebességgel), diszkrét, 38 μm -es lépésekben mozgattuk a koncentrácioprofil mentén és a DNS hosszát az idő függvényében ábrázoltuk.

3.2.5. Koncentrációlépcső

A koncentrációlépcsőt jelentő kísérletekben a kettősszalú DNS-molekulákat állandó erőkön (10, 20, 30, 40 vagy 50 pN) tartva, gyorsan (~ 250 ms alatt) a csak puffert tartalmazó csatornából a TMPyP-t (5 vagy 80 nM) tartalmazó csatornába vittem át. A koncentrációgradienst a két csatorna között 500 $\mu\text{m/s}$ -os áramlási sebességgel tartottam állandóan a mérési nyomvonal mentén (merőlegesen a folyadékáramra). A kiértékeléseknél a DNS időfüggő, bekötődő TMPyP hatására végbemenő megnyúlását vettem figyelembe, a TMPyP-molekula koncentrácioprofilja mentén történő mozgása után. Ugyanazt a molekulát továbbá, a TMPyP csatornába történő mozgásnál alkalmazott erőn tartva szintén ~ 250 ms alatt visszamozgattam a puffert tartalmazó csatornába, hogy vizsgáljam a TMPyP DNS-ből történő kiürülésének időbeli változását és annak hatását a molekula hosszára.

3.3. Atomierő-mikroszkópiával (AFM) végzett képakoltás

A 300 bp hosszúságú λ -fág kettősszálú DNS-fragmentumokról folyadékban, 25 °C-on, Asylum Research Cypher ES atomierő-mikroszkóp (Oxford Instruments, Abingdon, Egyesült Királyság) segítségével alkottunk képet. A minták felületét BL-AC40TS (Olympus) rugólapkával pásztáztuk non-kontakt üzemmódban, a rezonanciafrekvencia (~20 kHz) közelében fototermikus gerjesztéssel rezonáltatva. A tipikus pásztázási sebesség 0,5 $\mu\text{m/s}$ körül volt, továbbá a pásztázási felbontás 512 pixel/vonal volt minden kép esetében. 100 μl DNS-mintát cseppentettünk szárított, poli-L-lizin (PLL) bevonatú csillámfelületre. Ezt követően a TMPyP hatásának méréséhez a PLL felületéhez előzetesen kötött kettősszálú DNS-t 10 percig 250 nM TMPyP-vel inkubáltuk. A kép utófeldolgozását és elemzését az AFM-et is vezérlő szoftverben (IgorPro, WaveMetrics, Portland, OR, USA) végeztük. Az egyes DNS-szálak ($n=75$) kontúrhosszát és vég-vég távolságát a kontroll és a TMPyP-vel kezelt minták esetében is megmértük. A kontúrhossz meghatározásához a maximális magasságot követtük a lánc mentén (12/A ábra). A DNS-molekula végeit a tengelyirányú nyomvonal mentén, a topográfiai maximális magasság felénél lévő pontokban határoztuk meg (12/B ábra).



12. ábra. (A) AFM-kép egyetlen, felülethez kötött 300 bp hosszúságú kettősszájú DNS-molekuláról, a lánc mentén húzott nyomvonallal poli-L-lizinnel bevont csillámfelületen, 250 nM TMPyP-vel történő inkubáció után. **(B)** A kettősszájú DNS-molekulán mért topográfiai magasság és tengelytávolság görbe. A kék jelölések mindkét ábrarészen a molekula kontúrhosszát kijelölő szakasz kezdeti, illetve végpontját jelölik [34].

3.4. A kötési folyamatok kinetikai elemzése

A perturbációs kinetikai (erő- és koncentrációlépcső) kísérletekben kapott erőből függő sebességi állandókat ($k(F)$) a következő egyenlet segítségével illesztettük:

$$k = k_0 e^{F\Delta x/k_B T}, \quad (22)$$

ahol k_0 a nulla erőnél mért sebességi állandó, Δx pedig az egyetlen TMPyP-molekula kötődése által okozott látszólagos hosszváltozás. A k_{on} és k_{off} értékeket a TMPyP-koncentrációtól függő k_0 adatokra történő függvényillesztéssel állapítottuk meg, melyet az alábbi egyenlet határoz meg [118]:

$$k = k_{on}[TMPyP] + k_{off}. \quad (23)$$

Szélsőséges esetekben, a kettősszalú DNS gyors váltásakor a TMPyP magas és nulla koncentrációja között, a fenti egyenlet a következőképp egyszerűsödik: $k = k_{on}[TMPyP]$ magas és $k = k_{off}$ nulla TMPyP-koncentráció esetén.

3.5. Adatelemzés és vizualizáció

A lézercsipesz kísérletek nyers adatait Pythonban konvertáltam át és elemeztem. További elemzéseket végeztünk az Origin és a KaleidaGraph programokkal.

Az AFM-képek kiértékelését az IgorPro programban végeztem, míg az így kapott adatok statisztikai elemzését R-ben és Pythonban végeztem.

Az ábrák Pythonban, továbbá a következő programok felhasználásával készültek: Gnuplot, Origin, CorelDraw, Inkscape, KaleidaGraph és Microsoft Excel.

A lézercsipesz mérések részfolyamatait Pythonban írt szkriptekkel automatizáltam. Így biztosítható volt az állandó húzási sebesség fenntartása a mérések során, továbbá a DNS nyújtás-relaxáció ciklusokban az azonnali váltás az oda-visszatartó erőgörbénél az adott cikluson belül (lásd 4.1.5. fejezet), valamint a molekuláris erőlépcső kísérletek során annak megállapítása, hogy a DNS-szál már nem nyúlik tovább a bekötődő TMPyP-molekulák hatására.

4. Eredmények

4.1. A DNS-TMPyP által alkotott komplex erő-távolság görbéi

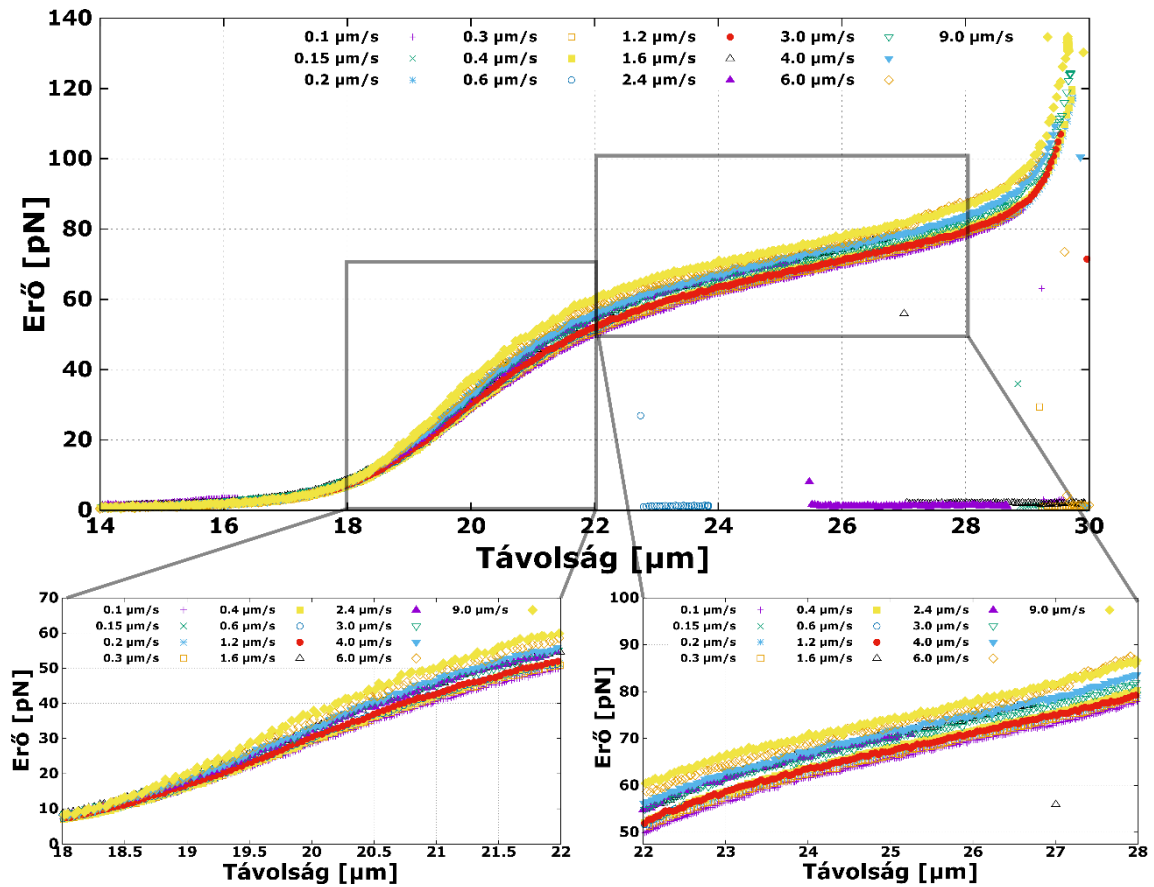
4.1.1. Az erőgörbék TMPyP-koncentrációtól, NaCl-koncentrációtól és húzási sebességtől való függése

A DNS-TMPyP erő-távolság görbéket a TMPyP-koncentrációk széles tartományában (5 nM-tól 5120 nM-ig, duplázva a koncentrációt), három különböző NaCl-koncentrációjú pufferben (0,01, 0,1 és 1 M) mértem meg. Előkísérletek alapján a DNS húzási sebességének megváltoztatása kis – illetve az entropikus tartományban elhanyagolható – eltéréseket ad alacsony sebességeknél (0,1 – 9 $\mu\text{m/s}$) (13. ábra). Ennek alapján a húzási sebességeket úgy választottam meg, hogy azok két nagyságrendet is lefedjenek (0,2, 2 és 20 $\mu\text{m/s}$). E paraméterek mellett végzett kísérletek így összességében 9 koncentrációsorozatot jelentenek.

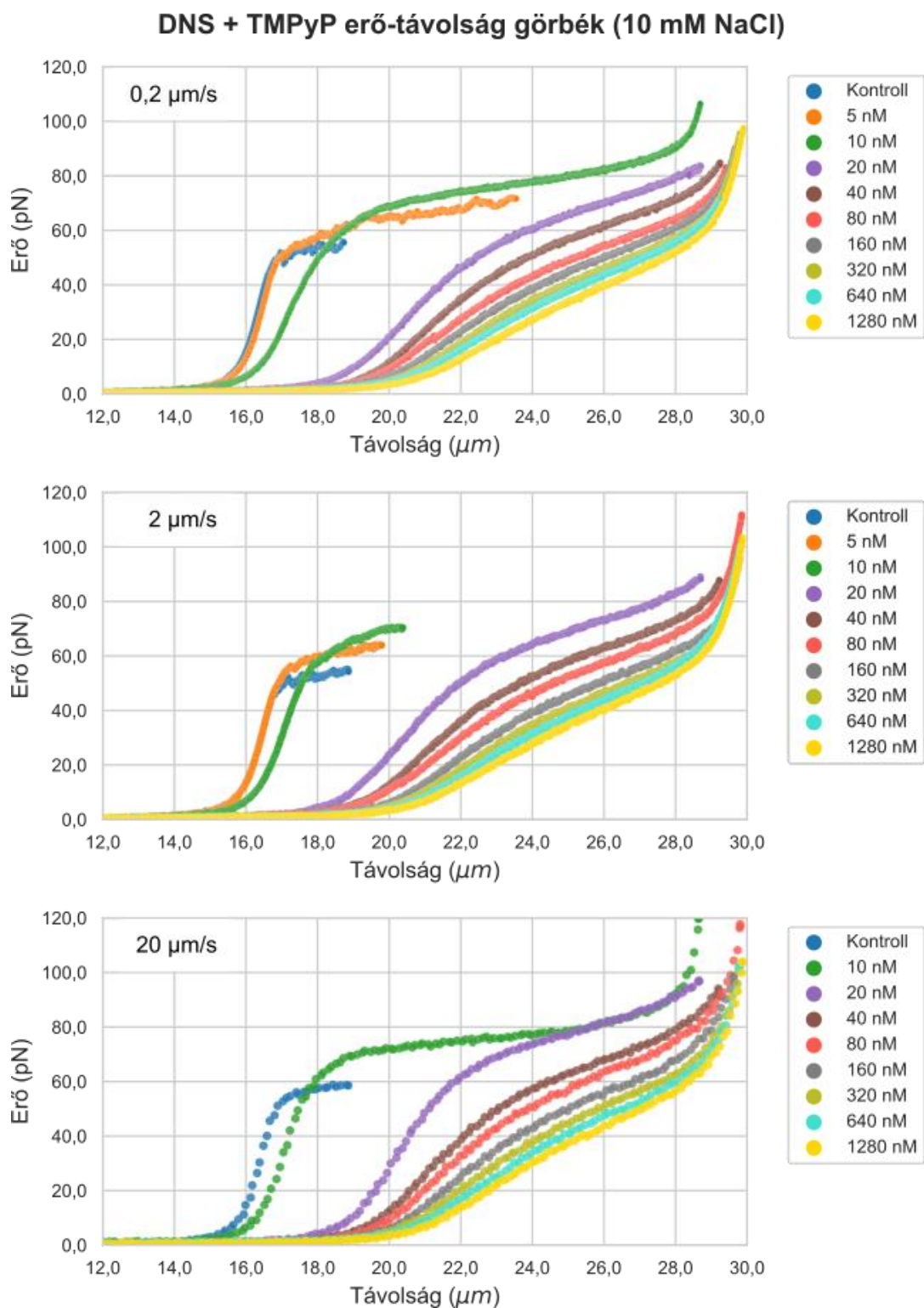
A TMPyP-koncentráció növelése jelentős változásokat eredményezett az említett görbék minden tartományát illetően. Alapvetően megnövelte a DNS kontúrhosszát, továbbá csökkent az entalpikus tartomány meredeksége. Ezen felül a túlnyújtási plató magassága a koncentráció függvényében először nőtt, majd csökkent, valamint a meredeksége nőtt a TMPyP-koncentráció emelésével (14-16. ábrák).

A húzási sebesség növelésével megfigyelhető a görbéken egy enyhe elmozdulás a TMPyP nélküli, illetve magasabb koncentrációk esetén az alacsonyabb koncentrációjú állapot irányába. Ez arra utal, hogy a változások egy részét a molekuláris rendszer termodinamikája és kinetikája befolyásolja, ami azonban – a vizsgált tartományon belül – kisebb mértékű eltéréseket eredményez az erőgörbéken (14-16. ábrák).

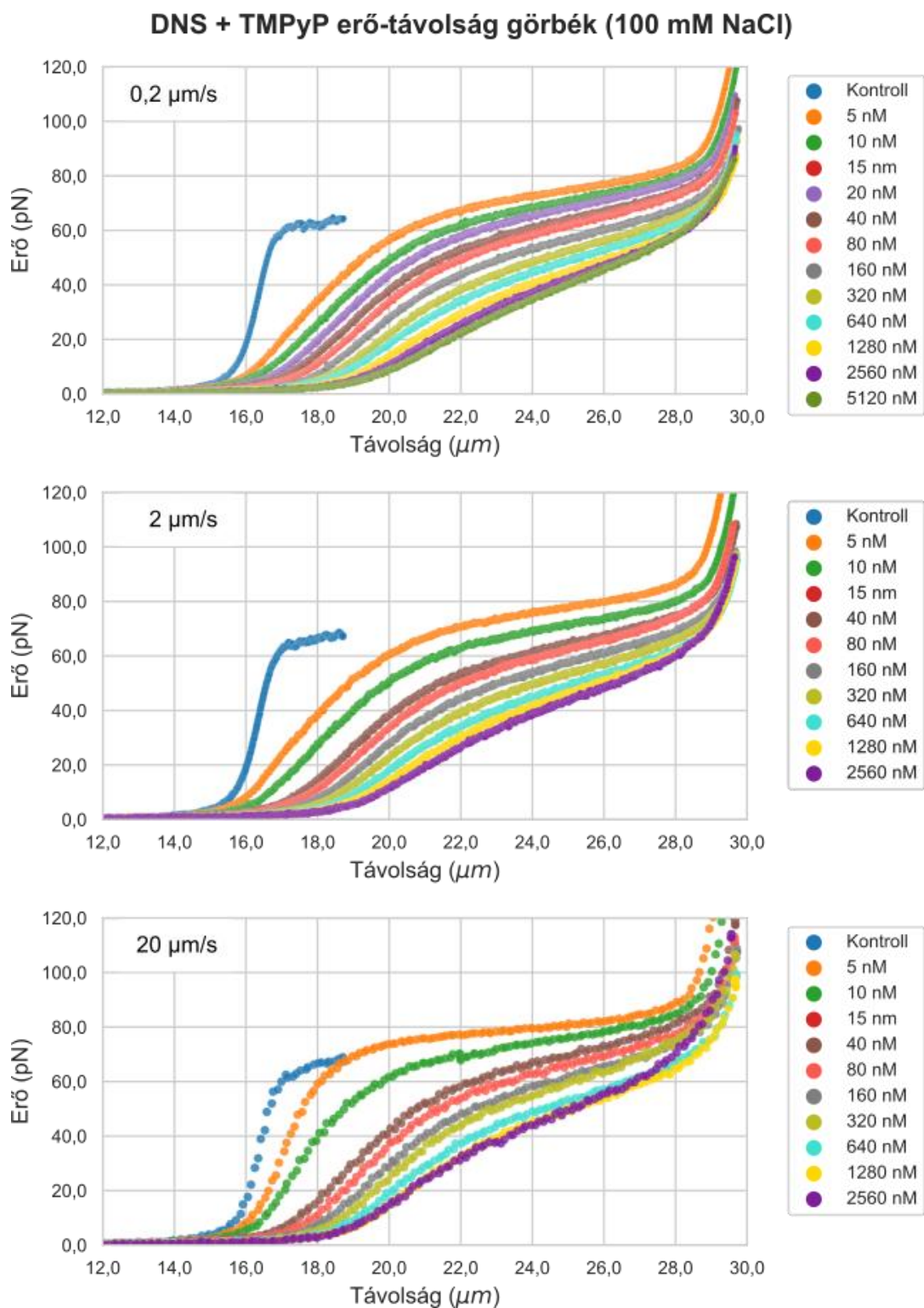
A NaCl-koncentráció emelésével megfigyelhető, hogy a TMPyP hatása a DNS erőgörbéjére nézve jelentősen redukálódik mind az entrópikus, mind pedig az entalpikus tartományokban. Magas (1 M) NaCl-koncentráció esetén a DNS kontúrhossza csak elhanyagolható mértékben változik meg, míg magas TMPyP-koncentráció esetében is csak a túlnyújtási plató meredeksége mutat változást. Ez arra utal, hogy az ionerősségnek eltérő hatásai vannak a DNS és a TMPyP közötti kölcsönhatásra, illetve kompetíciót mutat a TMPyP-vel (14-16. ábrák).



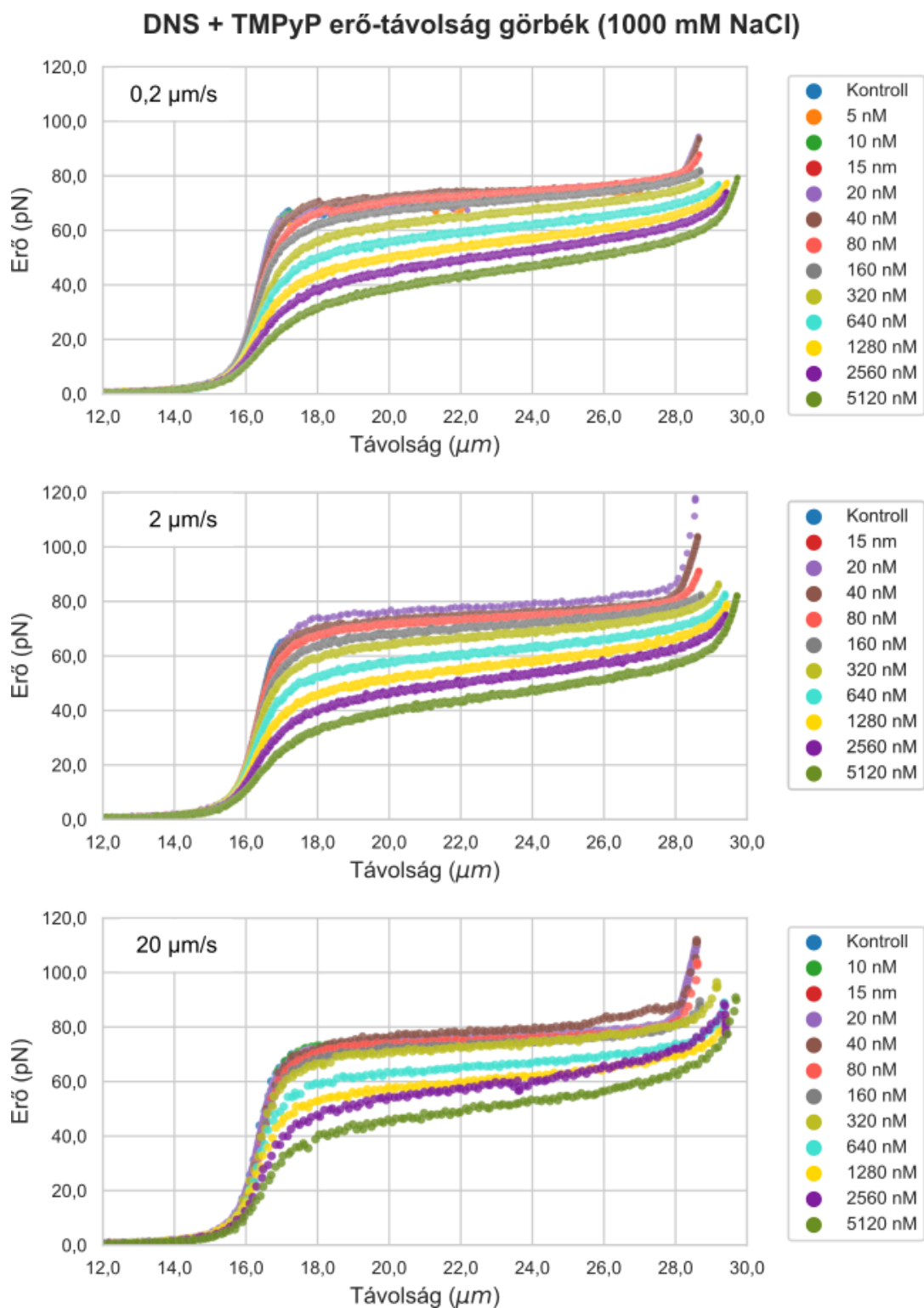
13. ábra. Kettősszállú DNS erőgörbéi 80 nM TMPyP mellett különböző húzási sebességeknél (0,1: lila kereszt – 9 μm/s: sárga rombusz). Az alkalmazott húzási erőknél az entrópiás tartomány kivételével – melynél elhanyagolható – kismértékű eltérések tapasztalhatók a különböző húzási sebességek mellett felvett erőgörbék között az alkalmazott sebességtartományon belül.



14. ábra. Kettősszálú DNS erőgörbéi 10 mM NaCl mellett, 0,2, 2 és 20 $\mu\text{m/s}$ húzási sebességeknél és különböző TMPyP-koncentrációknál (0 – 1280 nM tartományon) a színekódolásoknak megfelelően.



15. ábra. Kettősszálu DNS erőgörbéi 100 mM NaCl mellett, 0,2, 2 és 20 $\mu\text{m/s}$ húzási sebességeknél és különböző TMPyP-koncentrációknál (0 – 5120 nM tartományon). A jelölések az előző ábrához hasonlóak.



16. ábra. . Kettősszálu DNS erőgörbéi 1000 mM NaCl mellett, 0,2, 2 és 20 μm/s húzási sebességeknél és különböző TMPyP-koncentrációknál (0 – 5120 nM tartományon). A jelölések az előző ábrához hasonlóak.

4.1.2. Nanomechanikai részletek parametrizálására létrehozott modell

Mivel a kettősszájú DNS-TMPyP által alkotott komplex erőgörbéit több környezeti tényező mellett is vizsgáltam (TMPyP- és NaCl-koncentrációk, továbbá a húzási sebesség), melyek egymással ellentétesen, illetve egymást erősítve hathatnak a rendszer nanomechanikájára, ezért szükség volt egy olyan modell felállítására, mely a nanomechanikai változások részletes leírását és kvantitatív meghatározását segíti elő. Ebből kifolyólag egy olyan modellt dolgoztunk ki a mért erőgörbék illesztésére, mellyel az egyes hatások és azok mértéke külön is vizsgálhatók fényt derítve olyan tartományokra is, ahol a DNS a legérzékenyebb egy adott kísérleti paraméter megváltozására.

Ez a modell három komponensből áll: egy szigmoid függvényből (f_1 , entrópiikus és entalpikus tartományok), egy lineáris függvényből (f_2 , túlnyújtási plató) és egy hiperbolából (f_3 , aszimptotikus tartomány):

$$f_1(x) = \frac{1}{1 + \exp\left(-\frac{x - P_1}{P_2}\right)} \quad (24)$$

$$f_2(x) = P_3x + P_4 \quad (25)$$

$$f_3(x) = \frac{-P_6}{(x - P_5)}, \quad (26)$$

ahol az illesztési paramétereket P_i -vel jelöltük, az egyes paraméterek jelentése pedig a következő:

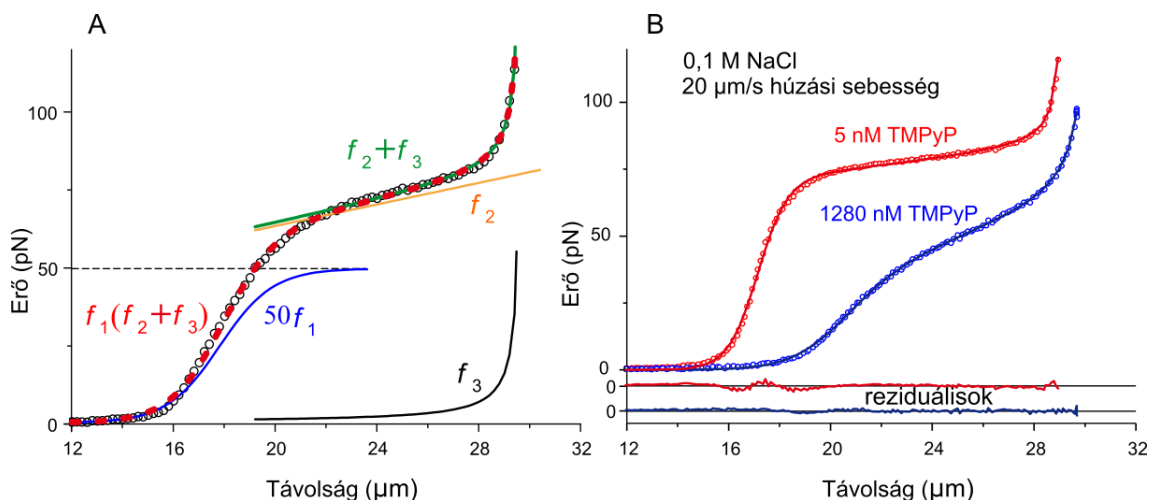
- P_1 : a szigmoid függvény helyzete az x tengely mentén; a DNS kontúrhosszával skálázódik
- P_2 : a szigmoid függvény szélességét adja meg; a DNS nyújthatóságával skálázódik az entalpikus régióban
- P_3 : a lineáris függvény meredekségét jelöli; az erőgörbén belül a túlnyújtási átmenetet írja le, azon belül is az átmenet során fellépő kooperativitást, amellyel fordítottan arányos
- P_4 : a lineáris függvény y tengelymetszetét adja meg; szintén a túlnyújtási átmenetet jellemző paraméter
- P_5 : a hiperbola aszimptotáját adja meg; a túlnyújtott kettősszájú DNS maximális hosszával skálázódik

- P_6 : a hiperbola görbületét jellemző paraméter; indirekt összefüggésben van az egyszálú DNS hajlítási merevségével

A (25) és (26) egyenleteket összeadva, majd megszorozva azt a (24) egyenlettel a következő összefüggést kapjuk:

$$f(x) = f_1 \cdot (f_2 + f_3) = \frac{P_3x + P_4 - \frac{P_6}{x - P_5}}{1 + \exp\left(-\frac{x - P_1}{P_2}\right)} \quad (27)$$

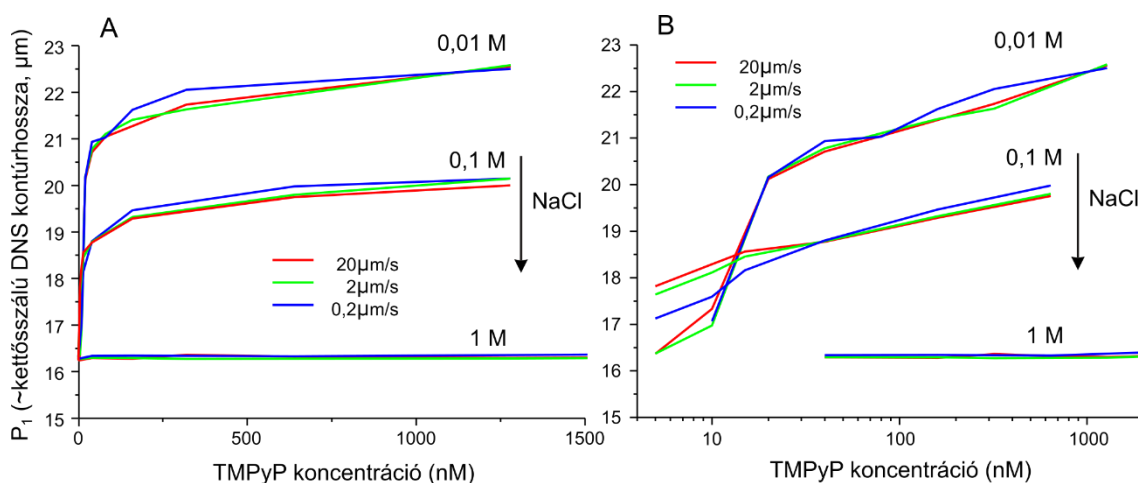
Az így kapott függvénnyel illesztettük a mérések során, a 14-16 ábrákon is bemutatott görbéket. Minden esetben a függvény jó illeszkedést mutatott a mért adatokra. Ehhez kapcsolódóan a 17. ábra ad szemléltetést a függvény komponenseiről (17/A ábra), azok illeszkedéséről, illetve a modellt leíró végső függvény illeszkedéséről a teljes erő-távolság tartományon. Az illesztés jóságát két szélső esetben (alacsony, 5 nM TMPyP- és magas, 1280 nM TMPyP-koncentráció) is ábrázoltuk, külön feltüntetve az adott illesztéshez tartozó reziduálisokat is (17/B ábra). A reziduálisokból látható, hogy az illesztett függvény a teljes erőgörbére jó illeszkedést mutat mindkét szélső esetben. Az illesztési paraméterek megfelelő megválasztásával a többi esetben is fennállt ez a pontos illeszkedés a mért adatokra.



17. ábra. (A) A modell erőgörbékre történő alkalmazásának vázlatos ábrája. A mért görbét a fekete körök jelzik. A modell egy szigmoid (kék görbe, nagyítva a jobb szemléltetés érdekében ($50 f_1$)), egy lineáris (sárga görbe) és egy hiperbolikus (fekete görbe) függvényből áll. Az így létrejövő modellt leíró függvényt piros szaggatott görbe jelöli. **(B)** Az illesztés jóságának szemléltetése a TMPyP-koncentráció két szélsőséges esetében: 5 nM (piros) és 1280 nM (kék). Mindkét mérést 0,1 M NaCl és 20 $\mu\text{m/s}$ húzási sebesség mellett végeztem. A körök a mérési adatpontokat jelölik, míg az illesztések jelölése folytonos vonallal történt. A reziduálisok színei megfelelnek az adott illesztéshez tartozó színeknek.

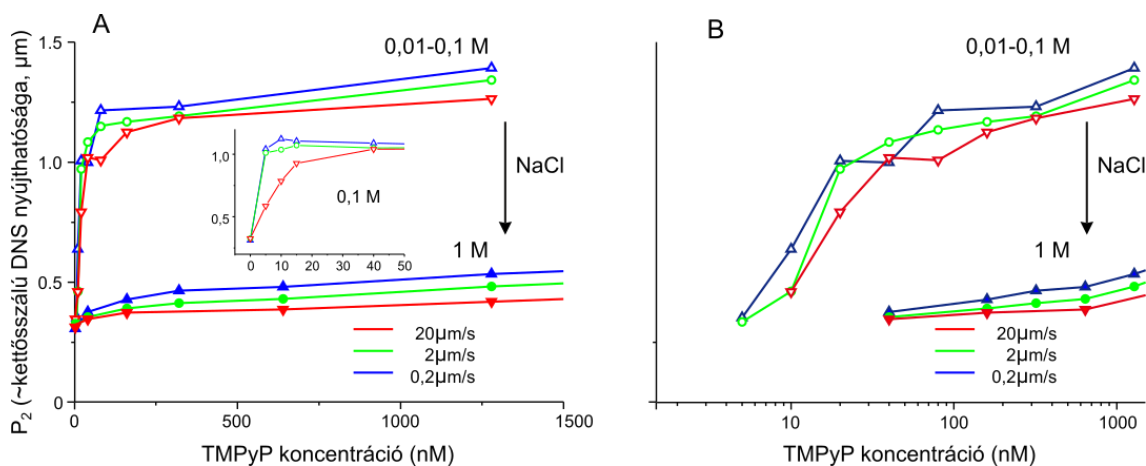
4.1.2.1. A nanomechanikai modell paramétere

Az illesztésből kinyerhető paraméterek eredményei közül elsőként a P_1 paraméter (kettőszálú DNS kontúrhosszával skálázódik) eredményeit vizsgáltuk mind a TMPyP- és a NaCl-koncentráció, mind pedig a húzási sebesség függvényében, amit az alábbi (18.) ábra is szemléltet. Mivel a paraméter TMPyP-koncentrációtól való függése igen jelentős alacsony koncentrációk esetében, ezért a (B) ábrarészen logaritmizált x tengelyen is ábrázoltuk az eredményeket. Látható, hogy a különböző NaCl-koncentrációk esetében jól elkülönülnek a görbék, míg a húzási sebesség (színkódolva az ábrán; kék: $0,2 \mu\text{m/s}$, zöld: $2 \mu\text{m/s}$ és piros: $20 \mu\text{m/s}$) több nagyságrenden keresztül sem okozott eltérést a P_1 paraméter értékeiben a koncentráció függvényében.



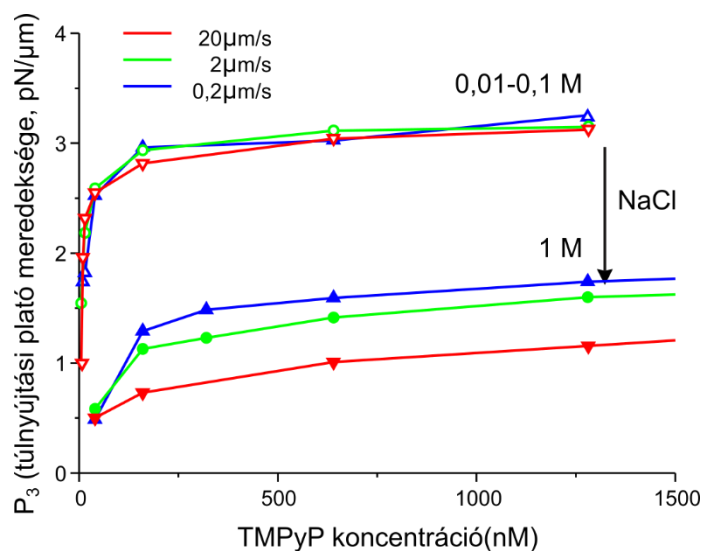
18. ábra. (A) A P_1 paraméter (szigmoid pozíciója, amely a kettőszálú DNS kontúrhosszával skálázódik) a TMPyP-koncentráció függvényében különböző NaCl-koncentrációk (0,01, 0,1 és 1 M) és húzási sebességek (kék: $0,2 \mu\text{m/s}$, zöld: $2 \mu\text{m/s}$ és piros: $20 \mu\text{m/s}$) mellett. **(B)** Az (A) ábra logaritmizált változata.

A P_2 paraméter (a DNS nyújthatóságával skálázódik az entalpius régióban) értékeit a TMPyP-koncentráció függvényében az alábbi ábra mutatja (19. ábra). Itt hasonlóképpen az előző ábrához, a (B) ábrarész az értékek logaritmusát tünteti fel, mivel ez a paraméter is erős TMPyP-koncentrációtól való függést mutat alacsony koncentrációjú (0-100 nM) tartományon.



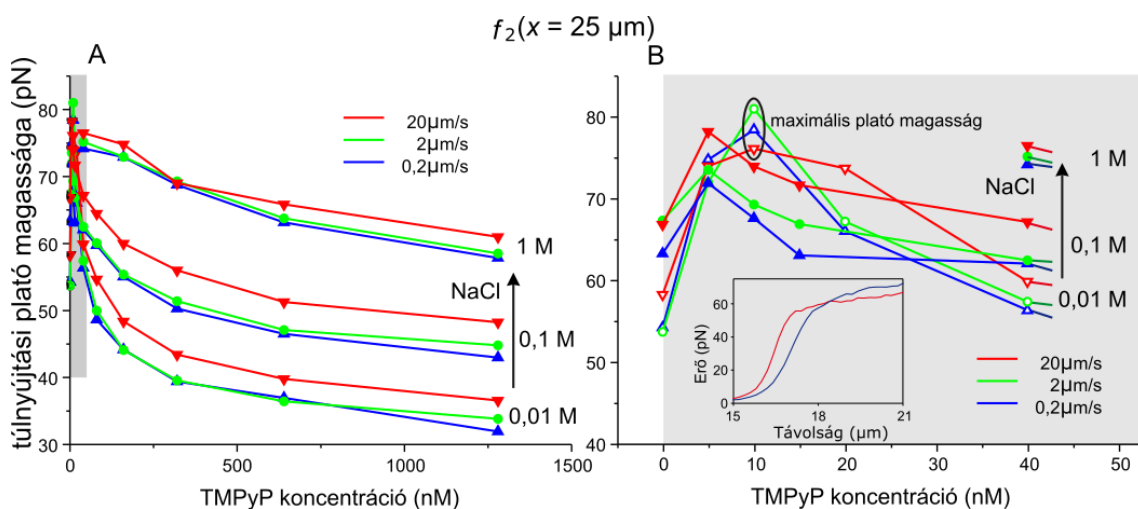
19. ábra. (A) A P_2 paraméter (szigmoid szélessége, a kettősszalú DNS nyújthatóságával skálázódik) a TMPyP-koncentráció függvényében különböző NaCl-koncentrációk (0,01, 0,1 és 1 M) és húzási sebességek (0,2 $\mu\text{m/s}$, 2 $\mu\text{m/s}$ és 20 $\mu\text{m/s}$) mellett. A jelölések az előző ábráéval megegyezők. **(B)** Az (A) ábra logaritmizált változata. A 0,01-0,1 M jelölés azt jelenti, hogy a paraméterek ebben a két esetben hibán belül azonos értékeket vesznek fel, tehát nem elkülöníthetők.

A P_3 paraméter (túlnyújtási plató meredeksége) TMPyP-koncentrációtól való függésén is látható, mint az előző két esetben is, hogy alacsonyabb NaCl-koncentrációnál (0,01-0,1 M) erősebb a paraméter TMPyP-koncentrációtól való függése (20. ábra). Ezen felül 1 M NaCl esetében a húzási sebességtől való függés megnőtt, ami arra utal, hogy a molekuláris rendszer eltolódott az egyensúlytól.



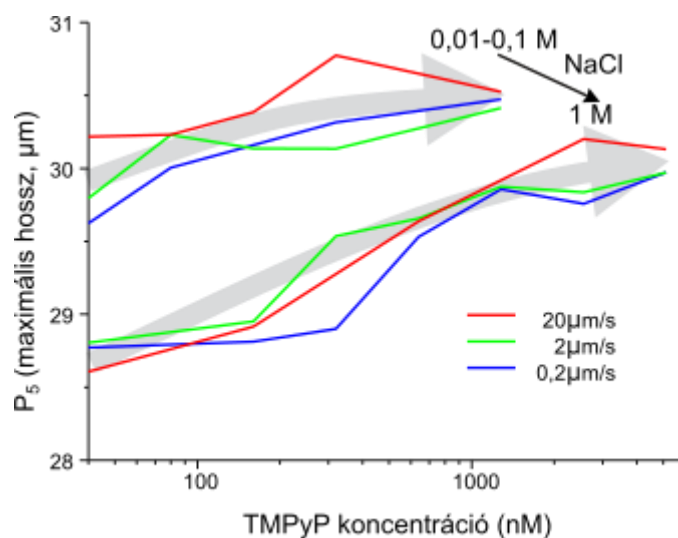
20. ábra. A P_3 paraméter (a lineáris függvény meredeksége, a túlnyújtási plató meredekségét adja meg) a TMPyP-koncentráció függvényében különböző NaCl-koncentrációk (0,01, 0,1 és 1 M) és húzási sebességek (0,2 $\mu\text{m/s}$, 2 $\mu\text{m/s}$ és 20 $\mu\text{m/s}$) mellett. A jelölések az előző ábráéval megegyezők.

A túlnyújtási átmenet magassága ($x = 25 \mu\text{m}$ távolságnál f_2 alapján) fokozatosan, a TMPyP-koncentráció függvényében csökken (21/A ábra), kivéve alacsony TMPyP-koncentrációnál, ahol átmeneti növekedést figyeltünk meg. Ezt jobban szemléltetendő, az alacsony TMPyP-koncentrációknál ($\leq 40 \text{ nM}$) lévő magasságértékek külön ábrán is szemléltetésre kerültek (21/B ábra). A megfigyelést alátámasztja az erőgörbék kereszteződése a túlnyújtási platónál (21/B kiegészítő ábrája). A NaCl-koncentráció növelése a TMPyP-vel ellentétes hatást váltott ki, azaz növelte a platómagasságot.



21. ábra. A TMPyP hatása a DNS nanomechanikájára a túlnyújtási plató tartományában. **(A)** A túlnyújtási plató magassága ($x = 25 \mu\text{m}$ távolságnál f_2 alapján) a TMPyP-koncentráció, a húzási sebesség és a NaCl-koncentráció (0,01, 0,1 és 1M) függvényében. A 0,2 $\mu\text{m/s}$, 2 $\mu\text{m/s}$, 20 $\mu\text{m/s}$ húzási sebességeket késsel, zölddel és pirossal jelöltük. **(B)** Az (A) ábrarész nagyított képe a 0-40 nM közötti TMPyP-koncentráció tartományban (szürkével jelölt terület). A kiegészítő ábrán 5 nM (piros), illetve 10 nM (kék) TMPyP-koncentrációnál (10 mM NaCl, 0,2 $\mu\text{m/s}$ húzósebesség) mért erőgörbék láthatóak, mely a TMPyP túlnyújtási plató magasságát növelő hatását szemlélteti.

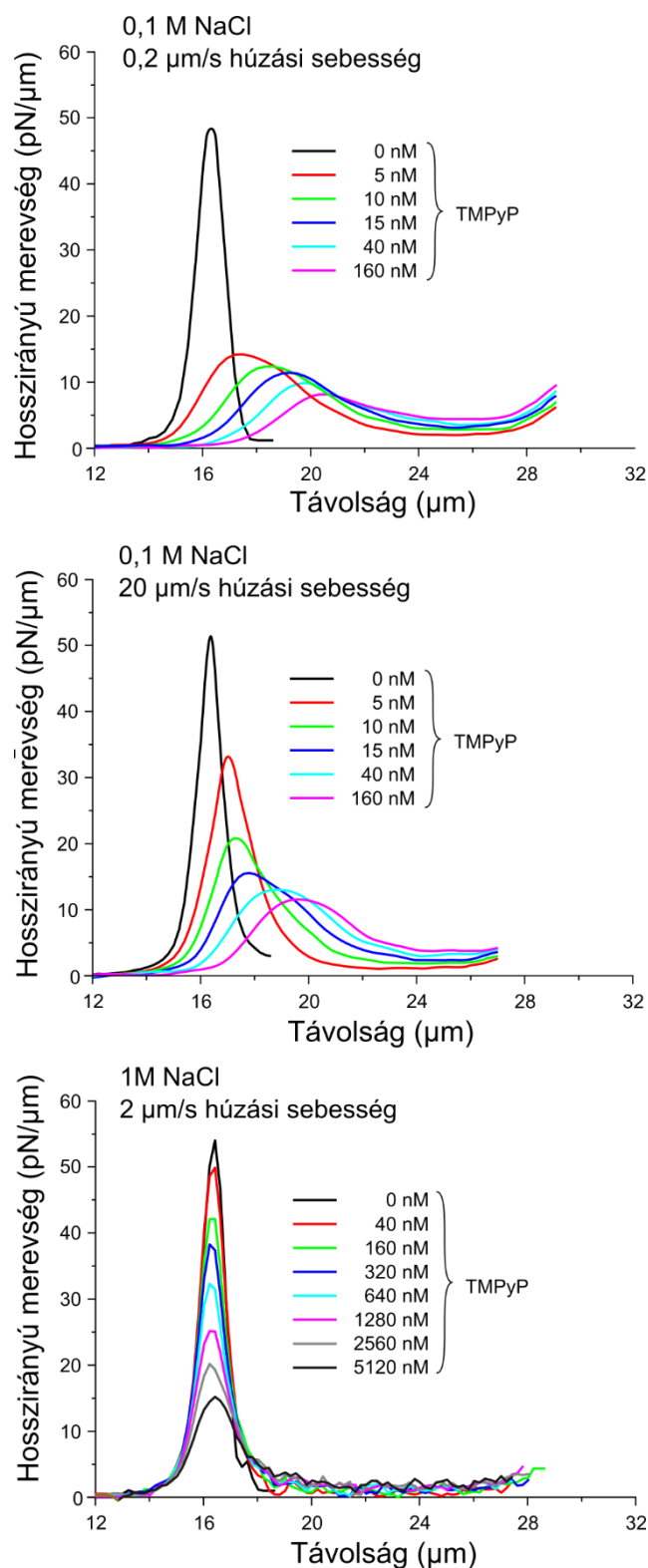
A P_5 paraméter, amely a túlnyújtott DNS-molekula maximális hosszát tükrözi, a TMPyP-koncentráció függvényében fokozatosan nőtt a maximum felé, ami arra utal, hogy a TMPyP közvetlenül az egyszálú DNS-hez is kötődhet, és annak megnyúlásához, illetve nanomechanikájának megváltozásához vezethet (22. ábra). 1 M NaCl-nál a P_5 értéke alacsony TMPyP-koncentrációnál jelentősen kisebb, majd ugyanahhoz a maximális értékhez tart a TMPyP-koncentráció növelésével. A húzási sebességnek minimális hatása volt erre a paraméterre és annak NaCl-koncentrációtól való függésére is.



22. ábra. A TMPyP hatása a DNS nanomechanikájára az aszimptotikus tartományban. P_5 paraméter (a túlnyújtott kettősszálú DNS maximális hossza) a TMPyP-koncentráció, húzási sebesség és NaCl-koncentráció függvényében.

4.1.3. Differenciált erőgörbék

Míg a P_2 paraméter jól tükrözi a kettősszálú DNS nyújthatóságát, a merevség egy szemléletesebb és jobban értelmezhető jellemzője a molekula nanomechanikai viselkedésének. A DNS azonnali, hosszirányú merevségének és a TMPyP ennek a jellemzőre gyakorolt hatásának kiszámításához numerikusan deriváltuk az erőgörbéket (23. ábra). TMPyP hiányában egy keskeny, harang alakú görbe figyelhető meg, amelynek csúcsa $16,2\ \mu\text{m}$ -nél található a távolságot – azaz a megnyújtott DNS hosszát – mutató x tengelyen, függetlenül a NaCl-koncentrációtól vagy a húzási sebességtől. Ez a pozíció – mely egyben a szigmoid függvény (24) inflexiós pontja is – megegyezik a λ -fág DNS kontúrhosszával, alátámasztva azt, hogy a P_1 paraméter tükrözi a kettősszálú DNS kontúrhosszát ezekben a kísérletekben. A DNS látszólagos merevsége (TMPyP nélkül) az $50\ \text{pN}/\mu\text{m}$ értéket veszi fel, mely elhanyagolható mértékben növekszik csak a NaCl-koncentráció függvényében. TMPyP hatására a görbe kiszélesedett, a csúcspont csökkent, és a csúcspozíció fokozatosan a nagyobb megnyúlást jelentő értékek felé tolódott a TMPyP-koncentráció növelésével. Nagy húzási sebességnél hasonló választ figyeltünk meg, bár a csúcs csökkenése és a csúcs pozíciójának eltolódása mérsékeltebb volt. $1\ \text{M}$ NaCl jelenlétében a csúcs jobbra tolódása teljesen megszűnt, de a növekvő TMPyP-koncentrációk továbbra is csökkentették a DNS merevségét. Ebben az esetben a differenciált görbéken nem alkalmaztunk simítást, szemléltetve a mérési adatok, illetve a numerikus differenciálás során fellépő zaj alacsony mértékét.

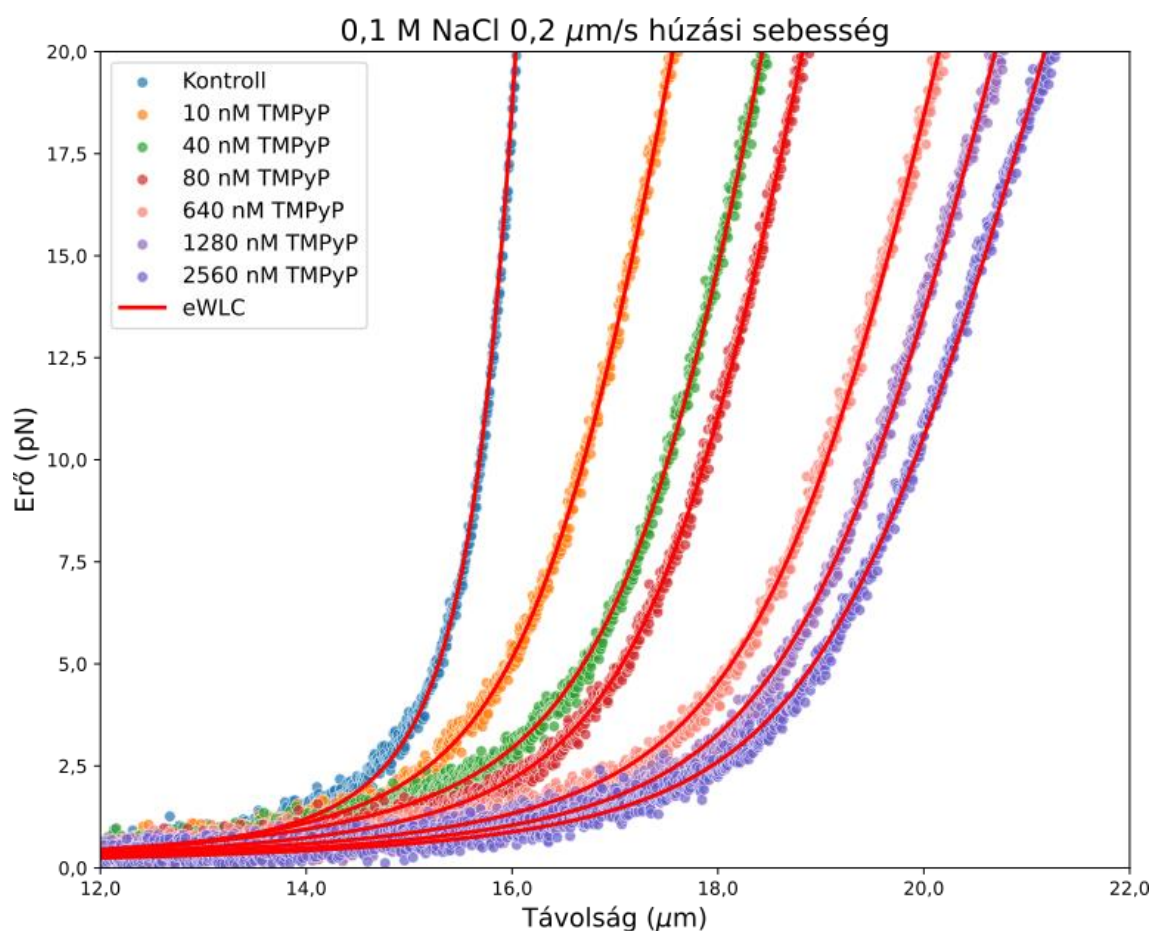


23. ábra. Derivált erőgörbék 3 különböző esetben: 0,1 M NaCl, 0,2 μm/s; 0,1 M NaCl és 20 μm/s; 1 M NaCl és 2 μm/s. A TMPyP-koncentrációkat különböző színekkel jelöltük az ábrán feltüntetett módon. Az alsó ábrán (1M NaCl) az erőgörbéken nem alkalmaztunk simítást.

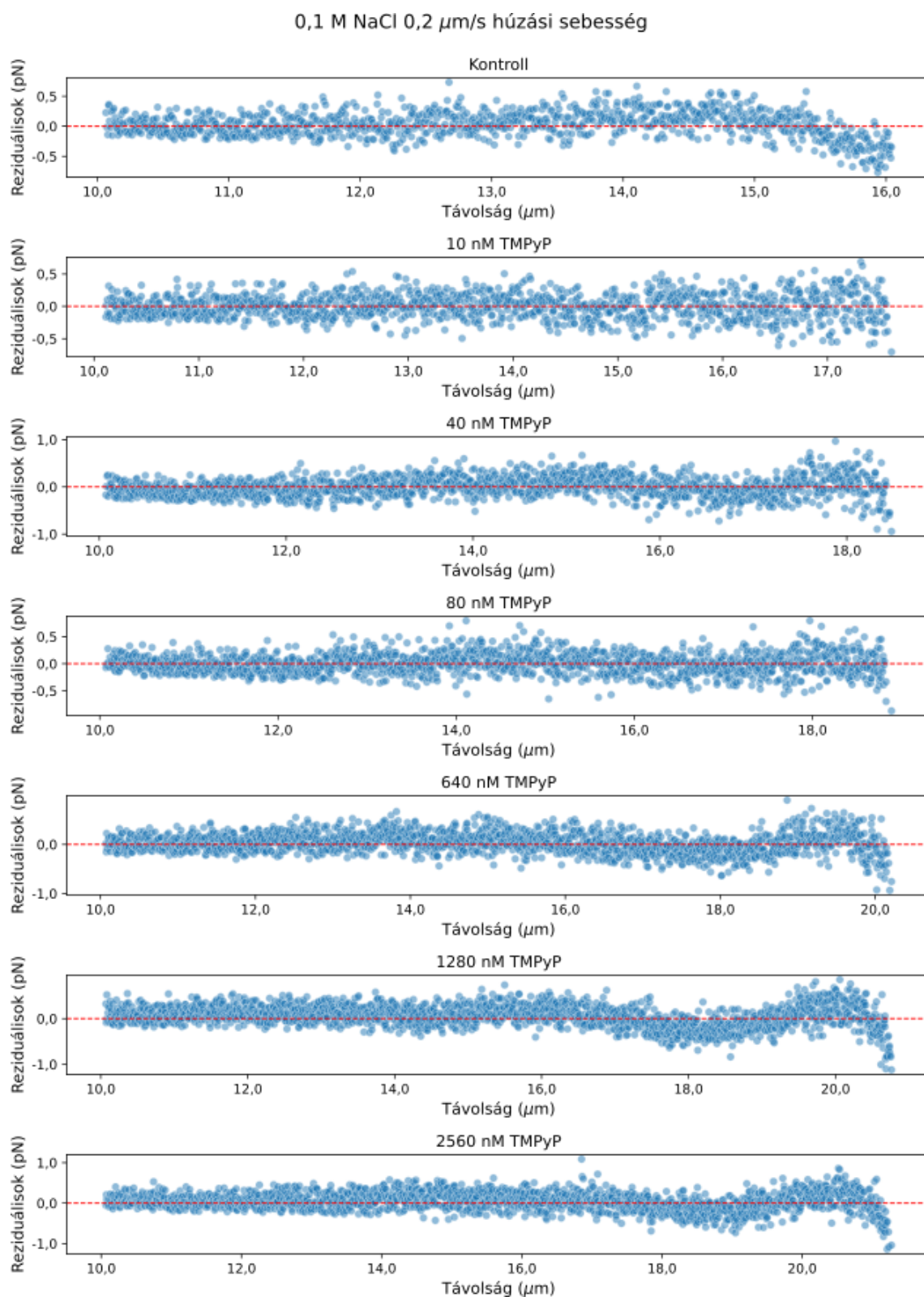
4.1.4. eWLC modell illesztése az erőgörbékre

Az erőgörbék vizsgálatánál a konvencionális polimermodellek használata, mint például az eWLC modell, kiemelt jelentőséggel bír, mivel paramétereik közvetlen fizikai jelentéssel bírnak, ezáltal lehetővé téve a valós fizikai összefüggések pontosabb feltérképezését. Ezen felül ez lehetőséget biztosított arra, hogy összevessük a két modellből származó eredményeket.

Ennek érdekében 0,1 M NaCl-koncentrációnál mindhárom húzási sebességnél, 6 TMPyP-koncentrációnál szisztematikusan elvégeztük az illesztéseket az erőgörbékre, melyet az alábbi ábra is szemléltet 0,2 $\mu\text{m/s}$ esetében (24. ábra). Az illesztések jóságának megállapításához a reziduálisokat is figyelembe vettük, melyek a 25. ábrán láthatóak.

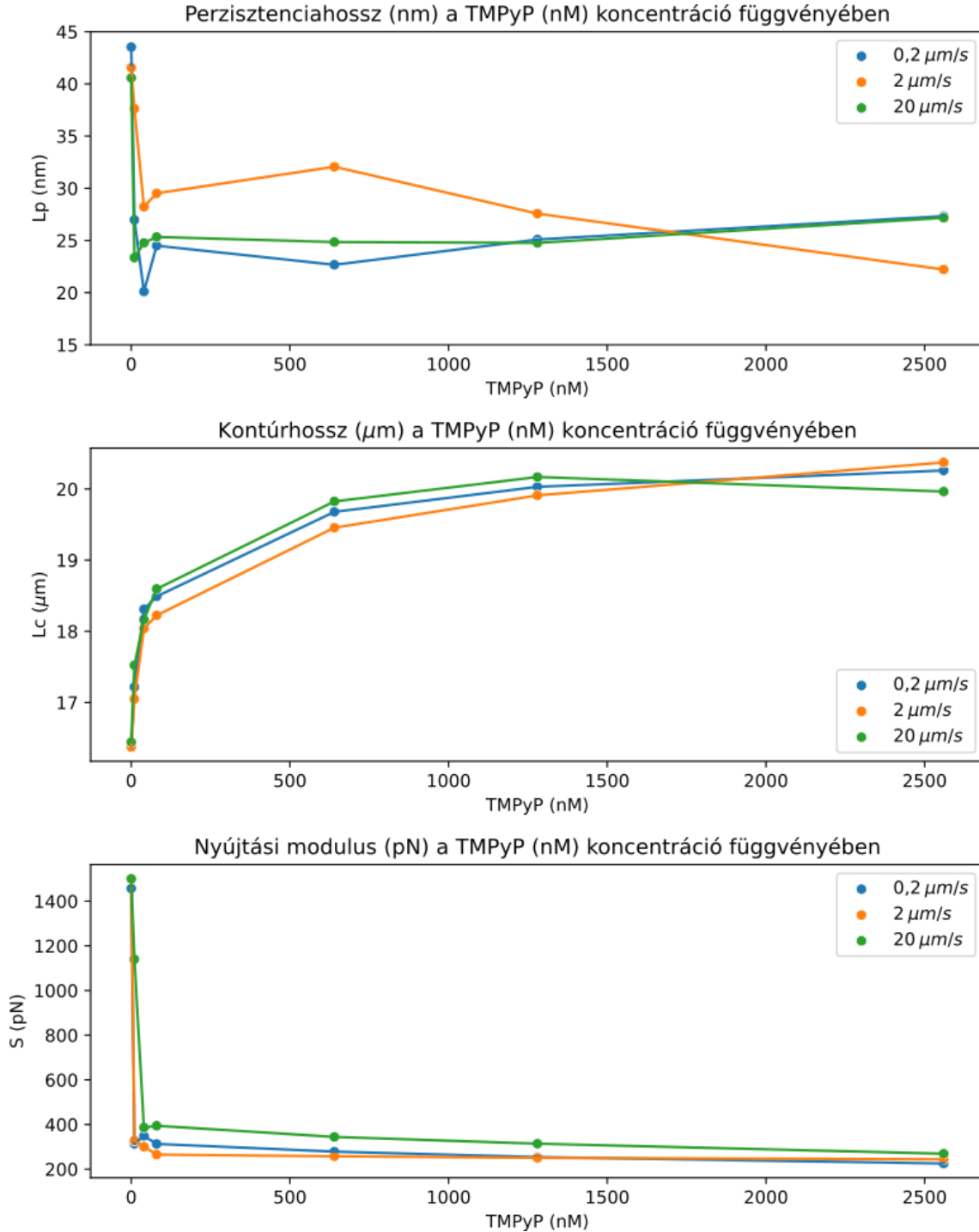


24. ábra. eWLC polimermodell illesztések különböző TMPyP-koncentrációknál mért DNS-erőgörbékre 0,1 M NaCl és 0,2 $\mu\text{m/s}$ húzási sebesség esetében. A mérési adatokat különböző – az ábrán feltüntetett rendszer szerint – színű pontok jelölik, míg az illesztett függvényt, minden esetben piros görbe jelöli.



25. ábra. A 24. ábrán látható eWLC illesztésekből származó reziduálisok a kontroll erőgörbe, illetve különböző TMPyP-koncentrációk esetében, 0,1 M NaCl és 0,2 $\mu\text{m/s}$ húzási sebességnél.

Az eWLC illesztésekből meghatározható a DNS perzisztenciahossza (L_p), kontúrhossza (L_c) és nyújtási modulusa (S) különböző TMPyP-koncentrációknál és húzási sebességeknél, melyek az alábbi, 26. ábrán láthatóak.



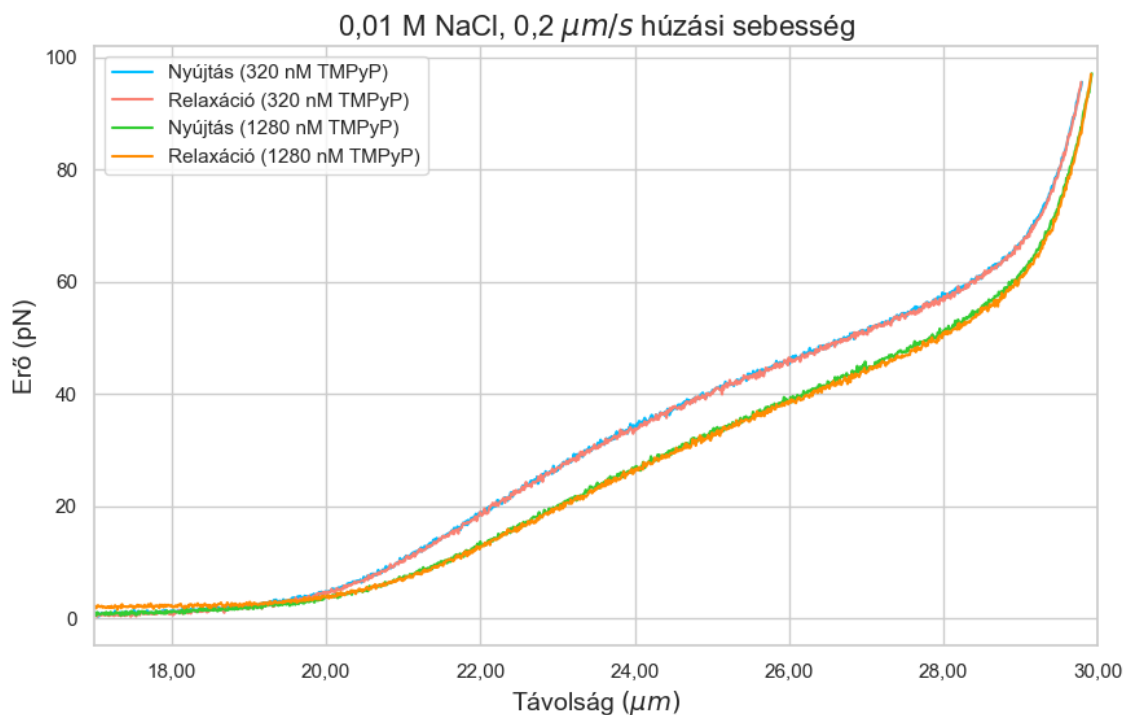
26. ábra. A DNS perzisztenciahossza (L_p), kontúrhossza (L_c) és nyújtási modulusa (S) a TMPyP-koncentráció függvényében, mindhárom húzási sebességnél (kék: 0,2 $\mu\text{m/s}$, narancs: 2 $\mu\text{m/s}$ és zöld: 20 $\mu\text{m/s}$) 0,1 M NaCl-koncentráció mellett.

Látható, hogy a húzási sebességek tekintetében nincs számottevő különbség a 3 illesztési paraméter értékeiben. A meghatározó tényező a TMPyP hatása, mely főként alacsony koncentrációk esetén fejt ki jelentős hatást a DNS-t jellemző 3 paraméterre. A kettősszájú DNS kontúrhossza alacsony TMPyP-koncentrációk mellett jelentősen, majd 80 nM-tól kezdve kisebb mértékben növekedett, míg el nem ért egy ~ 20 μm -es platót. A perzisztenciahossz és a nyújtási modulus jelentősen csökkent alacsony TMPyP-koncentrációknál, és rendre 25 nm, valamint 300 pN körüli értékeken stabilizálódott. A fentiek alapján elmondható tehát, hogy a kettősszájú DNS nyújthatóbbá és hajlékonyabbá vált a TMPyP megkötése után.

4.1.5. Mechanikai reverzibilitás vizsgálata

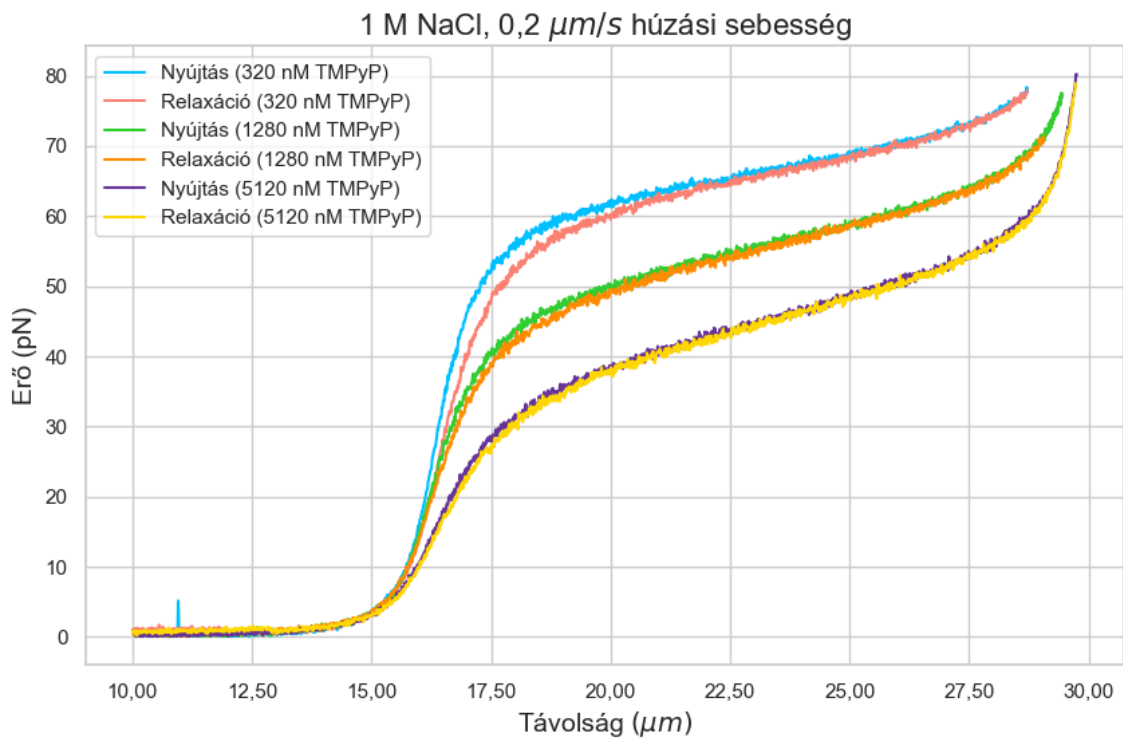
Tekintettel arra, hogy az entalpikus tartományban a kettősszájú DNS szerkezete torzulhat (18., 19. és 23. ábrák), a nyúlási és relaxációs erőgörbék összehasonlításával megvizsgáltuk, hogy a molekuláris rendszer egyensúlyban van-e.

Alacsony NaCl-koncentráció (0,01 M) és húzási sebesség (0,2 $\mu\text{m/s}$) mellett a TMPyP-koncentráció széles tartományában nem tapasztaltunk hiszterézist az erőgörbéken, ami azt jelzi, hogy a rendszer a nanomechanikai kísérlet során végig termodinamikai egyensúlyban volt (27. ábra).

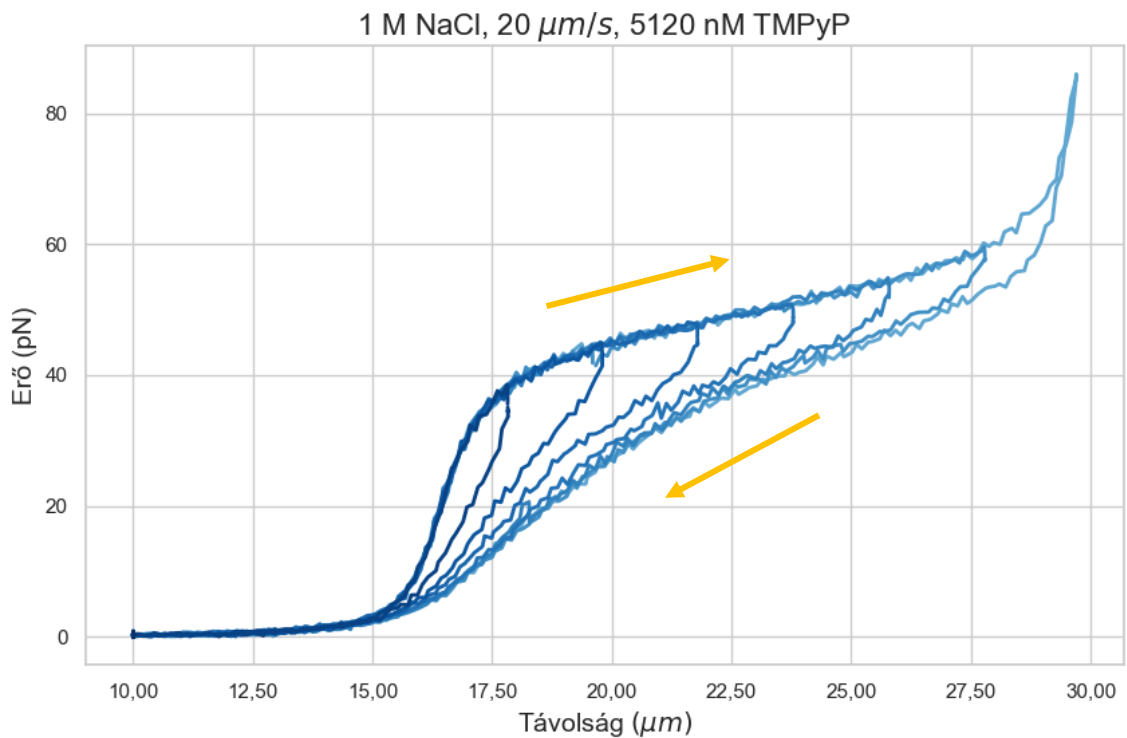


27. ábra. A kettősszalú DNS-TMPyP komplex erőgörbéjének mechanikai reverzibilitásvizsgálata 0,01 M NaCl és 0,2 $\mu\text{m/s}$ húzási sebesség mellett 320 nM (kék: nyújtás, piros: relaxáció) és 1280 nM (zöld: nyújtás, narancs: relaxáció) TMPyP mellett.

A NaCl-koncentráció 1 M-ra történő növelésével kismértékű hiszterézis jelent meg alacsony TMPyP-koncentráció mellett (320 nM TMPyP, 28. ábra). Azonban ez magasabb TMPyP-koncentrációkon jelentősen csökkent (1280 nM), illetve el is tűnt (5120 nM) az alkalmazott 0,2 $\mu\text{m/s}$ húzási sebesség esetében (28. ábra). Egy szisztematikus nanomechanikai kísérlettel (1 M NaCl, 20 $\mu\text{m/s}$ húzási sebesség és 5120 nM TMPyP mellett), mely során a maximális megnyújtást fokozatosan csökkentettük, kimutattuk, hogy az entalpiikus tartományon belül fennáll a reverzibilitás, és a hiszterézis csak akkor keletkezik, ha a DNS belépett a túlnyúlási átmenetbe (29. ábra).



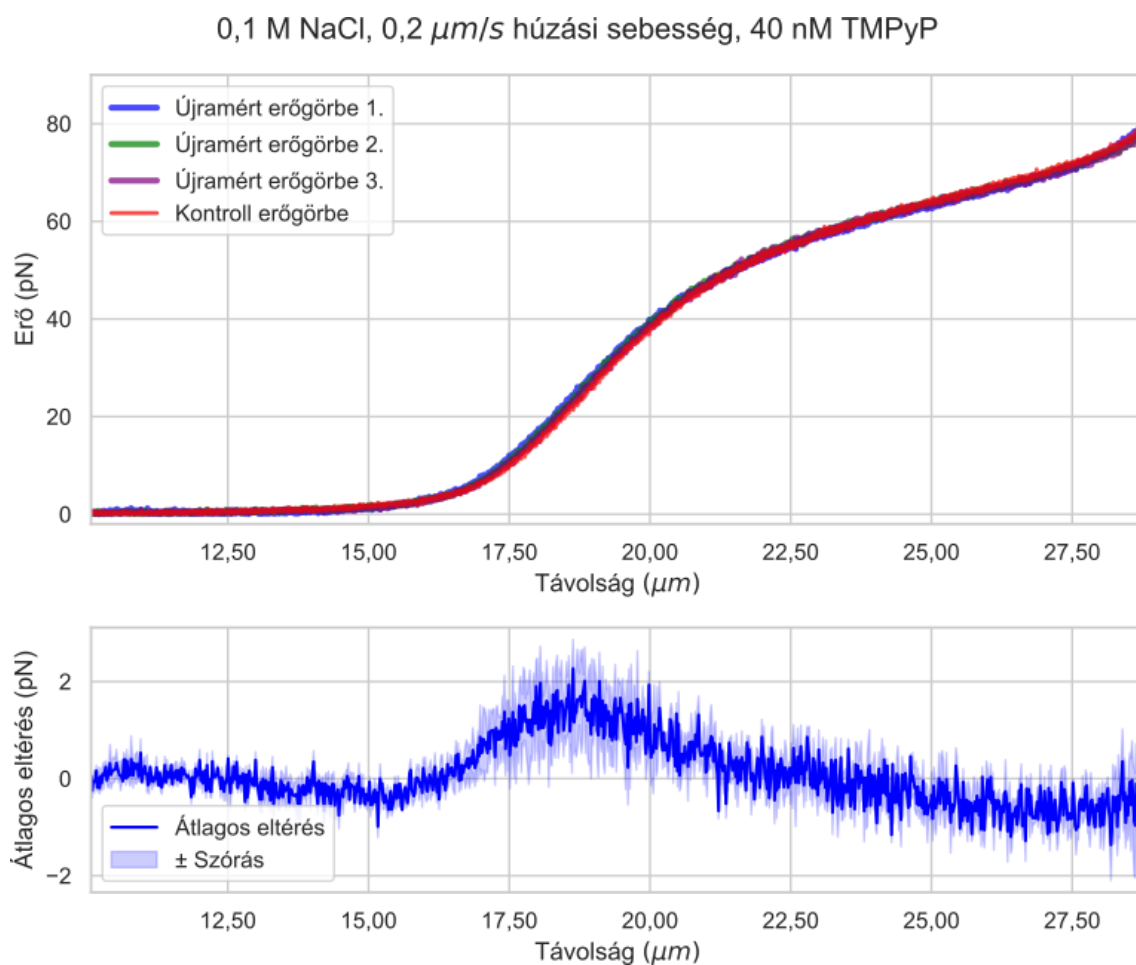
28. ábra. A kettősszájú DNS-TMPyP komplex erőgörbéjének mechanikai reverzibilitás-vizsgálata 1 M NaCl és 0,2 $\mu\text{m/s}$ húzási sebesség mellett 320 nM (kék: nyújtás, piros: relaxáció), 1280 nM (zöld: nyújtás, narancs: relaxáció) és 5120 nM (lila: nyújtás, sárga: relaxáció) TMPyP mellett. Látható, hogy a nyújtási és a relaxációs görbék (odavissza erőgörbék) között kialakult hiszterézis a TMPyP-koncentráció növelésével fokozatosan csökken, illetve eltűnik.



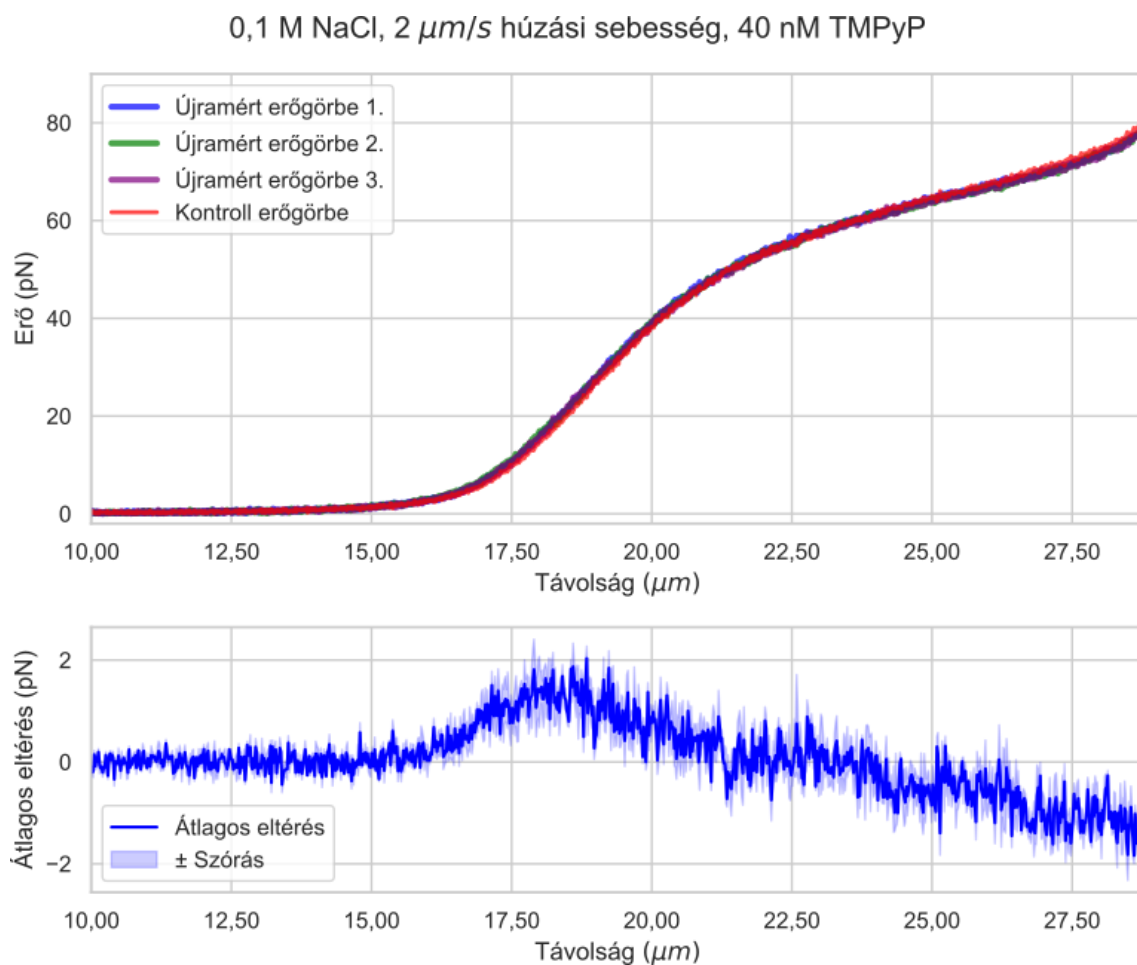
29. ábra. A maximális nyújtás hatása a mechanikai reverzibilitásra 20 $\mu\text{m/s}$ húzási sebességnél 1 M NaCl és 5120 nM TMPyP mellett. A DNS-molekulát egymást követő mechanikai ciklusokban, fokozatosan csökkenő maximális nyújtási hossz mellett nyújtottam meg, majd engedtem vissza a kezdeti megnyújtási hosszra (10 μm). Az egymást követő mechanikai ciklusokat a halványodó színek mutatja, kezdve a halványabb kékkel jelölt legnagyobb megnyújtást jelentő ciklussal, a sötétkék színnel jelzett, legrövidebb ciklusig. Az erőgörbék egy cikluson belüli nyújtási, majd relaxációs irányait sárga nyilak jelölik.

4.1.6. Reprodukálhatóság vizsgálata

A különböző esetekben történő mérések pontosságának meghatározásához több esetben újramértem az adott erőgörbéket. Az új mérésekből származó görbéket ezután összevettem a korábbiakban ismertetett illesztéseknél használt adott erőgörbével (kontroll erőgörbe). Ezen új mérési eredményeket, a 3 újramért görbe erőben vett (y irányú), kontrolltól való eltéréseinek átlagát és szórását az alábbi ábrák szemléltetik a különböző esetekben (30-32. ábrák).

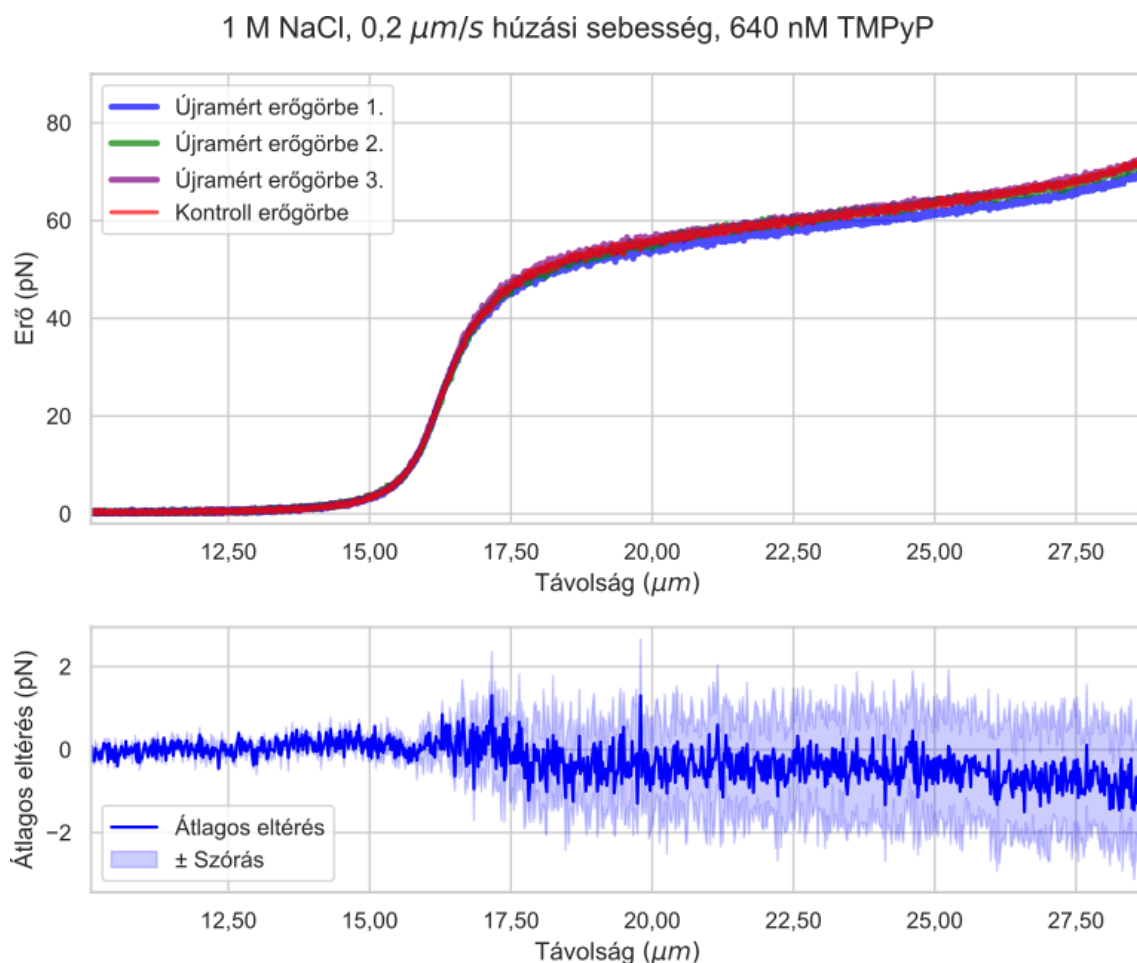


30. ábra. Újramért és kontroll erőgörbék összehasonlítása 0,1 M NaCl, 0,2 $\mu\text{m/s}$ húzási sebesség és 40 nM TMPyP esetében. A felső ábrarészen négy erőgörbe látható, a kontroll erőgörbét piros szín jelöli. Az alsó ábrarészen az új mérések átlagos erőben vett eltérése és szórása került ábrázolásra a kontrollhoz képest. Az átlagos eltérést sötétkék szín, míg a $\pm$ szórást halványkék tartomány jelöli. Mindkét ábrarész x tengelye azonos tartományú a jobb összehasonlíthatóság érdekében.



31. ábra. Újramért és kontroll erőgörbék összehasonlítása 0,1 M NaCl, 2 $\mu\text{m/s}$ húzási sebesség és 40 nM TMPyP esetében. A jelölések az előző ábrával megegyezők.

Az átlagos eltérés a mérési beállítások reprodukálhatóságát, míg a szórás a molekuláris folyamatokból adódó variabilitást hivatott kvantifikálni.



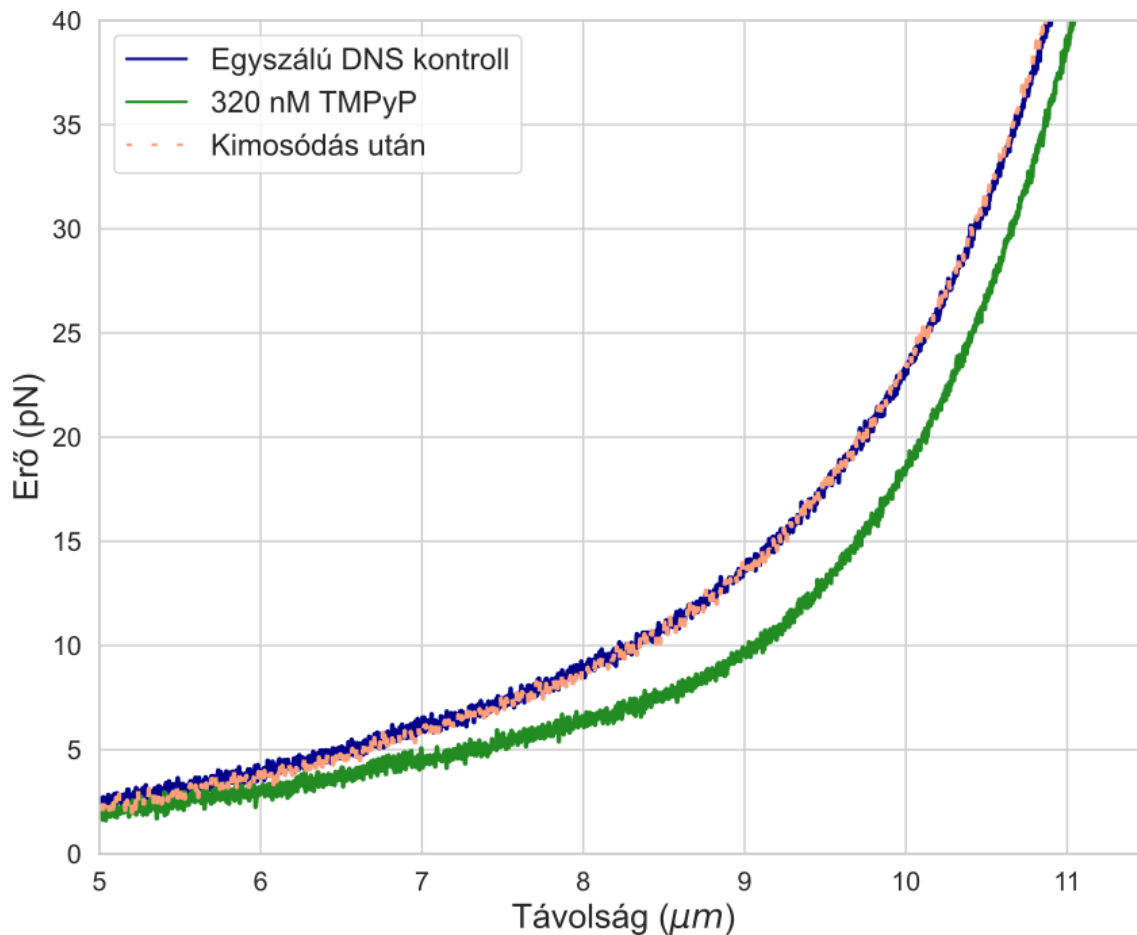
32. ábra. Újramért és kontroll erőgörbék összehasonlítása 1 M NaCl, 0,2 $\mu\text{m/s}$ húzási sebesség és 640 nM TMPyP esetében. A jelölések az előző két ábráéval megegyezők.

Megfigyelhető, hogy csak a magasabb (640 nM) TMPyP-koncentrációnál mért esetben (32. ábra) növekedett meg kisebb mértékben a szórás, míg az átlagos eltérés hasonló mértékűnek bizonyult mindhárom esetben. Érdekes módon a megnövekedett szórás az entalpiikus tartomány végétől, illetve a túlnyújtási átmenet kezdetétől észlelhető, ami magyarázható a komplex kötődési folyamatokból eredő fluktuációval, mely magasabb TMPyP-koncentráción hangsúlyosabbá válhat.

4.1.7. Egyszálú DNS-erőgörbék

Annak tesztelésére, hogy a TMPyP valóban kötődik-e az egyszálú DNS-hez, közvetlenül is megmértem a porfirinmolekula nanomechanikai hatását egyszálú DNS-molekulákon. A DNS-t pufferben nyújtottam meg mérve a kontroll erőgörbét, majd 320 nM TMPyP mellett végeztem mérést, végül szintén pufferben gyenge áramlás mellett hagytam, hogy az esetlegesen még a szálhoz kötődő TMPyP-molekulák disszociáljanak.

Ezt követően újabb erőgörbét vettem fel annak vizsgálatára, hogy kimosódás után visszakapható-e az eredeti kontroll erőgörbe, azt vizsgálva, hogy a kötési folyamat valóban teljesen reverzibilis-e (33. ábra).

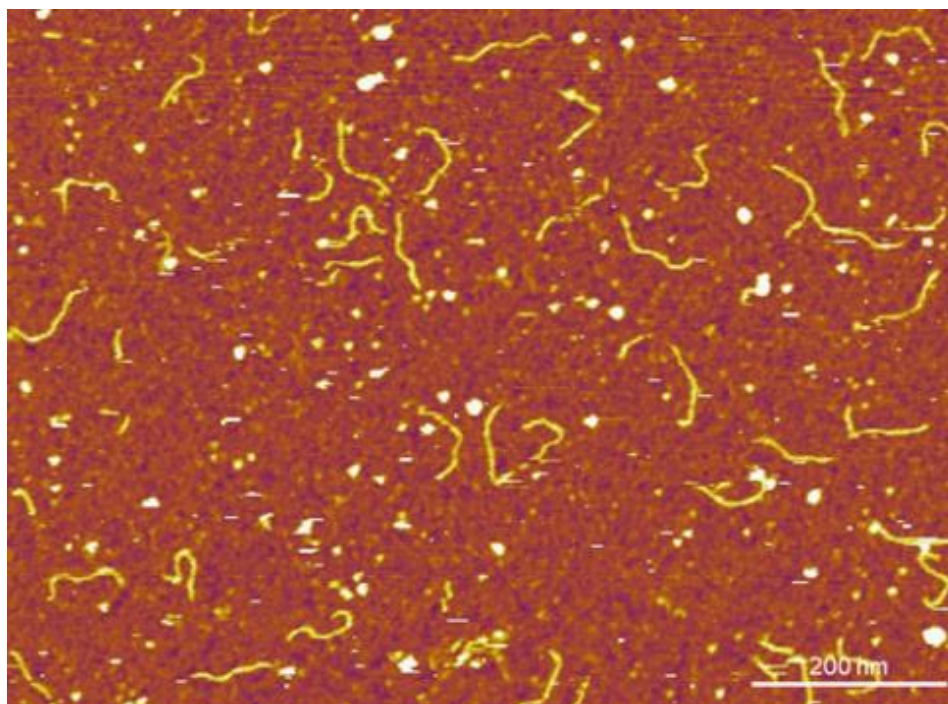


33. ábra. Egyszálú DNS erőgörbéi kontroll (TMPyP nélkül, kék) és 320 nM TMPyP mellett (zöld), továbbá a TMPyP pufferben, áramlás segítségével végzett kimosása után újramért görbe (világos narancsságra). A feltüntetett erőgörbék mind egyazon DNS-molekulához tartoznak.

A TMPyP hatása egyértelműen jelentkezik a két erőgörbe összehasonlításánál, az egyszálú DNS kontúrhosszát és perzisztenciahosszát is megváltoztatja. A kontroll görbét összehasonlítva a TMPyP kimosódása után mért görbével látható, hogy nincs különbség, a folyamat teljesen reverzibilis a DNS-szál nanomechanikájára nézve.

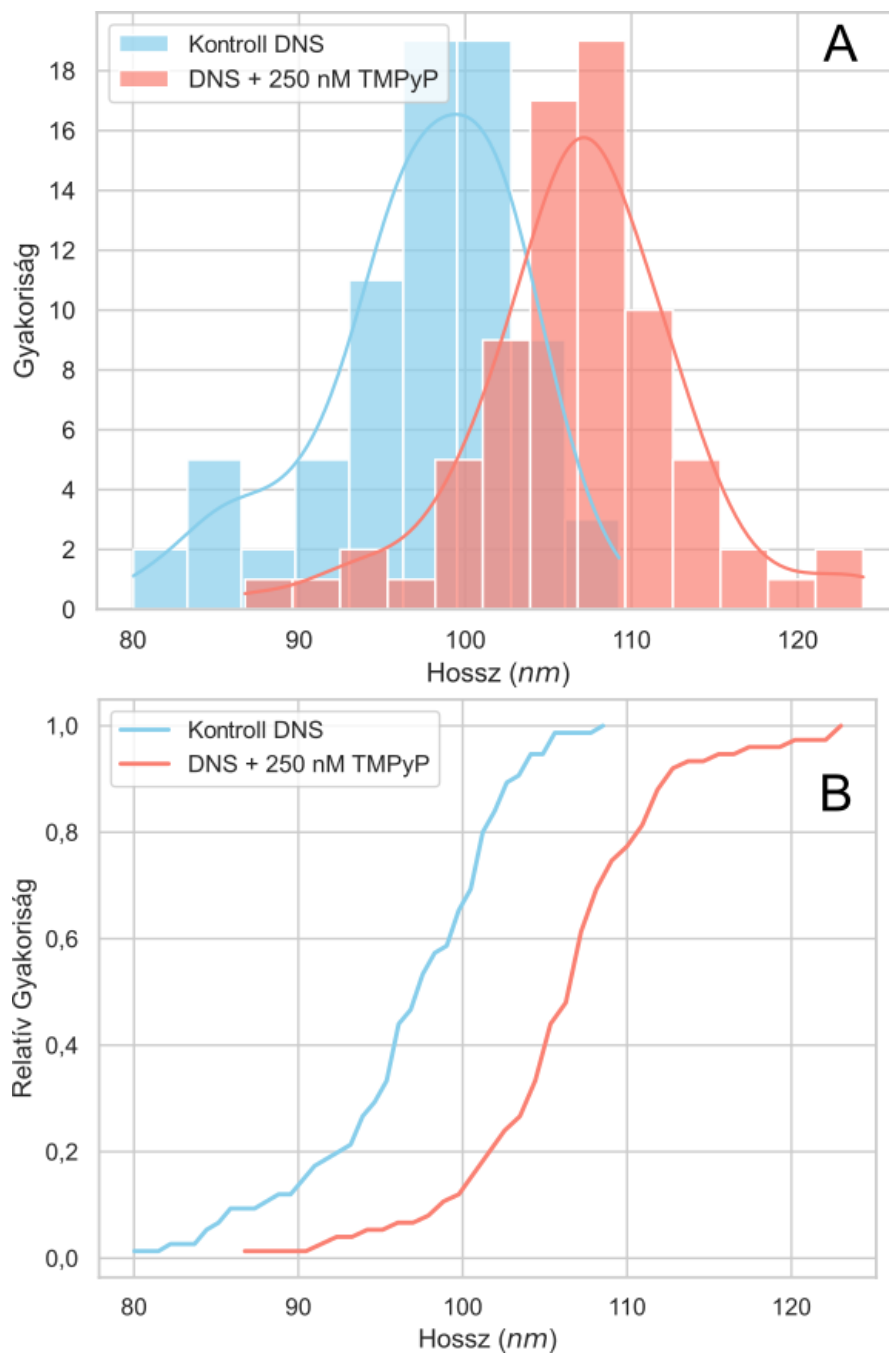
4.2. TMPyP-hatás atomierő-mikroszkópiával (AFM) történő vizsgálata

A TMPyP DNS hosszát megnövelő hatását a felülethez kötött kettősszalú DNS-molekulák kontúrhosszáinak AFM-mel végzett közvetlen mérésével is vizsgáltuk. A poli-L-lizinre felvitt DNS-ek atomierő-mikroszkópos képét az alábbi ábra mutatja (34. ábra). Mind kontroll, mind pedig TMPyP-vel kezelt esetben, több kép alapján 75-75 DNS-t vizsgáltunk meg.



34. ábra. AFM-kép 300 bázispár hosszúságú, 250 nM TMPyP-vel kezelt, kettősszalú DNS-molekulákról poli-L-lizinnel bevont csillámfelületen. A jobb alsó sarokban lévő fehér szakasz jelöli a 200 nm-es hosszúságot.

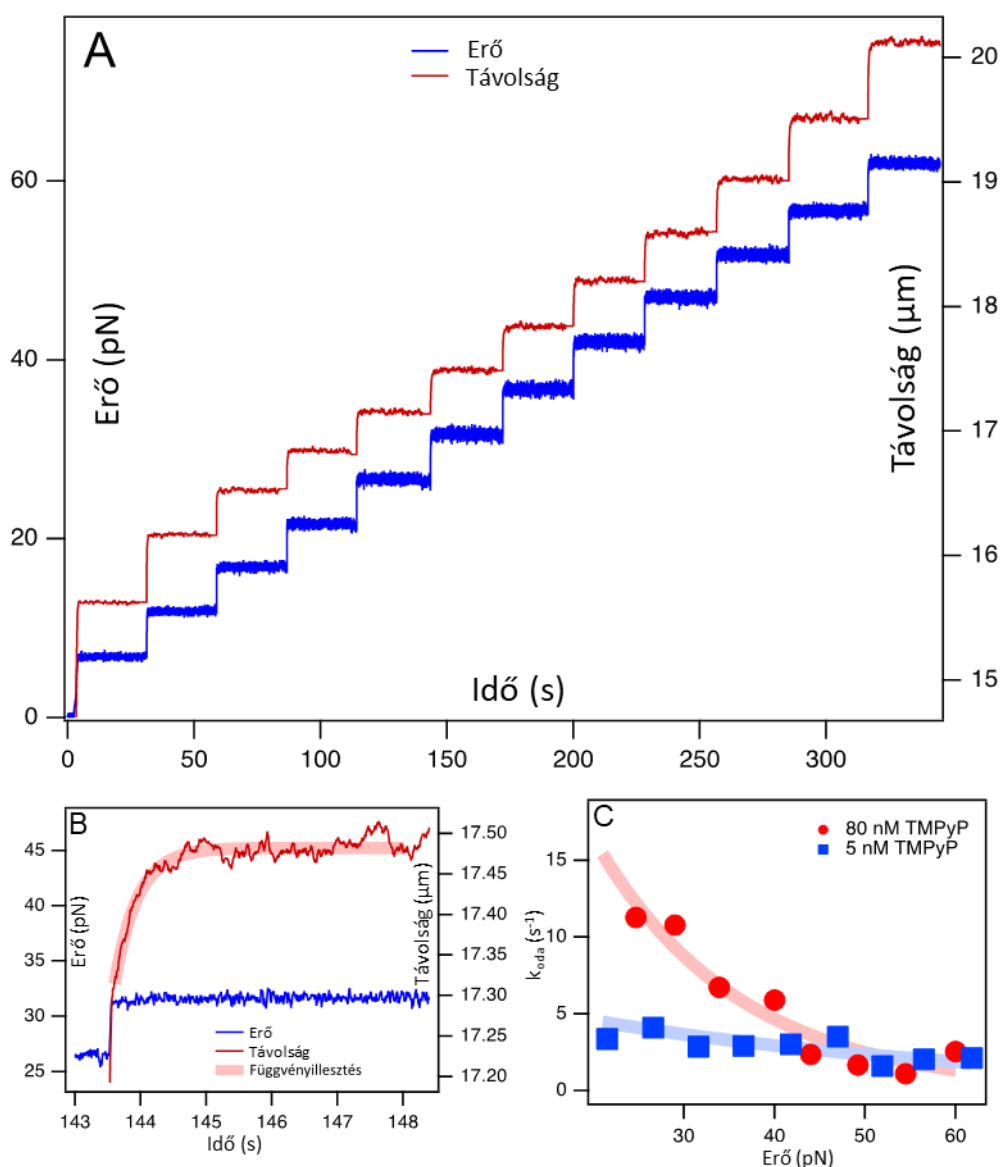
250 nM TMPyP és 0,1 M NaCl jelenlétében a kontrollhoz képest 9,9%-os kontúrhossz-növekedést mértünk. Ezen eredmények szemléletes alátámasztásául szolgál a 35. ábra, mely a kontroll és a 250 nM TMPyP-vel kezelt DNS-ek kontúrhosszáinak eloszlását mutatja hisztogrammon (35/A ábra) és kumulatív eloszlásfüggvénnyel (35/B ábra).



35. ábra. A kontroll (300 bp, kék) és a TMPyP-vel kezelt (250 nM, piros) kettősszállú DNS-molekulák kontúrhosszainak eloszlását bemutató **(A)** hisztogramok és **(B)** kumulatív eloszlásfüggvények.

4.3. A molekuláris erőlépcső kinetikai analízise

A TMPyP kettőszálú DNS-hez történő kötődésének és disszociációjának részletesebb leírása érdekében perturbációs kinetikai kísérleteket végeztem egyedi DNS-molekulákon. Erre irányulón kétféle kísérletet hajtottam végre: i) molekuláris erőlépcső (3.2.2. fejezet) ii) TMPyP-koncentrációugrás (3.2.5. fejezet). Az erőlépcsős kísérleteket 5 és 80 nM TMPyP-koncentrációnál végeztem, a DNS-molekulát fokozatosan, 5 pN-os lépésekben növekvő húzóerőnek kitéve, az adott erőt állandóan tartva egy visszacsatolási rendszer („Force Clamp”) segítségével, míg a rendszer teljes egyensúlyba nem került (nem volt további DNS-hossznövekedés). Tehát az erőnövekedés, továbbá a bekötődő TMPyP-molekulák növelték a DNS hosszát, amely végül stabilizálódott egy új egyensúlyi helyzetben. Így a DNS-TMPyP kötési egyensúlyt egyfajta perturbációs hatásnak tettem ki, a hirtelen megnövelt húzóerő által. A hossznövekedés körülbelül 90%-a az erőugrás alatt történt, de a DNS hossza az erő stabilizálódása után is tovább nőtt. Ez a hossznövekedés így már csak a TMPyP-kötődés hatásának tulajdonítható és $1 - e^{-x}$ alakú függvényt követett. Az illesztésekből kiszámítottuk a hossznövekedés erőfüggő sebességét ($k(F)$) mind 5, mind 80 nM TMPyP esetében. A k_0 értékeket a (22) egyenletnek az adatokra történő illesztésével számoltuk, melyek 5 és 80 nM TMPyP estében rendre $7,1 (\pm 0,7)$ és $57,9 (\pm 17,5) \text{ s}^{-1}$ -nak adódtak, ami rendre $0,68 \text{ nM}^{-1}\text{s}^{-1}$ és $3,7 \text{ s}^{-1}$ k_{on} és k_{off} értékeket eredményezett a (23) egyenlet alapján (36. ábra).



36. ábra. A kettősszájú DNS-TMPyP kötődés perturbációs kinetikai elemzése, a molekuláris erőlépcső esetében. **(A)** Molekuláris erőlépcső kísérlet 5 nM TMPyP-koncentráció mellett. Az erőt hirtelen, 5 pN-os lépésekben növeltem, majd egy visszacsatolási mechanizmus („Force Clamp”) segítségével állandóan tartottam. **(B)** A kettősszájú DNS hosszadatainak illesztése abban a tartományban, ahol az erő már a beállított értéken stabilizálódott (rózsaszínnel jelölt szakasz). **(C)** A TMPyP-kötődés k_{oda} értékei az erő függvényében 5 és 80 nM TMPyP esetében.

4.4. Koncentrációprofil mentén végzett kísérletek

4.4.1. A koncentrációprofil karakterizálása

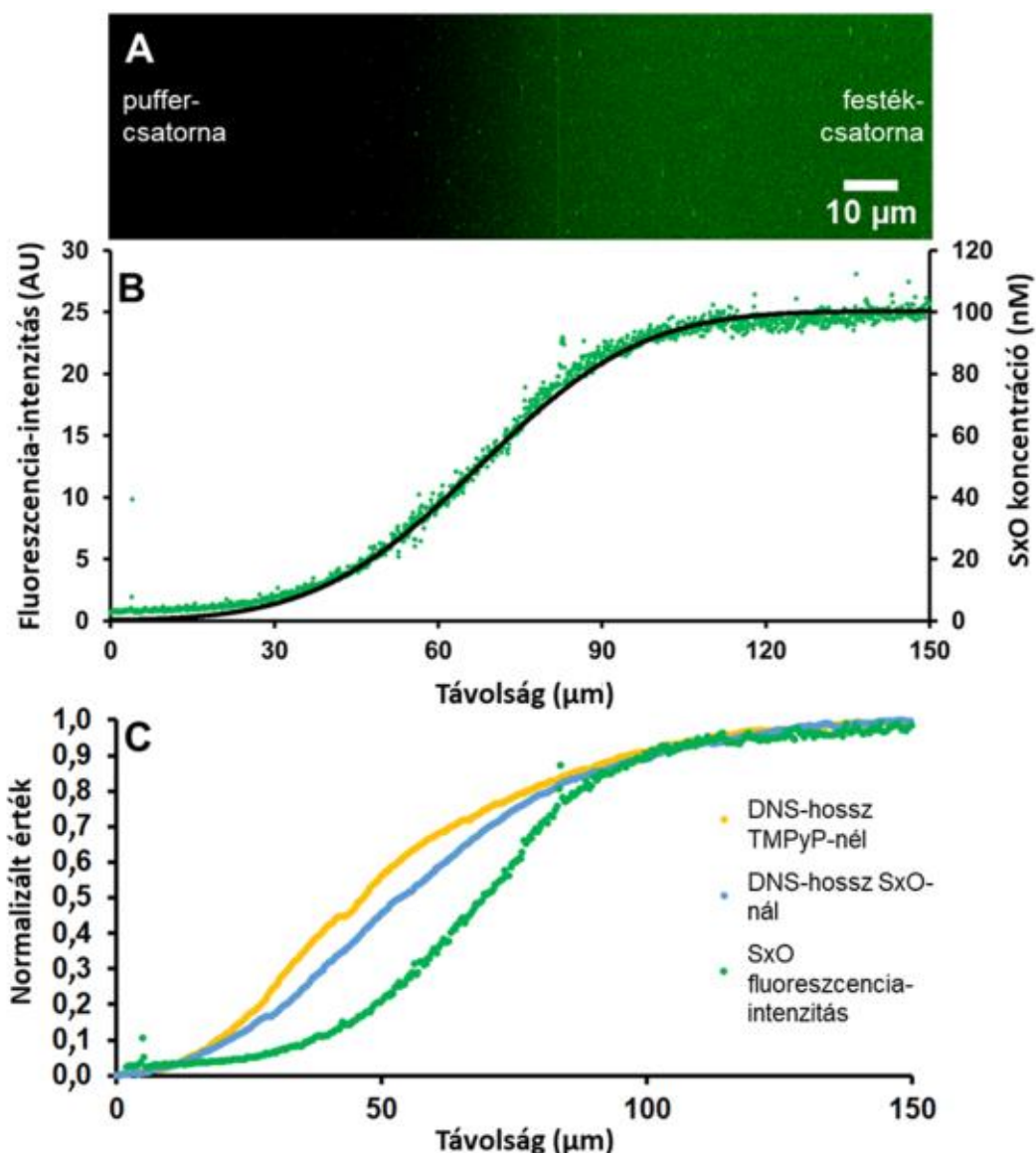
Munkám során vizsgáltam a diffúzió következtében kialakuló koncentrációprofil karakterizálhatóságát és alkalmazhatóságát is egymolekula biofizikai megközelítésben.

Míg a lézercsipesz és a fluoreszcens mikroszkópia lehetővé tette a DNS mechanikai manipulációját (a molekula pozicionálása, nyújtása, relaxálása), illetve a képkalkotást, addig a többcsatornás mikrofluidikai cellával megvalósítható az oldat hatékony szabályozása és koncentrációgradiens létrehozása a szomszédos mikrocatornák határán. A koncentrációgradiens kialakításához a két szomszédos lamináris áramlású mikrocatorna egyike magas koncentrációban tartalmazta a DNS-kötő molekulákat (SxO, TMPyP), míg a szomszédos csatorna csak puffert tartalmazott.

A kialakuló koncentrációprofil az SxO fluoreszcenciáján alapuló képkalkotással, valamint DNS segítségével történő mechanikus pásztázással jellemeztük. Az alkalmazott SxO-koncentráció 100 nM volt. A puffer és a festék mikrocatornák határterületének vizsgált tartományán végzett fluoreszcencia-képkalkotás egy olyan területet mutatott, ahol a fluoreszcenciaintenzitás fokozatosan nőtt a puffercsatornától a festékcatorna felé (37/A ábra). A megfelelő intenzitásprofil ábrája egy szigmoidális függvényt mutatott, amely jól illeszthető a (18) egyenlettel (37/B ábra).

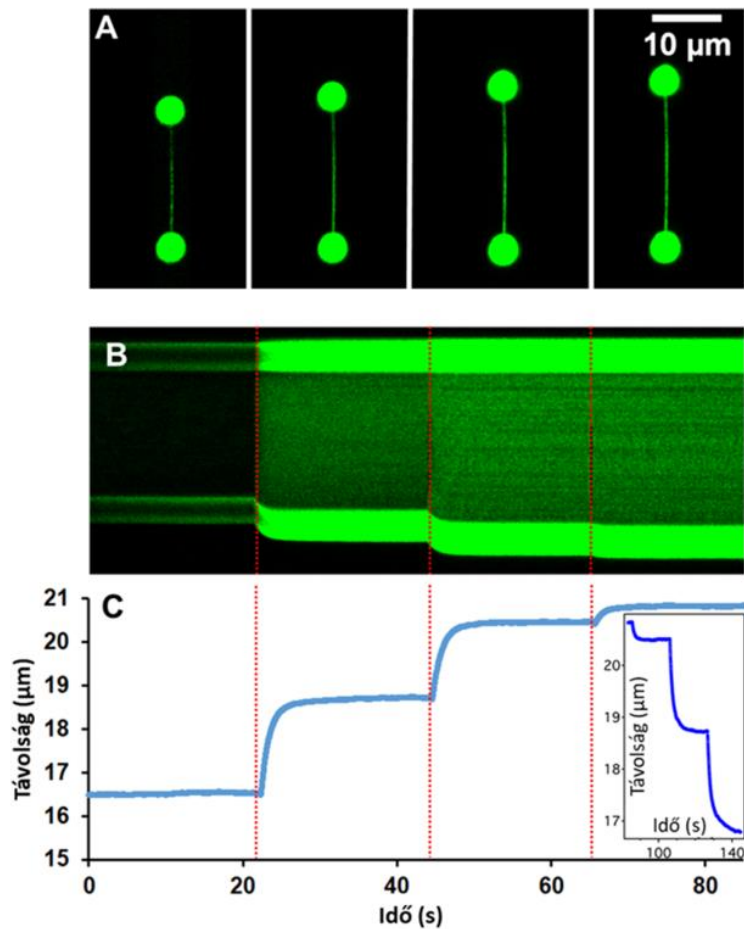
Az illesztés $23,3 \pm 0,1 \mu\text{m}$ diffúziós távolságot eredményezett, mely alapján az alkalmazott beállítások (DNS-kötő molekula maximális koncentrációja, áramlási sebesség, a két csatorna összefolyásától vett távolság) mellett körülbelül $46 \mu\text{m}$ távolság áll rendelkezésre, amelyen keresztül a festékmolekula koncentrációja megközelítőleg lineárisan változik 20-80 nM között (37/B és C ábrák).

A koncentrációprofil mechanikai pásztázása kissé eltérő eredményeket adott. A DNS-hosszabbodás (normalizált hossznövekedés) és a távolság (koncentrációprofil mentén) függvénye mind az SxO, mind a TMPyP esetében szigmoid jellegű görbét mutatott, bár az alakjuk kissé eltért a fluoreszcencia-intenzitásprofil alakjától. Az SxO-görbének a (18) egyenlettel történő illesztése $29,0 \pm 0,2 \mu\text{m}$ távolságot eredményezett. A mechanikus pásztázás alapján tehát körülbelül $58 \mu\text{m}$ távolság áll rendelkezésre, amelyen keresztül az SxO koncentrációja megközelítőleg lineárisan változik 20-80 nM között (37/C ábra).



37. ábra. A mikrofluidikai cellában két mikrocsatorna között kialakuló koncentrációprofil karakterisztikája. **(A)** Pásztázó konfokális mikroszkópos kép két, szomszédos mikrocsatorna közötti (puffer- és festékcsatorna) területről. A puffer- és a festék- (SxO) csatornák a kép bal, illetve jobb oldalán helyezkednek el. A kezdeti SxO-koncentráció (jobbra) 100 nM. A zöld színezés mesterséges. **(B)** Az SxO koncentrációprofilja mentén mért fluoreszcenciaintenzitás (zöld pontok). A (18) egyenletet használtuk a kísérleti adatok illesztésére (fekete folytonos vonal). **(C)** Az SxO (kék) és TMPyP (sárga) koncentrációprofilok mechanikus pásztázása által kialakult, normalizált DNS-hosszabbodás, a 35 pN állandó erővel megfeszített DNS-molekula 18,5 $\mu\text{m/s}$ állandó sebességgel történő mozgásával. Referenciaként az SxO fluoreszcenciaintenzitás adatai is láthatóak az ábrán (zöld).

Az SxO fluoreszcens interkaláló festék használata lehetővé teszi, hogy a kettősszálú DNS-ről közvetlenül képet alkothassunk, ahogy azt a koncentrációprofil mentén mozgatjuk (38/A és B ábrák). A festett DNS-molekula és a mikrofluidikai háttér közötti erős kontraszt egy ~450-szeres fluoreszcencia-intenzitásnövekedésből ered, mely az SxO DNS-hez történő bekötődésének következménye [119]. Ahogy a befogott DNS-molekulát gyorsan (500 $\mu\text{m/s}$ sebességgel) új helyre mozgattuk az SxO-koncentrációprofil mentén, az átlagos fluoreszcencia intenzitása, valamint a DNS kontúrhossza megnőtt. Figyelembe véve, hogy az alkalmazott sebesség mellett a 38 μm -es lépéstávolság megtétele mindössze 76 ms-ot vett igénybe, az ezt követő megnyúlás, amely körülbelül 5 s alatt állt be egy adott hosszra inkább a kémiai egyensúlyi kinetika eredménye, mintsem a molekula mozgatásából eredő mechanikai perturbáció következménye (38/C ábra).

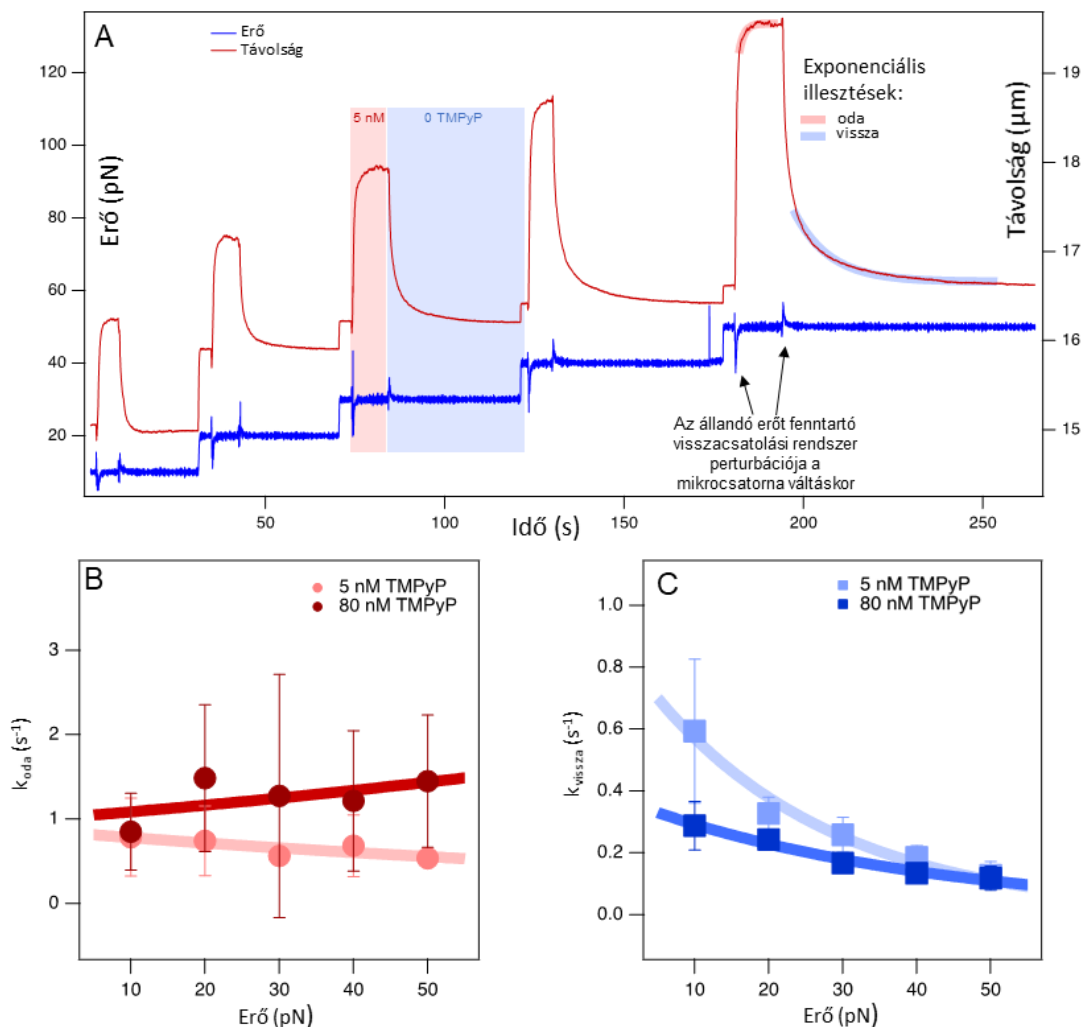


38. ábra. Előfeszített (35 pN) kettősszájú DNS-molekula mozgatása a koncentrácioprofil mentén. **(A)** Képek a két mikrogöngy között állandó erővel (35 pN) kifeszített DNS-molekuláról, négy különböző pozícióban (19, 57, 95, 133 μm , balról jobbra) az SxO-koncentrácioprofil mentén. A felső göngyöt egy erő-visszacsatoláson alapuló rendszer („Force Clamp”) az állandó erő fenntartása érdekében átpozicionálta. **(B)** A megnyújtott DNS tengelye mentén konfokális szkenneléssel kapott kymogram az idő függvényében a molekula SxO-koncentrácioprofil mentén történő fokozatos (38 μm /lépés) mozgatása során. A piros szaggatott vonalak jelzik azokat az időpontokat, amikor a 38 μm -es lépések történtek. **(C)** A DNS hossza az idő függvényében a molekula gyors (500 μm /s), lépcsőzetes mozgatása során az SxO-koncentrácioprofil mentén. Az SxO-t nem tartalmazó kontroll kísérletekben a DNS-hossz állandó maradt. A mellékelt ábrán a DNS-hossz relaxációja látható ugyanannak a DNS-molekulának az SxO-koncentrácioprofil mentén, azonos térbeli pozíciókban, visszafele történő lépcsőzetes mozgatása során.

4.4.2. A koncentrácioprofil alkalmazása a perturbációs kinetikai kísérletben (TMPyP-koncentrációugrás)

A mikrofluidikai cellában létrejövő koncentrációgradienst a fenti megfontolások alapján be lehet állítani az adott kísérleti célnak megfelelően. Például egy megfelelően meredek (ill. keskeny kiterjedésű) lépcsőt lehet létrehozni nagy áramlási sebesség mellett, közel a csatornák összefolyásának pozíciójához. Ebben az esetben az adott DNS-molekulát gyorsan (250 ms alatt) átmozgatva az egyik mikrocatornából a másikba elérhető egy koncentrációugrás, amely a kötődés kinetikai egyensúlyára nézve perturbációs hatással bír. Természetesen megjegyzendő, hogy a módszer alkalmazhatósága és pontossága függ az adott DNS-kötő molekulától, illetve a kötődés folyamatát jellemző sebességi állandóktól.

A TMPyP-koncentrációugrás kísérletek során a DNS-molekulát előre beállított, állandó erővel tartottam, majd gyorsan 0 TMPyP-koncentrációról (puffercsatorna) magas TMPyP-koncentrációra (5 vagy 80 nM) vittem át, és hagytam, hogy a hossza az erő-visszacsatolás („Force Clamp”) következtében új értékre relaxálódjon. Ezt követően a molekulát gyorsan visszavittem 0 TMPyP-re, miközben továbbra is fenntartottam az állandó erőszintet, és mértem a DNS hosszváltozását az idő függvényében. Az időfüggő DNS-hosszváltozásokra illesztett függvényekkel meghatároztuk a TMPyP kötési (k_{oda}) és disszociációs (k_{vissza}) erőfüggő sebességi állandóit (39. ábra). A k_0 értéke a kötési reakcióra a (22) egyenletből meghatározva 5 és 80 nM TMPyP-nél rendre 0,85 ($\pm 0,09$) és 1,01 ($\pm 0,22$) s^{-1} volt. A TMPyP-disszociáció hosszváltozás adatainak illesztéséből számított k_0 értékek 0,86 ($\pm 0,08$) és 0,37 ($\pm 0,02$) s^{-1} -nek adódtak 0 TMPyP esetén 5 és 80 nM TMPyP expozíciót követően.



39. ábra. A kettősszálú DNS-TMPyP kötődés perturbációs kinetikai elemzése, a koncentrációugrás (koncentrációgradiens) esetében. **(A)** TMPyP-koncentrációugrás kísérlet 10, 20, 30, 40 és 50 pN állandó erőknél és 5 nM TMPyP mellett. A két mikrogöngy között tartott kettősszálú DNS-molekulát az adott beállított erővel gyorsan 5 nM TMPyP-re, majd vissza 0 TMPyP-re vittem (világospiros, illetve kék árnyékolt területek). Az oda (magas TMPyP) és vissza (0 TMPyP) DNS-hosszadatokat, a mikroszatoma-váltás utáni erő relaxációját követve, exponenciális függvényekkel illesztettük (vastag folytonos világospiros és kék vonalak). **(B)** A TMPyP-kötődés k_{oda} értékei az erő függvényében 5 és 80 nM TMPyP esetében. A k_{oda} értékeket a magas TMPyP-koncentrációjú hosszadatok illesztésének sebességi állandóiból számítottuk ki. **(C)** A 0 TMPyP-ben mért disszociációs (visszafelé irányuló) reakció k értékei (k_{vissza}) - amely megfelel a k_{off} értéknek - az erő függvényében 5 és 80 nM TMPyP esetében. A hibasávok négy független kísérletből adódó szórást jelölik.

5. Megbeszélés

Doktori munkámban a fotodinamikus terápia szempontjából jelentős tulajdonságokkal bíró [82,120–127] és a G-kvadruplex stabilizálására is képes [97,98,128–133] TMPyP hatását vizsgáltam a DNS nanomechanikájára vonatkozólag. Mivel számos fontos DNS-kötő fehérje mechanoenzim (többek között például DNS- és RNS-polimerázok), a DNS farmakológiai úton indukált nanomechanikai változásainak megértése nagy jelentőséggel bír.

Érdemes megemlíteni, hogy az alkalmazott TMPyP-koncentrációk az *in vitro* fotodinamikus terápiában használt koncentrációk alatt, vagy jóval azokon belül vannak [122,125,134] (14-16. ábrák). Ezen felül a DNS-ben bekövetkező legnagyobb nanomechanikai változások egy viszonylag szűk, nanomoláris (5-40 nM) TMPyP-koncentrációtartományban jelentkeznek (18-21. ábrák). Továbbá érdemes még megjegyezni, hogy a megállapítások alapját képező kísérleti eredmények – egymolekula kísérletek lévén – rendkívül jól, nagy pontossággal reprodukálhatók a vizsgált kísérleti paraméterek tartományában (4.1.6. fejezet, 30-32. ábrák).

Fenti megállapításokat figyelembe véve elmondható, hogy a dolgozatban tárgyalt szerkezeti és nanomechanikai változások rendkívül fontosak a TMPyP terápiás alkalmazhatóságának szempontjából. Így a nanomoláris TMPyP-koncentrációk és a DNS-re ható pikonewtonos erők összehatása finomhangolhatja a DNS szerkezeti és nanomechanikai jellemzőit, ezáltal szabályozva a DNS-hez kapcsolódó mechanoenzimatikus folyamatok széles skáláját.

5.1. A kettősszálú DNS-TMPyP komplex nanomechanikája

5.1.1. A kettősszálú DNS megnyúlása a TMPyP bekötődésének hatására

A TMPyP összetett és koncentrációtól függő változást idézett elő a kettősszálú DNS karakterisztikus erőgörbéjére nézve (vö. 2. ábra és 13-16. ábrák). Ezen felül a NaCl-koncentráció változtatása további, összetett változásokat eredményezett, míg a DNS húzási sebességének megváltoztatása kisebb, de nem elhanyagolható mértékben módosította a mért erőgörbét (13-16. ábrák).

A nanomechanikai kísérletekben a molekulaszerkezet erő hatására, az idő függvényében torzítható, ami miatt a kötési reakció egyensúlya folyamatosan eltolódhat. Emiatt a rendszer termodinamikai állapota kiemelten fontos. Másrészt érdemes lehet a DNS jellemzését olyan kémiai állandó rendszerben végezni, ahol a komplexben a reaktáns és a DNS aránya állandó marad [45]. Megfigyeléseink alapján a TMPyP kötődése a DNS-hez a nanomechanikai kísérletek időskáláján rendkívül gyors, ami kizárja egy olyan molekuláris rendszer jellemzését, ahol a DNS-hez kötött TMPyP-molekulák aránya állandó marad. Emellett érdemes lehet a DNS termodinamikai egyensúlyban történő jellemzését vizsgálni, ahol a DNS-TMPyP komplex a mechanikai nyújtási-relaxációs ciklus során végig kémiai és konformációs egyensúlyban van. Az ilyen egyensúlyt az erőgörbén lévő hiszterézis hiánya jellemzi [135]. Az egyensúly vizsgálatához a DNS-TMPyP komplexet különböző húzási sebességeknek tettük ki, mivel a húzósebesség növelése eltolja a molekuláris rendszert az egyensúlytól, és fordítva. Így a különböző kísérleti körülmények (különböző TMPyP- és NaCl-koncentrációk és húzási sebességek) mellett mért erőgörbék eredményeként egy nagy, többdimenziós adathalmaz keletkezett (14-16. ábrák).

Ahhoz, hogy megkülönböztessük a TMPyP, a NaCl és a húzási sebességek hatásait a DNS-re nézve, egy empirikus matematikai modellt vezettünk be, melyet a mérések során kapott erőgörbékre illesztettünk. A modell jelentősége az, hogy a paraméterei megfeleltethetők a DNS fizikai jellemzőinek, továbbá lefedi a DNS teljes erőgörbáját az entrópiakustól kezdve az aszimptotikus tartománnyal bezárólag, az általunk vizsgált kísérleti paraméterek tartományán belül (17. ábra). Így vizsgálni tudtuk a kettősszalú DNS kontúrhosszának és nyújthatóságának változását, a túlnyújtás átmenetéhez tartozó erőt és az átmenetre jellemző kooperativitást, valamint a túlnyújtott DNS maximális hosszát.

A TMPyP a kettősszalú DNS kontúrhosszának jelentős, akár 37%-os növekedését okozta, amit a P_1 paraméter változása mutatott (18. ábra). A hossznövekedés független volt a húzási sebességtől, ami azt jelzi, hogy a TMPyP hatására bekövetkező szerkezeti változások a mérés során alkalmazott 20 $\mu\text{m/s}$ maximális DNS húzási sebességhez viszonyítva is gyorsan végbemennek. A megnyúlás nagy része az alacsony TMPyP-koncentráció tartományban ($<40\text{ nM}$) következik be, amelyet egy fokozatosabb, TMPyP-koncentrációtól függő megnyúlás követ. Ez arra utal, hogy a TMPyP legalább két

kötődési módban [105,107] kötődik, eltérő TMPyP-koncentrációtól való függéssel és feltehetőleg eltérő kinetikával. 1 M NaCl mellett a TMPyP hatására azonban nem következett be hossznövekedés magas koncentrációkon sem. Ez azt jelzi, hogy a TMPyP DNS-hez történő kötődésének mechanizmusa elektrosztatikus. Korábban már kimutatták, hogy a TMPyP – más kötődési módok, mint például az árokkötés mellett [136–138]– interkalálódik a DNS-be [136,139–141], és hogy az interkalátorok DNS-hosszabbodást okoznak [32,45,46,53,56,142–145]. E megállapítások tükrében levonható az a következtetés, hogy a hossznövekedést elsősorban a TMPyP interkalációja okozza.

A TMPyP hatására történő DNS-meghosszabbodást AFM-mérésekkel jól lehetett igazolni (35. ábra). Bár az AFM-kísérletek során talált 9,9%-os kontúrhossz-növekedés hasonló kísérleti körülmények mellett lézercsipesszel végzett nanomechanikai mérésekből számított 9,0%-os hossznövekedéshez hasonló, érdemes megjegyezni, hogy ez utóbbi nem egyezik meg az elméleti modellillesztésekből (eWLC) számított kontúrhossz-változással, amely az adott kísérleti körülmények között 14,4% lenne. Az AFM-kísérletek során számított kontúrhossz-növekedés értékének az elméleti modellillesztésekből kapott értéktől való eltérése (9,9% és 14,4%) valószínűleg a DNS-nek a szubsztrátfelülethez történő kötődéséből eredő mechanikai korlátoknak köszönhető. Más szóval az AFM-mérések során a DNS kinetikus csapdába eshet a szubsztrát felületén, ami eredményezhet kisebb eltérést a pontos kontúrhossz-növekedés megállapítását illetően. Mindazonáltal elmondható, hogy az AFM-mérések független kísérleti bizonyítékkal szolgáltak a TMPyP-kötődés DNS-hosszabbodást előidéző hatására.

5.1.2. A TMPyP-bekötődés hatása a kettősszálú DNS nyújthatóságára

Az TMPyP jelentősen növelte a kettősszálú DNS nyújthatóságát egy viszonylag szűk koncentrációtartományban (10-40 nM), ami a P_2 paraméter változásából látható (19. ábra). A nyújthatóság itt olyan értelemben értendő, hogy a kettősszálú DNS-molekula mennyire tud megnyúlni, mennyire „engedékeny” külső erők hatására. Ez a paraméter a TMPyP hatására nő, ami azt jelenti, hogy külső erő hatására a DNS könnyebben nyúlik meg. Ez fontos a DNS biológiai funkcióinak szempontjából, például a sejtmagban lejátszódó folyamatokban. A P_2 paraméter enyhe húzási sebességtől való függése arra utalhat, hogy a molekuláris rendszer feltehetőleg nincs egyensúlyban. A TMPyP-nek e hatása szinte teljes mértékben visszafordítható, ha a NaCl-koncentrációt 1 M-ra növeljük. Húzóerő hatására a rendszer fokozatos kémiai átalakuláson megy keresztül a továbbra is

kötődő TMPyP-molekulák miatt, emiatt a molekuláris rendszer nem tárgyalható teljesen rugalmas testként, jellemző rá egyfajta viszkózus viselkedés, mely a TMPyP- és Na-DNS kötődési reakciók kinetikai és termodinamikai állapotától függően alakulhat ki. A termodinamikai egyensúlyt is teszteltük, és azt találtuk, hogy addig fennáll, amíg a DNS nem lép a túlnyújtási átmenetbe (27-29. ábrák). Érdekes módon a NaCl eltérő hatást gyakorol a kettősszalú DNS-re az erőgörbe e tartományában a kontúrhossz és a nyújthatóság terén. Míg a DNS eredeti kontúrhossza teljesen helyreáll, a TMPyP DNS nyújthatóságát növelő hatása még magas (1 M) NaCl-koncentráció mellett is megmarad, ami arra utal, hogy a NaCl különbözőképpen verseng a TMPyP kötődésével, a kötődés mechanizmusától függően (23. ábra). Összességében a kettősszalú DNS látszólag rugalmas testként viselkedik, amelynek merevségét érzékenyen szabályozhatja a TMPyP (nM-os koncentrációtartományban) és az ionerősség.

Az eWLC modellt alkalmazva a kísérleti adatokra (24. ábra) elemeztük a TMPyP hatásait mind az entrópikus, mind az entalpikus régiókban. Az eredmények még inkább rámutatnak a komplex DNS-hosszabbító hatásra és a nanomoláris TMPyP-tartományban jelentkező, DNS nyújthatóságát növelő hatásra (26. ábra). Elmondható, hogy a modell szerint a TMPyP-koncentráció függvényében nőtt a kettősszalú DNS kontúrhossza, míg perzisztenciahossza és nyújtási modulusa csökkent a vizsgált koncentrációkon. Ezen eredmények jó egyezést mutatnak az általunk kidolgozott empirikus modellnek a DNS-erőgörbe entrópikus és entalpikus tartományait leíró részével.

5.1.3. A TMPyP-bekötődés hatása a túlnyújtási átmenetre

Egy küszöberőnél, jellemzően ~60 pN elérésekor, fiziológiás körülmények között a kettősszalú DNS egy kooperatív túlnyúláson megy keresztül, amelyet jelentős (>60%-os) megnyúlás jellemez egy szűk (~15 pN) erőtartományon belül [37]. Az átmenet során három fő folyamat (B-DNS átalakulása S-DNS-sé, ún. olvadási buborékképződés és a szállefejtődés; lásd 1.2.2. fejezet) játszódik le, melyek arányát a DNS mentén található egyszálú törések („nick”) száma és a környezeti paraméterek, mint például az ionerősség, befolyásolják [18,146]. Mivel e folyamatokat a szálak közötti kapcsolat erőssége befolyásolja, az átlagos plató magassága a túlnyújtási plató – vagy más néven túlnyújtási átmenet – tartományában a kettősszalú DNS-szerkezet stabilitását tükrözheti. Az átmenet kooperativitása az erőtartomány kiterjedésében, tehát az erőgörbe e tartományban vett meredekségének inverzében nyilvánul meg, és a DNS-lánc kontúrja mentén lineárisan

futó folyamatokhoz kapcsolódik. Más szóval minél kisebb erőtartományt felölelve lehet túljutni a túlnyújtási átmeneten a kettősszalú DNS nyújtása során, vagyis a túlnyújtási plató minél jobban közelíthető egy horizontális egyenessel, annál nagyobb a kooperativitás.

A túlnyújtási átmenetet nagymértékben megváltoztatta a TMPyP bekötődése (20-21. ábrák), valamint a NaCl további, jelentős változásokat idézett elő e tartományban. A kooperativitás, amely a P_3 paraméter inverzeként értelmezhető, jelentősen csökkent egy szűk TMPyP-tartományban (0-40 nM, 20. ábra). Növelve a TMPyP-koncentrációt ez az érték kisebb mértékben ugyan, de tovább csökkent. Elképzelhető, hogy a kettősszalú DNS-hez kötött TMPyP-molekulák az átmenet során végig kötődve maradnak, és gátolják a molekuláris változások előrehaladását a lánc mentén. A NaCl-koncentráció 1 M-ra történő növelése részben visszaállította a kooperativitást, továbbá megfigyelhető, hogy erős húzási sebességtől való függés állt fenn ebben az esetben. Tekintettel arra, hogy az 1 M NaCl közelítőleg teljesen visszaállítja a kettősszalú DNS kontúrhosszát (18. és 23. ábrák), magas TMPyP- és NaCl-koncentráció jelenlétében a túlnyújtási átmenetnél a molekuláris változások előrehaladását gátló TMPyP-molekulák valószínűleg olyanok, amelyek az átmenet során újonnan kötődnek a DNS-hez, feltehetőleg az egyszálú DNS-régiókhoz. A NaCl nem versenyez hatékonyan ezekkel az újonnan kötött gátló TMPyP-molekulákkal.

A túlnyújtási átmenethez tartozó erő (a plató magassága) fokozatosan csökkent a TMPyP-koncentráció növekedésének függvényében. Ezt a hatást némileg ellensúlyozta a megnövelt NaCl-koncentráció (21. ábra). Érdekes módon azonban a túlnyújtási plató magasságának csökkenése nem volt monoton, hanem egy lokális maximumot figyeltünk meg 5-10 nM TMPyP-nél (21/B ábra). Ez a meglepő eredmény arra utalhat, hogy a különböző kötési módok helyi kémiai egyensúlya átrendeződik a kettősszalú DNS-t stabilizáló és destabilizáló reakciók között. Elképzelhető, hogy alacsony TMPyP-koncentráció tartományban az interkaláció és az árokkötés stabilizáló hatása dominál [93,94,105], míg magasabb TMPyP-koncentrációknál az egyszálú DNS-kötés destabilizáló hatása a jelentősebb. Ennek lehetőségét alátámasztják az egyszálú DNS-kötő fehérjékkel való kölcsönhatásból származó hasonló erőgörbék [64,143,147]. Kimutatták továbbá, hogy az aktinomicin-D (ActD) DNS-hez való kötődése, amely a kettősszalú DNS-bázispárok közötti interkaláción [148–152], egyszálú DNS-

asszociáción [153–156] és egyszálú DNS-bázis interkaláción [157,158] keresztül történhet, a túlnyújtási platóhoz tartozó erő és a kooperativitás csökkenését eredményezi [159].

Összességében a TMPyP és a NaCl által a DNS túlnyújtási átmenetére kifejtett komplex hatásrendszert a stabilizáló és a destabilizáló TMPyP-DNS kötési módok közötti eltolódás, valamint a NaCl-nak az interkaláló és nem interkaláló TMPyP-DNS asszociációra vonatkozó differenciált árnyékoló hatása határozza meg.

5.2. DNS-TMPyP kötés kinetikája

Kettősszálú DNS-molekulákon végzett egymolekula perturbációs kísérletekkel feltérképeztük a TMPyP-DNS kölcsönhatás dinamikáját. Az erőlépcsős kísérletekben (36. ábra) a kémiai egyensúlyt mechanikai erő hatására kissé eltoltuk az egyensúlytól, és az új egyensúly helyreállítását egyszerre irányította a kötődés és a disszociáció folyamata. Ezzel szemben a koncentrációugráson alapuló kísérletekben (39. ábra) a mechanikai egyensúlyban lévő molekuláris rendszert gyorsan, drasztikusan eltérő kémiai környezetbe helyeztük (magas és nullkoncentrációjú TMPyP), ami lehetővé tette, hogy a rendszert olyan messzire távolítsuk el az egyensúlytól, hogy csak az egyik folyamat domináljon, legalábbis kezdetben. Fontos megjegyezni, hogy mikor a DNS-TMPyP rendszer 0 TMPyP-be kerül (puffercsatorna), a megfigyelési időablak alatt csak disszociáció történik, mivel az állandó sebességű pufferáramlás minden nem kötött TMPyP-molekulát kimos (3.2.5. és 3.4. fejezetek), ezáltal megakadályozva a szabad ligandum felhalmozódását és ennek következtében az új kötődés kialakulását. Így, míg a 0 TMPyP-nél végzett koncentrációugráson alapuló egymolekula kísérlet lehetővé teszi a k_{off} közvetlen becslését, a kötődés és a disszociáció egyaránt hozzájárul a megfigyelt kinetikához mikor magas TMPyP-koncentrációnál (5 vagy 80 nM) az egyensúlyhoz közelítünk.

A két különböző perturbációs kinetikai megközelítés némileg eltérő eredményeket adott, ami arra utal, hogy az egyensúlyt a különböző kísérleti körülmények között különböző útvonalakon lehet elérni. Az erőlépcsőt alkalmazó kísérletekből számított k_{on} és k_{off} értékek (36. ábra) $0,68 \text{ nM}^{-1}\text{s}^{-1}$ és $3,7 \text{ s}^{-1}$ voltak. Ezzel szemben a nulla és a magas TMPyP közötti koncentrációugráson alapuló kísérletekből számított k_{on} és k_{off} értékek $0,002 \text{ nM}^{-1}\text{s}^{-1}$ és $0,84 \text{ s}^{-1}$ -nek adódtak (39. ábra). Az 5 vagy 80 nM TMPyP-ről 0 TMPyP-re történő koncentrációugrás kísérletek exponenciális illesztéséből

közvetlenül számított k_{off} értékek 0,86, illetve 0,37 s⁻¹ voltak, amelyek összehasonlíthatók az előremenő koncentrációugrás mérésekből kapott értékekkel.

A kísérletekben megfigyelt k_{on} és k_{off} TMPyP-koncentrációtól való függése további vizsgálatot igényel, és összefüggésben lehet a kötési reakció összetettségével és a DNS-ben előidézett komplex szerkezeti változásokkal.

5.3. A TMPyP egyszálú DNS-t kötő tulajdonsága

Ha a kettősszalú DNS-t extrém mértékben megnyújtjuk, akkor a legtöbb hidrogénkötés a szálak között felszakad és a kettősszalú DNS túlnyomó többségében egyszálú DNS-ekké alakul át, mely szálakat kis számú hidrogénkötés tart össze a túlnyújtási átmenet végén (1.2.2. fejezet, 2. ábra).

A TMPyP-nek a túlnyújtási átmenetre gyakorolt hatásával kapcsolatos megfigyeléseink felvetették annak lehetőségét, hogy a TMPyP képes közvetlenül egyszálú DNS-t kötni (20-21. ábrák). Emellett a kettősszalú DNS maximális hossza (P_5 paraméter) fokozatosan növekedett a TMPyP-koncentráció növelésével (22. ábra), továbbá 1 M NaCl-koncentrációnál ez a növekedés gyorsabb ütemben történt. Ez visszavezethető a NaCl árnyékoló hatására, vagyis a TMPyP versenyez a NaCl-dal. A TMPyP versengő hatását valószínűsíthetően a pozitív töltésű molekulák interkalációja okozza az egyszálú DNS bázisai között. Észrevételeink és a TMPyP egyszálú DNS-t kötő tulajdonságának alátámasztására közvetlen méréseket végeztem egyszálú DNS-en (9. ábra). Az így kapott erőgörbék alapján kijelenthető, hogy a független nanomechanikai kísérletek egyértelműen kimutatták, hogy a TMPyP képes közvetlenül kölcsönhatásba lépni az egyszálú DNS-sel és megváltoztatja annak erőgörbéjét, azaz a kötődés hatására mechanikai változáson megy keresztül a DNS-szal (33. ábra).

5.4. A mikrofluidikai koncentrációprofil egymolekula kísérletekben történő alkalmazhatósága

A koncentrációprofil az idő függvényében fejlődik, ahogy a szomszédos oldatok párhuzamosan, előre beállított sebességgel áramlanak lefelé a mikrofluidikai eszközben. A koncentrációprofil alakja így az áramlási sebesség beállításával és/vagy a két mikrocsatorna összefolyása utáni vizsgálandó pozíció kiválasztásával választható meg (1.5. fejezet). A koncentrációprofil fluoreszcencián alapuló képalkotással (SxO) és mechanikusan – kettősszalú DNS-sel – is karakterizáltuk. Ez utóbbi azért lehetséges, mert

az interkaláló molekulák kötődése a DNS megnyúlását eredményezi [17,32,45]. Ennek kapcsán fontos megjegyezni, hogy a leírtak interkaláló, illetve interkalációt is mutató DNS-kötő molekulák esetében érvényesek.

A fluoreszcens képalkotásból származó intenzitásprofilra jól illeszkedett a (18) függvény (37. ábra). A mechanikus pásztázásból kapott eredmények kissé eltértek a képalkotásból származó eredményektől. A DNS hosszabbodása (normalizált hossznövekedés) a távolság (koncentrácioprofil mentén) függvényében mind az SxO, mind a TMPyP esetében hasonló görbét mutatott, de az kissé eltért a fluoreszcens mérésből származó intenzitásprofil alakjától és a két DNS-kötő molekula görbéje is némileg különbözött egymástól. Az előbbi eltérés magyarázható a két módszer különbségéből, pontosabban a nanomechanikai pásztázás érzékenyebb módszert jelenthet (a vizsgált kísérleti beállítások mellett), míg utóbbi esetben a magyarázat a TMPyP-nek a DNS-hez történő, SxO-hoz képest eltérő, komplex kötési mechanizmusa lehet.

Az illesztésekből rendre 46 μm és 58 μm -es távolságok adódtak a fluoreszcens és a mechanikai pásztázásra, melyeknél az intenzitásprofil, illetve a megnyúlás-koncentráció görbe közelítőleg lineárisan változik 20-80 nM SxO, illetve TMPyP-koncentráció között. Ez tovább erősíti az előző megállapítást, hogy a mechanikus pásztázás érzékenyebb módszert biztosít a koncentrácioprofil feltérképezésére, mint a fluoreszcencián alapuló képalkotás az alkalmazott műszerbeállításokkal és DNS-kötő molekulákkal.

A koncentrácioprofil mentén végzett mérések egyik fő előnye az, hogy pontosabb értékeket kaphatunk a festékmolekulák koncentrációját illetően a mikrofluidikai eszközön belül. E festékmolekulák ugyanis adszorbeálódhatnak a cella falára, ezzel csökkentve az effektív koncentrációt [45]. A koncentrácioprofil mentén azonban pontosan számolhatók a relatív koncentrációk, így kiküszöbölhető a festékmolekula effektív, relatív koncentrációesése, mely függhet a kezdeti – a rendszerbe befolyó – koncentráció értékétől. Ezen felül a koncentrácioprofil mentén történő megfelelő pozíciók megválasztásával tetszőleges számú, különböző koncentrációnál mérhető meg a DNS-molekula erőgörbéje. Ez lehetővé teszi, hogy ne kelljen a mikrofluidikai cellát újra inkubálni minden egyes koncentráció esetében az új egyensúly eléréséhez a cella fala és a DNS-kötő molekula között.

A mechanikus pásztázás előnye, hogy érzékenysége folytán pontosan meghatározható a DNS-kötő festékek koncentrációprofiljának kezdeti (alacsony koncentrációjú) és maximális koncentrációt jelentő tartománya. Ennek alapján a (18) összefüggést felhasználva pontosan meghatározhatjuk a koncentrációprofilt és így a koncentrációgradienst is a teljes tartományon belül fluoreszcens képalkotás nélkül is.

Fontos még megjegyezni, hogy a mikrofluidikai koncentrációgradiens egymolekula lézercsipeszes felhasználása nem korlátozódik csak DNS-re és DNS-kötő molekulákra. Alkalmazható például ionok, szubsztrátok fehérjékre gyakorolt hatásának vizsgálatára is.

6. Következtetések

Munkám során a TMPyP által kiváltott nanomechanikai változások sorát vizsgáltam egy- és kettősszálú DNS-en. A DNS nanomechanikájának komplex, TMPyP-koncentrációtól függő változásai a genomban zajló erőtol függő folyamatok szabályozásának széleskörű lehetőségeit kínálják, és fontos terápiás jelentőséggel bírhatnak.

Ezen felül munkám kiterjedt a DNS-kötő molekulák mikrofluidikai folyadékáramok között kialakuló koncentrácioprofiljának karakterizálására és vizsgáltam alkalmazásának lehetőségét a DNS nanomechanikájára gyakorolt koncentrációtól függő hatások mérésére.

A kutatás során számos eredményt és következtetést sikerült levonni. Ezek közül a legfontosabbak a következők:

1. A TMPyP rendkívül dinamikus folyamat során kötődik a kettősszálú DNS-hez, és annak jelentős megnyúlásához vezet, míg a látszólagos, hosszanti irányú merevségét csökkenti.
2. A TMPyP molekuláris kapcsolóként működik a kettősszálú DNS stabilitását illetően, ami a túlnyújtási átmenetre jellemző húzóerő megváltozását jelenti: alacsony koncentrációknál stabilizálja a kettős szálát, míg magasabb koncentrációknál destabilizálja azt. Továbbá csökkenti a túlnyújtási átmenetre jellemző kooperativitást.
3. Az eWLC modell alapján, TMPyP hatására nőtt a kettősszálú DNS kontúrhossza, míg perzisztenciahossza és nyújtási modulusa csökkent a vizsgált koncentrációknál.
4. A TMPyP egyszálú DNS-hez történő kötődése és a DNS erőgörbéjének, ezáltal nanomechanikájának megváltozása kimutatható volt közvetlen, egyszálú DNS-t vizsgáló egymolekula kísérletek során. Ezen felül sikerült kimutatni, hogy ez a változás teljesen reverzibilis a vizsgált kísérleti körülmények között.

5. A NaCl hatékonyan versenyez a TMPyP-vel a DNS-kötést illetően, feltehetőleg elektrosztatikus árnyékolás következtében, de különböző hatással bír a DNS-hosszabbító és -stabilizáló folyamatokra. Továbbá a NaCl hatása a kettősszálú DNS nanomechanikájára jelentősebb, mint az alkalmazott húzási sebességek a vizsgált koncentráció- (0,01 - 1 M) és sebességtartományokban (0,02 – 20 $\mu\text{m/s}$).
6. A mikrofluidikai cellában, két mikrosatorna között, diffúzió következtében kialakuló koncentrációprofil jól karakterizálható fluoreszcens mikroszkópia és előfeszített, kettősszálú DNS-molekulával végzett mechanikai pásztázás segítségével. Ez utóbbi érzékenyebb módszer a koncentrációprofil megállapítására.
7. A koncentrációgradiens jól alkalmazható egyensúlyi és nemegyensúlyi, tranziens kinetikai kísérletekben egyazon molekulán. Ezen felül a koncentrációprofil mentén a pozíció függvényében koncentrációfüggő egyensúlyi kísérletek is végezhetők egyazon molekulán.

7. Összefoglalás

A kationos porfirinszármazékok a fotodinamikus terápia ígéretes vegyületei. Ezek közül a TMPyP számos előnyös tulajdonsággal bír széleskörű felhasználhatóságát illetően: vizsgálták vírusinaktivációs tulajdonságai miatt, széleskörű antimikrobiális hatással bír, erős affinitást mutat a DNS-hez, ezen felül G-kvadruplex stabilizáló hatást is mutat.

Munkánk során ezért egymolekula vizsgálati eszközökkel tanulmányoztuk a DNS-TMPyP kölcsönhatást, és átfogó leírást adtunk a TMPyP-bekötődés hatására a DNS nanomechanikájában létrejövő komplex változásokról. Azt vizsgáltuk, hogy hogyan befolyásolja a TMPyP a DNS nanomechanikáját a TMPyP-koncentráció (5-5120 nM), a mechanikai húzóerő (0-100 pN), a NaCl-koncentráció (0,01-1 M) és a húzási sebesség (0,2-20 $\mu\text{m/s}$) széles tartományaiban mikrofluidikával kombinált lézercsipesz és atomierő-mikroszkópia segítségével.

A komplex, több paramétertől függő nanomechanikai változások parametrizálására kidolgoztunk egy matematikai modellt, mely jól illeszkedik a DNS-TMPyP komplex teljes erőgörbéjére. A TMPyP DNS-hez történő kötődése rendkívül dinamikus folyamat, aminek következtében a kettősszalú DNS megnyúlik, továbbá hosszanti irányú merevsége lecsökken. Ezen felül a kettősszalú DNS stabilitása alacsony TMPyP-koncentrációk (≤ 10 nM) esetén megnőtt, majd a TMPyP-koncentráció növelésével fokozatosan csökkent. A túlnyújtási átmenetre jellemző kooperativitás csökkent, továbbá közvetlenül kimutattuk, hogy a TMPyP kötődik az egyszalú DNS-hez és megváltoztatja annak erőgörbéjét. A NaCl jelentős árnyékoló hatással bírt a TMPyP kötődésére nézve, magas (1 M) koncentrációban történő hozzáadása versengett a TMPyP által kiváltott nanomechanikai változásokkal.

Munkánk során továbbá vizsgáltuk a mikrofluidikai cellában kialakuló koncentrációprofilt, továbbá annak felhasználását az adott DNS-kötő molekula koncentrációjának szabályozására. A koncentrációprofilt mind fluoreszcens módon, mind pedig előfeszített, kettősszalú DNS-sel történő nanomechanikai pásztázás módján is karakterizáltuk. Ezen felül demonstráltuk a koncentrációgradiens ugyanazon molekulán történő alkalmazhatóságát egyensúlyi, és nemegyensúlyi kísérletekben egyaránt.

8. Summary

Cationic porphyrin derivatives are promising compounds for photodynamic therapy. Among them, TMPyP has several advantageous properties for its wide range of applications: it has been investigated for its viral inactivation properties, it has broad antimicrobial activity, it shows strong affinity for DNA, and it also exhibits G-quadruplex stabilizing activity.

Therefore, we have used single-molecule assays to study the DNA-TMPyP interaction and provide a comprehensive description of the complex changes in DNA nanomechanics that occur as a result of TMPyP binding. We have investigated how TMPyP affects DNA nanomechanics over a wide range of TMPyP concentrations (5-5120 nM), mechanical pulling forces (0-100 pN), NaCl concentrations (0.01-1 M) and pulling speeds (0.2-20 $\mu\text{m/s}$) using microfluidics combined with optical tweezers and atomic force microscopy.

A mathematical model has been developed to parameterize the complex, multi-parameter nanomechanical changes, which fits well to the entire force-distance curve of the DNA-TMPyP complex. The binding of TMPyP to DNA is a highly dynamic process, which results in the elongation of the double-stranded DNA and a decrease in its longitudinal stiffness. In addition, we have found that the stability of double-stranded DNA was increased at low (≤ 10 nM) TMPyP concentrations and was gradually decreased with increasing TMPyP concentration. The cooperativity characteristic of the overstretching transition was reduced, and we have directly shown that TMPyP binds to single-stranded DNA and alters its force-distance curve. NaCl had a significant shielding effect on TMPyP binding, and its addition at high concentration (1 M) competed with the nanomechanical changes induced by TMPyP.

We have also investigated the concentration profile in a microfluidic cell, and its use to control the concentration of a given DNA-binding molecule. We have characterized the concentration profile both fluorescently and by nanomechanical scanning with a prestretched double-stranded DNA. In addition, we demonstrated the applicability of the concentration gradient on the same molecule in both equilibrium and non-equilibrium experiments.

9. Irodalomjegyzék

1. Kepler J. De Cometis Libelli Tres. Augustae Vindelicorum, Augsburg; 1619.
2. Maxwell JC. VIII. A dynamical theory of the electromagnetic field. Phil Trans R Soc. 1865 Dec 31;155:459–512.
3. Poynting JH. XV. On the transfer of energy in the electromagnetic field. Phil Trans R Soc. 1884 Dec 31;175:343–61.
4. Loudon R, Baxter C. Contributions of John Henry Poynting to the understanding of radiation pressure. Proc R Soc A. 2012 Jul 8;468(2143):1825–38.
5. Lebedev PN. Untersuchungen über die Druckkräfte des Lichtes. Annalen der Physik. 1901;311(11):433–58.
6. Nichols EF, Hull GF. A preliminary communication on the pressure of heat and light radiation. Physical Review (Series I). 1901;13(5):307.
7. Ashkin A. History of optical trapping and manipulation of small-neutral particle, atoms, and molecules. IEEE J Select Topics Quantum Electron. 2000 Nov;6(6):841–56.
8. Ashkin A. Acceleration and Trapping of Particles by Radiation Pressure. Phys Rev Lett. 1970 Jan 26;24(4):156–9.
9. Ashkin A, Dziedzic JM. Optical Levitation by Radiation Pressure. Applied Physics Letters. 1971 Oct 15;19(8):283–5.
10. Ashkin A, Dziedzic JM, Bjorkholm JE, Chu S. Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles. Opt Lett. 1986 May 1;11(5):288.
11. Pesce G, Jones PH, Maragò OM, Volpe G. Optical tweezers: theory and practice. Eur Phys J Plus. 2020 Dec;135(12):949.
12. Scientific Background on the Nobel Prize in Physics 2018 - Groundbreaking inventions in laser physics [Internet]. THE ROYAL SWEDISH ACADEMY OF

- SCIENCES; 2018. Available from: www.nobelprize.org/uploads/2018/10/advanced-physicsprize2018.pdf
13. Bustamante CJ, Chemla YR, Liu S, Wang MD. Optical tweezers in single-molecule biophysics. *Nat Rev Methods Primers*. 2021 Mar 25;1(1):25.
 14. Mishchenko MI, Travis LD, Lacis AA. Scattering, absorption, and emission of light by small particles. Cambridge ; New York: Cambridge University Press; 2002. 445 p.
 15. Ling SJ, Moebs W, Sanny J. University physics. Volume 2. Houston, Texas: OpenStax, Rice University; 2018. 810 p.
 16. Zaltron A, Merano M, Mistura G, Sada C, Seno F. Optical tweezers in single-molecule experiments. *Eur Phys J Plus*. 2020 Nov;135(11):896.
 17. Paramanathan T, McCauley MJ, Williams MC. Chapter 6: Studying Nucleic Acid - Drug Interactions at the Single Molecule Level Using Optical Tweezers. In: Wanunu M, Tor Y, editors. *Methods for studying nucleic acid/drug interactions*. Boca Raton: CRC Press; 2012. p. 135–58.
 18. King GA, Gross P, Bockelmann U, Modesti M, Wuite GJL, Peterman EJG. Revealing the competition between peeled ssDNA, melting bubbles, and S-DNA during DNA overstretching using fluorescence microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013 Mar 5;110(10):3859–64.
 19. Xu L, Halma MTJ, Wuite GJL. Mapping fast DNA polymerase exchange during replication. *Nat Commun*. 2024 Jun 22;15(1):5328.
 20. The Nobel Prize in Physics 1986 - Press release [Internet]. The Royal Swedish Academy Of Sciences; 1986. Available from: <https://www.nobelprize.org/prizes/physics/1986/press-release/>
 21. Binnig G, Quate CF, Gerber Ch. Atomic Force Microscope. *Phys Rev Lett*. 1986 Mar 3;56(9):930–3.

22. Kiss B, Mudra D, Török G, Mártonfalvi Z, Csík G, Herényi L, Kellermayer M. Single-particle virology. *Biophys Rev.* 2020 Oct;12(5):1141–54.
23. Kiss B, Kis Z, Pályi B, Kellermayer MSZ. Topography, Spike Dynamics, and Nanomechanics of Individual Native SARS-CoV-2 Virions. *Nano Lett.* 2021 Mar 24;21(6):2675–80.
24. Kiss B, Kiss LA, Lohinai ZD, Mudra D, Tordai H, Herényi L, Csík G, Kellermayer M. Imaging the Infection Cycle of T7 at the Single Virion Level. *IJMS.* 2022 Sep 24;23(19):11252.
25. Dufrêne YF, Ando T, Garcia R, Alsteens D, Martinez-Martin D, Engel A, Gerber C, Müller DJ. Imaging modes of atomic force microscopy for application in molecular and cell biology. *Nature Nanotech.* 2017 Apr;12(4):295–307.
26. Pi J, Cai J. Cell Topography and Its Quantitative Imaging by AFM. In: Santos NC, Carvalho FA, editors. *Atomic Force Microscopy* [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2019 [cited 2024 Jul 19]. p. 99–113. (Methods in Molecular Biology; vol. 1886). Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-8894-5_6
27. Sziklai D, Sallai J, Papp Z, Kellermayer D, Mártonfalvi Z, Pires RH, Kellermayer MSZ. Nanosurgical Manipulation of Titin and Its M-Complex. *Nanomaterials.* 2022 Jan 6;12(2):178.
28. Csányi MC, Salamon P, Feller T, Bozó T, Hársfalvi J, Kellermayer MSZ. Structural hierarchy of mechanical extensibility in human von Willebrand factor multimers. *Protein Science.* 2023 Jan;32(1):e4535.
29. Csányi MC, Sziklai D, Feller T, Hársfalvi J, Kellermayer M. Cryptic Extensibility in von Willebrand Factor Revealed by Molecular Nanodissection. *IJMS.* 2024 Jul 2;25(13):7296.
30. Kellermayer M, Sziklai D, Papp Z, Decker B, Lakatos E, Mártonfalvi Z. Topology of interaction between titin and myosin thick filaments. *Journal of Structural Biology.* 2018 Jul;203(1):46–53.

31. Vörös Z, Csík G, Herényi L, Kellermayer M. Temperature-Dependent Nanomechanics and Topography of Bacteriophage T7. Pfeiffer JK, editor. *J Virol*. 2018 Oct 15;92(20):e01236-18.
32. Almaqwashi AA, Paramanathan T, Rouzina I, Williams MC. Mechanisms of small molecule–DNA interactions probed by single-molecule force spectroscopy. *Nucleic Acids Res*. 2016 May 19;44(9):3971–88.
33. Piovesan A, Pelleri MC, Antonaros F, Strippoli P, Caracausi M, Vitale L. On the length, weight and GC content of the human genome. *BMC Res Notes*. 2019 Dec;12(1):106.
34. Kretzer B, Herényi L, Csík G, Supala E, Orosz Á, Tordai H, Kiss B, Kellermayer M. TMPyP binding evokes a complex, tunable nanomechanical response in DNA. *Nucleic Acids Research*. 2024 Jun 29;52(14):8399–418.
35. Wenner JR, Williams MC, Rouzina I, Bloomfield VA. Salt Dependence of the Elasticity and Overstretching Transition of Single DNA Molecules. *Biophysical Journal*. 2002 Jun;82(6):3160–9.
36. Clausen-Schaumann H, Rief M, Tolksdorf C, Gaub HE. Mechanical Stability of Single DNA Molecules. *Biophysical Journal*. 2000 Apr;78(4):1997–2007.
37. Smith SB, Cui Y, Bustamante C. Overstretching B-DNA: The Elastic Response of Individual Double-Stranded and Single-Stranded DNA Molecules. *Science*. 1996 Feb 9;271(5250):795–9.
38. Kratky O, Porod G. Röntgenuntersuchung gelöster Fadenmoleküle. *Recl Trav Chim Pays-Bas*. 1949 Jan;68(12):1106–22.
39. Storm C, Nelson PC. Theory of high-force DNA stretching and overstretching. *Phys Rev E*. 2003 May 9;67(5):051906.
40. Marko JF, Siggia ED. Stretching DNA. *Macromolecules*. 1995 Dec;28(26):8759–70.

41. Odijk T. Stiff Chains and Filaments under Tension. *Macromolecules*. 1995 Sep;28(20):7016–8.
42. Wang MD, Yin H, Landick R, Gelles J, Block SM. Stretching DNA with optical tweezers. *Biophysical Journal*. 1997 Mar;72(3):1335–46.
43. Gross P, Laurens N, Oddershede LB, Bockelmann U, Peterman EJG, Wuite GJL. Quantifying how DNA stretches, melts and changes twist under tension. *Nature Phys*. 2011 Sep;7(9):731–6.
44. Sischka A, Toensing K, Eckel R, Wilking SD, Sewald N, Ros R, Anselmetti D. Molecular Mechanisms and Kinetics between DNA and DNA Binding Ligands. *Biophysical Journal*. 2005 Jan;88(1):404–11.
45. Biebricher AS, Heller I, Roijmans RFH, Hoekstra TP, Peterman EJG, Wuite GJL. The impact of DNA intercalators on DNA and DNA-processing enzymes elucidated through force-dependent binding kinetics. *Nat Commun*. 2015 Jun 18;6(1):7304.
46. Kretzer B, Kiss B, Tordai H, Csík G, Herényi L, Kellermayer M. Single-Molecule Mechanics in Ligand Concentration Gradient. *Micromachines*. 2020 Feb 19;11(2):212.
47. Krautbauer R, Fischerländer S, Allen S, Gaub HE. Mechanical Fingerprints of DNA Drug Complexes. *Single Mol*. 2002 Jun;3(2–3):97–103.
48. Chang T, Fiumara N, Weinstein L. GENITAL HERPES: TREATMENT WITH METHYLENE BLUE AND LIGHT EXPOSURE. *Int J Dermatology*. 1975 Jan;14(1):69–71.
49. Eckel R, Ros R, Ros A, Wilking SD, Sewald N, Anselmetti D. Identification of Binding Mechanisms in Single Molecule–DNA Complexes. *Biophysical Journal*. 2003 Sep;85(3):1968–73.
50. Waring MJ. DNA Modification and Cancer. *Annu Rev Biochem*. 1981 Jun;50(1):159–92.

51. Vladescu ID, McCauley MJ, Nuñez ME, Rouzina I, Williams MC. Quantifying force-dependent and zero-force DNA intercalation by single-molecule stretching. *Nat Methods*. 2007 Jun;4(6):517–22.
52. Tessmer I, Baumann CG, Skinner GM, Molloy JE, Hoggett JG, Tendler SJB, Allen S. Mode of drug binding to DNA determined by optical tweezers force spectroscopy. *Journal of Modern Optics*. 2003 Jul;50(10):1627–36.
53. Vladescu ID, McCauley MJ, Rouzina I, Williams MC. Mapping the Phase Diagram of Single DNA Molecule Force-Induced Melting in the Presence of Ethidium. *Phys Rev Lett*. 2005 Oct 6;95(15):158102.
54. Mihailovic A, Vladescu I, McCauley M, Ly E, Williams MC, Spain EM, Nuñez ME. Exploring the Interaction of Ruthenium(II) Polypyridyl Complexes with DNA Using Single-Molecule Techniques. *Langmuir*. 2006 May 1;22(10):4699–709.
55. Rocha MS, Ferreira MC, Mesquita ON. Transition on the entropic elasticity of DNA induced by intercalating molecules. *The Journal of Chemical Physics*. 2007 Sep 14;127(10):105108.
56. Murade CU, Subramaniam V, Otto C, Bennink ML. Interaction of Oxazole Yellow Dyes with DNA Studied with Hybrid Optical Tweezers and Fluorescence Microscopy. *Biophysical Journal*. 2009 Aug;97(3):835–43.
57. Krautbauer R, Pope LH, Schrader TE, Allen S, Gaub HE. Discriminating small molecule DNA binding modes by single molecule force spectroscopy. *FEBS Letters*. 2002 Jan 16;510(3):154–8.
58. Arcamone F, Penco S, Orezzi P, Nicoletta V, Pirelli A. Structure and Synthesis of Distamycin A. *Nature*. 1964 Sep;203(4949):1064–5.
59. Bamgbose SOA. Antagonism of the trypanocide, berenil, and the nematocide, morantel, by tubocurarine. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 1973;280(1):103–6.

60. Shokeir AA, al-Hussaini MK, Wasfy IA. Methyl green-pyronin stain for the diagnosis of trachoma. *British Journal of Ophthalmology*. 1969 Apr 1;53(4):263–6.
61. Husale S, Grange W, Hegner M. DNA Mechanics Affected by Small DNA Interacting Ligands. *Single Mol*. 2002 Jun;3(2–3):91–6.
62. Shokri L, Marintcheva B, Eldib M, Hanke A, Rouzina I, Williams MC. Kinetics and thermodynamics of salt-dependent T7 gene 2.5 protein binding to single- and double-stranded DNA. *Nucleic Acids Research*. 2008 Aug 21;36(17):5668–77.
63. McCauley MJ, Shokri L, Sefcikova J, Venclovas Č, Beuning PJ, Williams MC. Distinct Double- and Single-Stranded DNA Binding of *E. coli* Replicative DNA Polymerase III α Subunit. *ACS Chem Biol*. 2008 Sep 19;3(9):577–87.
64. Shokri L, Marintcheva B, Richardson CC, Rouzina I, Williams MC. Single Molecule Force Spectroscopy of Salt-dependent Bacteriophage T7 Gene 2.5 Protein Binding to Single-stranded DNA. *Journal of Biological Chemistry*. 2006 Dec;281(50):38689–96.
65. Cruceanu M. Nucleic acid binding and chaperone properties of HIV-1 Gag and nucleocapsid proteins. *Nucleic Acids Research*. 2006 Jan 30;34(2):593–605.
66. Cruceanu M, Stephen AG, Beuning PJ, Gorelick RJ, Fisher RJ, Williams MC. Single DNA molecule stretching measures the activity of chemicals that target the HIV-1 nucleocapsid protein. *Analytical Biochemistry*. 2006 Nov;358(2):159–70.
67. Cruceanu M, Gorelick RJ, Musier-Forsyth K, Rouzina I, Williams MC. Rapid Kinetics of Protein–Nucleic Acid Interaction is a Major Component of HIV-1 Nucleocapsid Protein’s Nucleic Acid Chaperone Function. *Journal of Molecular Biology*. 2006 Nov;363(5):867–77.
68. Pant K, Karpel RL, Rouzina I, Williams MC. Salt Dependent Binding of T4 Gene 32 Protein to Single and Double-stranded DNA: Single Molecule Force Spectroscopy Measurements. *Journal of Molecular Biology*. 2005 Jun;349(2):317–30.

69. Pant K, Karpel RL, Rouzina I, Williams MC. Mechanical Measurement of Single-molecule Binding Rates: Kinetics of DNA Helix-destabilization by T4 Gene 32 Protein. *Journal of Molecular Biology*. 2004 Feb;336(4):851–70.
70. Davis WR, Gabbara S, Hupe D, Peliska JA. Actinomycin D Inhibition of DNA Strand Transfer Reactions Catalyzed by HIV-1 Reverse Transcriptase and Nucleocapsid Protein. *Biochemistry*. 1998 Oct 1;37(40):14213–21.
71. Guo J, Wu T, Bess J, Henderson LE, Levin JG. Actinomycin D Inhibits Human Immunodeficiency Virus Type 1 Minus-Strand Transfer in In Vitro and Endogenous Reverse Transcriptase Assays. *J Virol*. 1998 Aug;72(8):6716–24.
72. Jeeninga RE, Huthoff HT, Berkhout B, Gultyaev AP. The mechanism of actinomycin D-mediated inhibition of HIV-1 reverse transcription. *Nucleic Acids Research*. 1998 Dec 1;26(23):5472–9.
73. Chen FM, Sha F, Chin KH, Chou SH. Binding of Actinomycin D to Single-Stranded DNA of Sequence Motifs d(TGTCTnG) and d(TGTnGTCT). *Biophysical Journal*. 2003 Jan;84(1):432–9.
74. Broude NE, Budowsky EI. The reaction of glyoxal with nucleic acid components III. Kinetics of the reaction with monomers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synthesis*. 1971 Dec;254(3):380–8.
75. Broude NE, Budowsky EJ. The reaction of glyoxal with nucleic acid components. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synthesis*. 1973 Feb;294(3):378–84.
76. Johnson D. A new method of DNA denaturation mapping. *Nucl Acids Res*. 1975;2(11):2049–54.
77. Lyamichev VI, Panyutin IG, Lyubchenko YuL. Gel electrophoresis of partially denatured DNA. Retardation effect: its analysis and application. *Nucl Acids Res*. 1982;10(15):4813–26.

78. Lyubchenko YuL, Kalambet YuA, Lyamichev VI, Borovik AS. A comparison of experimental and theoretical melting maps for replicative form of ϕ X174 DNA. *Nucl Acids Res.* 1982;10(6):1867–76.
79. Shokri L, McCauley MJ, Rouzina I, Williams MC. DNA Overstretching in the Presence of Glyoxal: Structural Evidence of Force-Induced DNA Melting. *Biophysical Journal.* 2008 Aug;95(3):1248–55.
80. Rocha MS, Viana NB, Mesquita ON. DNA-psoralen interaction: A single molecule experiment. *The Journal of Chemical Physics.* 2004 Nov 15;121(19):9679–83.
81. Garcia-Sampedro A, Tabero A, Mahamed I, Acedo P. Multimodal use of the porphyrin TMPyP: From cancer therapy to antimicrobial applications. *J Porphyrins Phthalocyanines.* 2019 Jan;23(01n02):11–27.
82. Villanueva A, Stockert JC, Cañete M, Acedo P. A new protocol in photodynamic therapy: enhanced tumour cell death by combining two different photosensitizers. *Photochem Photobiol Sci.* 2010 Mar;9(3):295–7.
83. Georgiou GN, Ahmet MT, Houlton A, Silver J, Cherry RJ. MEASUREMENT OF THE RATE OF UPTAKE AND SUBCELLULAR LOCALIZATION OF PORPHYRINS IN CELLS USING FLUORESCENCE DIGITAL IMAGING MICROSCOPY. *Photochem & Photobiology.* 1994 Apr;59(4):419–22.
84. Villanueva A, Caggiari L, Jori G, Milanesi C. Morphological aspects of an experimental tumour photosensitized with a meso-substituted cationic porphyrin. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.* 1994 Apr;23(1):49–56.
85. Pizova K, Bajgar R, Fillerova R, Kriegova E, Cenklova V, Langova K, Konecny P, Kolarova H. C-MYC and C-FOS expression changes and cellular aspects of the photodynamic reaction with photosensitizers TMPyP and ClAlPcS2. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.* 2015 Jan;142:186–96.
86. Tita SPS, Perussi JR. The effect of porphyrins on normal and transformed mouse cell lines in the presence of visible light. *Braz J Med Biol Res.* 2001 Oct;34(10):1331–6.

87. Demidova TN, Hamblin MR. Photodynamic Therapy Targeted to Pathogens. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2004 Sep;17(3):245–54.
88. Dai T, Huang YY, Hamblin MR. Photodynamic therapy for localized infections—State of the art. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2009 Sep;6(3–4):170–88.
89. Vera DMA, Haynes MH, Ball AR, Dai T, Astrakas C, Kelso MJ, Hamblin MR, Tegos GP. Strategies to Potentiate Antimicrobial Photoinactivation by Overcoming Resistant Phenotypes †. *Photochem & Photobiology*. 2012 May;88(3):499–511.
90. Tavares A, Carvalho CMB, Faustino MA, Neves MGPM, Tomé JPC, Tomé AC, Cavaleiro JAS, Cunha Â, Gomes NCM, Alves E, Almeida A. Antimicrobial Photodynamic Therapy: Study of Bacterial Recovery Viability and Potential Development of Resistance after Treatment. *Marine Drugs*. 2010 Jan 20;8(1):91–105.
91. North J, Neyndorff H, Levy JG. New trends in photobiology: Photosensitizers as virucidal agents. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 1993 Feb;17(2):99–108.
92. Zupán K. A fotoaktiváció szerepe gyógyszerek, vegyszerek genotoxicitásában - DNS és nukleoproteid komplex fotoszenzibilizációja kationos porfirinszármazékkal. In 2008. p. 124.
93. Zupán K, Herényi L, Tóth K, Egyeki M, Csík G. Binding of Cationic Porphyrin to Isolated DNA and Nucleoprotein Complex: Quantitative Analysis of Binding Forms under Various Experimental Conditions. *Biochemistry*. 2005 Nov 1;44(45):15000–6.
94. Zupán K, Herényi L, Tóth K, Majer Z, Csík G. Binding of Cationic Porphyrin to Isolated and Encapsidated Viral DNA Analyzed by Comprehensive Spectroscopic Methods. *Biochemistry*. 2004 Jul 1;43(28):9151–9.

95. Taka T, Joonlasak K, Huang L, Randall Lee T, Chang SWT, Tuntiwechapikul W. Down-regulation of the human VEGF gene expression by perylene monoimide derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2012 Jan;22(1):518–22.
96. Kim MY, Gleason-Guzman M, Izbicka E, Nishioka D, Hurley LH. The Different Biological Effects of Telomestatin and TMPyP4 Can Be Attributed to Their Selectivity for Interaction with Intramolecular or Intermolecular G-Quadruplex Structures. *Cancer Research*. 2003 Jun 15;63(12):3247–56.
97. Molnár OR, Végh A, Somkuti J, Smeller L. Characterization of a G-quadruplex from hepatitis B virus and its stabilization by binding TMPyP4, BRACO19 and PhenDC3. *Sci Rep*. 2021 Dec 1;11(1):23243.
98. Ruan TL, Davis SJ, Powell BM, Harbeck CP, Habdas J, Habdas P, Yatsunyk LA. Lowering the overall charge on TMPyP4 improves its selectivity for G-quadruplex DNA. *Biochimie*. 2017 Jan;132:121–30.
99. Cervenak M, Molnár OR, Horváth P, Smeller L. Stabilization of G-Quadruplex Structures of the SARS-CoV-2 Genome by TMPyP4, BRACO19, and PhenDC3. *IJMS*. 2024 Feb 20;25(5):2482.
100. Artusi S, Ruggiero E, Nadai M, Tosoni B, Perrone R, Ferino A, Zanin I, Xodo L, Flamand L, Richter SN. Antiviral Activity of the G-Quadruplex Ligand TMPyP4 against Herpes Simplex Virus-1. *Viruses*. 2021 Jan 28;13(2):196.
101. Kakiuchi T, Ito F, Nagamura T. Time-Resolved Studies of Energy Transfer from *meso*-Tetrakis(*N*-methylpyridinium-4-yl)- porphyrin to 3,3'-Diethyl-2,2'-thiatricarbocyanine Iodide along Deoxyribonucleic Acid Chain. *J Phys Chem B*. 2008 Apr 1;112(13):3931–7.
102. Mutsamwira S, Ainscough EW, Partridge AC, Derrick PJ, Filichev VV. DNA duplex as a scaffold for a ground state complex formation between a zinc cationic porphyrin and phenylethynylpyren-1-yl. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 2014 Aug;288:76–81.

103. Pathak P, Yao W, Hook KD, Vik R, Winnerdy FR, Brown JQ, Gibb BC, Pursell ZF, Phan AT, Jayawickramarajah J. Bright G-Quadruplex Nanostructures Functionalized with Porphyrin Lanterns. *J Am Chem Soc.* 2019 Aug 14;141(32):12582–91.
104. Stulz E. Nanoarchitectonics with Porphyrin Functionalized DNA. *Acc Chem Res.* 2017 Apr 18;50(4):823–31.
105. Fiel RJ. Porphyrin—Nucleic Acid Interactions: A Review. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics.* 1989 Jun;6(6):1259–74.
106. Bustamante C, Gurrieri S, Pasternack RF, Purrello R, Rizzarelli E. Interaction of water-soluble porphyrins with single- and double-stranded polyribonucleotides. *Biopolymers.* 1994 Aug;34(8):1099–104.
107. Pasternack RF, Brigandi RA, Abrams MJ, Williams AP, Gibbs EJ. Interactions of porphyrins and metalloporphyrins with single-stranded poly(dA). *Inorg Chem.* 1990 Oct;29(22):4483–6.
108. Pasternack RF, Gibbs EJ, Villafranca JJ. Interactions of porphyrins with nucleic acids. *Biochemistry.* 1983 May 10;22(10):2406–14.
109. Eriksson E, Enger J, Nordlander B, Erjavec N, Ramser K, Goksör M, Hohmann S, Nyström T, Hanstorp D. A microfluidic system in combination with optical tweezers for analyzing rapid and reversible cytological alterations in single cells upon environmental changes. *Lab Chip.* 2007;7(1):71–6.
110. Rouzina I, Bloomfield VA. Force-Induced Melting of the DNA Double Helix 1. Thermodynamic Analysis. *Biophysical Journal.* 2001 Feb;80(2):882–93.
111. Grier DG. A revolution in optical manipulation. *Nature.* 2003 Aug;424(6950):810–6.
112. Gross P, Farge G, Peterman EJG, Wuite GJL. Combining Optical Tweezers, Single-Molecule Fluorescence Microscopy, and Microfluidics for Studies of DNA–Protein Interactions. In: *Methods in Enzymology* [Internet]. Elsevier; 2010

[cited 2024 Jun 17]. p. 427–53. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687910750175>

113. Tarn MD, Lopez-Martinez MJ, Pamme N. On-chip processing of particles and cells via multilaminar flow streams. *Anal Bioanal Chem*. 2014 Jan;406(1):139–61.
114. Bokshtein BS, Mendelev MI, Srolovitz DJ. Thermodynamics and kinetics in materials science: a short course. New York: Oxford University Press; 2005. 326 p.
115. Tølbøl Sørensen K, Kristensen A. Label-Free Monitoring of Diffusion in Microfluidics. *Micromachines*. 2017 Nov 9;8(11):329.
116. Eriksson E, Sott K, Lundqvist F, Sveningsson M, Scrimgeour J, Hanstorp D, Goksör M, Granéli A. A microfluidic device for reversible environmental changes around single cells using optical tweezers for cell selection and positioning. *Lab Chip*. 2010;10(5):617–25.
117. Eriksson E, Scrimgeour J, Granéli A, Ramser K, Wellander R, Enger J, Hanstorp D, Goksör M. Optical manipulation and microfluidics for studies of single cell dynamics. *J Opt A: Pure Appl Opt*. 2007 Aug 1;9(8):S113–21.
118. Jarmoskaite I, AlSadhan I, Vaidyanathan PP, Herschlag D. How to measure and evaluate binding affinities. *eLife*. 2020 Aug 6;9:e57264.
119. Yan X, Habbersett RC, Cordek JM, Nolan JP, Yoshida TM, Jett JH, Marrone BL. Development of a Mechanism-Based, DNA Staining Protocol Using SYTOX Orange Nucleic Acid Stain and DNA Fragment Sizing Flow Cytometry. *Analytical Biochemistry*. 2000 Nov;286(1):138–48.
120. Lang K, Mosinger J, Wagnerová DM. Photophysical properties of porphyrinoid sensitizers non-covalently bound to host molecules; models for photodynamic therapy. *Coordination Chemistry Reviews*. 2004 Feb;248(3–4):321–50.
121. Diogo P, Fernandes C, Caramelo F, Mota M, Miranda IM, Faustino MAF, Neves MGPMS, Uliana MP, De Oliveira KT, Santos JM, Gonçalves T. Antimicrobial

Photodynamic Therapy against Endodontic *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* Mono and Mixed Biofilms in the Presence of Photosensitizers: A Comparative Study with Classical Endodontic Irrigants. *Front Microbiol* [Internet]. 2017 Mar 30 [cited 2024 Jul 8];8. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.00498/full>

122. Žárská L, Malá Z, Langová K, Malina L, Binder S, Bajgar R, Kolářová H. The effect of two porphyrine photosensitizers TMPyP and ZnTPPS4 for application in photodynamic therapy of cancer cells in vitro. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2021 Jun;34:102224.
123. Heffron J, Bork M, Mayer BK, Skwor T. A Comparison of Porphyrin Photosensitizers in Photodynamic Inactivation of RNA and DNA Bacteriophages. *Viruses*. 2021 Mar 23;13(3):530.
124. Cenklová V. Photodynamic therapy with TMPyP – Porphyrine induces mitotic catastrophe and microtubule disorganization in HeLa and G361 cells, a comprehensive view of the action of the photosensitizer. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2017 Aug;173:522–37.
125. Feese E, Ghiladi RA. Highly efficient in vitro photodynamic inactivation of *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2009 Oct;64(4):782–5.
126. Zupán K, Egyeki M, Tóth K, Fekete A, Herényi L, Módos K, Csík G. Comparison of the efficiency and the specificity of DNA-bound and free cationic porphyrin in photodynamic virus inactivation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2008 Feb;90(2):105–12.
127. Salmon-Divon M, Nitzan Y, Malik Z. Mechanistic aspects of *Escherichia coli* photodynamic inactivation by cationic tetra-meso(N-methylpyridyl)porphine. *Photochem Photobiol Sci*. 2004 May;3(5):423–9.

128. Haldar S, Zhang Y, Xia Y, Islam B, Liu S, Gervasio FL, Mulholland AJ, Waller ZAE, Wei D, Haider S. Mechanistic Insights into the Ligand-Induced Unfolding of an RNA G-Quadruplex. *J Am Chem Soc.* 2022 Jan 19;144(2):935–50.
129. Zhou W, Cheng Y, Song B, Hao J, Miao W, Jia G, Li C. Cationic Porphyrin-Mediated G-Quadruplex DNA Oxidative Damage: Regulated by the Initial Interplay between DNA and TMPyP4. *Biochemistry.* 2021 Dec 7;60(48):3707–13.
130. Ramos CIV, Monteiro AR, Moura NMM, Faustino MAF, Trindade T, Neves MGPM. The Interactions of H₂TMPyP, Analogues and Its Metal Complexes with DNA G-Quadruplexes—An Overview. *Biomolecules.* 2021 Sep 25;11(10):1404.
131. Pérez-Arnaiz C, Busto N, Santolaya J, Leal JM, Barone G, García B. Kinetic evidence for interaction of TMPyP4 with two different G-quadruplex conformations of human telomeric DNA. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects.* 2018 Mar;1862(3):522–31.
132. Boschi E, Davis S, Taylor S, Butterworth A, Chirayath LA, Purohit V, Siegel LK, Buenaventura J, Sheriff AH, Jin R, Sheardy R, Yatsunyk LA, Azam M. Interaction of a Cationic Porphyrin and Its Metal Derivatives with G-Quadruplex DNA. *J Phys Chem B.* 2016 Dec 22;120(50):12807–19.
133. Bončina M, Podlipnik Č, Piantanida I, Eilmes J, Teulade-Fichou MP, Vesnaver G, Lah J. Thermodynamic fingerprints of ligand binding to human telomeric G-quadruplexes. *Nucleic Acids Res.* 2015 Nov 5;gkv1167.
134. Felgenträger A, Gonzales FP, Maisch T, Bäuml W. Ion-induced stacking of photosensitizer molecules can remarkably affect the luminescence detection of singlet oxygen in *Candida albicans* cells. *J Biomed Opt.* 2013 Apr 3;18(4):045002.
135. Kellermayer MSZ, Smith SB, Bustamante C, Granzier HL. Complete Unfolding of the Titin Molecule under External Force. *Journal of Structural Biology.* 1998;122(1–2):197–205.

136. Lee S, Jeon SH, Kim BJ, Han SW, Jang HG, Kim SK. Classification of CD and absorption spectra in the Soret band of H₂TMPyP bound to various synthetic polynucleotides. *Biophysical Chemistry*. 2001 Sep;92(1–2):35–45.
137. Arnaud P, Zakrzewska K, Meunier B. Theoretical study of the interaction between a high-valent manganese porphyrin oxyl-(hydroxo)-Mn(IV)-TMPyP and double-stranded DNA. *J Comput Chem*. 2003 May;24(7):797–805.
138. Ishikawa Y, Tomisugi Y, Uno T. Molecular modeling of anti-parallel G-quadruplex DNA/TMPyP complexes. *Nucleic Acids Symposium Series*. 2006 Nov 1;50(1):331–2.
139. Le VH, Nagesh N, Lewis EA. Bcl-2 Promoter Sequence G-Quadruplex Interactions with Three Planar and Non-Planar Cationic Porphyrins: TMPyP₄, TMPyP₃, and TMPyP₂. Tajmir-Riahi HA, editor. *PLoS ONE*. 2013 Aug 20;8(8):e72462.
140. Lubitz I, Borovok N, Kotlyar A. Interaction of Monomolecular G₄-DNA Nanowires with TMPyP: Evidence for Intercalation. *Biochemistry*. 2007 Nov 1;46(45):12925–9.
141. Serra VV, Teixeira R, Andrade SM, Costa SMB. Design of polyelectrolyte core-shells with DNA to control TMPyP binding. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2016 Oct;146:127–35.
142. McCauley MJ, Williams MC. Mechanisms of DNA binding determined in optical tweezers experiments. *Biopolymers*. 2007 Feb 5;85(2):154–68.
143. McCauley MJ, Williams MC. Optical tweezers experiments resolve distinct modes of DNA-protein binding. *Biopolymers*. 2009 Apr;91(4):265–82.
144. Almaqwashi AA, Zhou W, Naufer MN, Riddell IA, Yilmaz ÖH, Lippard SJ, Williams MC. DNA Intercalation Facilitates Efficient DNA-Targeted Covalent Binding of Phenanthriplatin. *J Am Chem Soc*. 2019 Jan 30;141(4):1537–45.

145. Reis LA, Ramos EB, Rocha MS. DNA Interaction with Diaminobenzidine Studied with Optical Tweezers and Dynamic Light Scattering. *J Phys Chem B*. 2013 Nov 21;117(46):14345–50.
146. Bosaeus N, El-Sagheer AH, Brown T, Åkerman B, Nordén B. Force-induced melting of DNA—evidence for peeling and internal melting from force spectra on short synthetic duplex sequences. *Nucleic Acids Res*. 2014 Jul 8;42(12):8083–91.
147. Shokri L, Rouzina I, Williams MC. Interaction of bacteriophage T4 and T7 single-stranded DNA-binding proteins with DNA. *Phys Biol*. 2009 Jul 1;6(2):025002.
148. Lian C, Robinson H, Wang AHJ. Structure of Actinomycin D bound with (GAAGCTTC)₂ and (GATGCTTC)₂ and Its Binding to the (CAG)_n:(CTG)_n Triplet Sequence As Determined by NMR Analysis. *J Am Chem Soc*. 1996 Jan 1;118(37):8791–801.
149. Müller W, Crothers DM. Studies of the binding of actinomycin and related compounds to DNA. *Journal of Molecular Biology*. 1968 Jan;35(2):251–90.
150. Sobell HM, Jain SC. Stereochemistry of actinomycin binding to DNA. *Journal of Molecular Biology*. 1972 Jul;68(1):21–34.
151. Sobell HM, Jain SC, Sakore TD, Nordman CE. Stereochemistry of Actinomycin–DNA Binding. *Nature New Biology*. 1971 Jun;231(24):200–5.
152. Takusagawa F, Dabrow M, Neidle S, Berman HM. The structure of a pseudo intercalated complex between actinomycin and the DNA binding sequence d(GpC). *Nature*. 1982 Apr;296(5856):466–9.
153. Chen FM. The nature of actinomycin D binding to d(AACCAXYG) sequence motifs. *Nucleic Acids Research*. 2004 Jan 2;32(1):271–7.
154. Rill RL, Hecker KH. Sequence-Specific Actinomycin D Binding to Single-Stranded DNA Inhibits HIV Reverse Transcriptase and Other Polymerases. *Biochemistry*. 1996 Jan 1;35(11):3525–33.

155. Wadkins RM, Jovin TM. Actinomycin D and 7-aminoactinomycin D binding to single-stranded DNA. *Biochemistry*. 1991 Oct 1;30(39):9469–78.
156. Zhou X, Shen Z, Li D, He X, Lin B. Study of interactions between actinomycin D and oligonucleotides by microchip electrophoresis and ESI-MS. *Talanta*. 2007 Apr 30;72(2):561–7.
157. Alexopoulos E, Jares-Erijman EA, Jovin TM, Klement R, Machinek R, Sheldrick GM, Usón I. Crystal and solution structures of 7-amino-actinomycin D complexes with d(TTAGBrUT), d(TTAGTT) and d(TTTAGTTT). *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2005 Apr 1;61(4):407–15.
158. Wadkins RM, Jares-Erijman EA, Klement R, Rüdiger A, Jovin TM. Actinomycin D Binding to Single-stranded DNA: Sequence Specificity and Hemi-intercalation Model from Fluorescence and ¹H NMR Spectroscopy. *Journal of Molecular Biology*. 1996 Sep;262(1):53–68.
159. Paramanathan T, Vladescu I, McCauley MJ, Rouzina I, Williams MC. Force spectroscopy reveals the DNA structural dynamics that govern the slow binding of Actinomycin D. *Nucleic Acids Research*. 2012 Jun 1;40(11):4925–32.

10. Saját publikációk jegyzéke

10.1. A disszertációhoz kapcsolódó közlemények

Kretzer B, Herényi L, Csík G, Supala E, Orosz Á, Tordai H, Kiss B, Kellermayer M. TMPyP binding evokes a complex, tunable nanomechanical response in DNA. *Nucleic Acids Research*. 2024 Jun 29;52(14):8399–418. IF: 16,7

Kretzer B, Kiss B, Tordai H, Csík G, Herényi L, Kellermayer M. Single-Molecule Mechanics in Ligand Concentration Gradient. *Micromachines*. 2020 Feb 19;11(2):212. IF: 2,891

10.2. A disszertációhoz nem kapcsolódó közlemények

Stromp M, Farkas A, Kretzer B, Száz D, Barta A, Horváth G. How realistic are painted lightnings? Quantitative comparison of the morphology of painted and real lightnings: a psychophysical approach. *Proc R Soc A*. 2018 Jun;474(2214):20170859. IF: 2,818

Száz D, Farkas A, Barta A, Kretzer B, Blahó M, Egri Á, Szabó G, Horváth G. Accuracy of the hypothetical sky-polarimetric Viking navigation versus sky conditions: revealing solar elevations and cloudinesses favourable for this navigation method. *Proc R Soc A*. 2017 Sep;473(2205):20170358. IF: 2,410

Horváth G, Takács P, Kretzer B, Szilasi S, Száz D, Farkas A, Barta A. Celestial polarization patterns sufficient for Viking navigation with the naked eye: detectability of Haidinger's brushes on the sky versus meteorological conditions. *R Soc open sci*. 2017 Feb;4(2):160688. IF: 2,504

Száz D, Farkas A, Barta A, Kretzer B, Egri Á, Horváth G. North error estimation based on solar elevation errors in the third step of sky-polarimetric Viking navigation. *Proc R Soc A*. 2016 Jul;472(2191):20160171. IF: 2,146

Száz D, Farkas A, Blahó M, Barta A, Egri Á, Kretzer B, Hegedüs T, Jäger Z, Horváth G. Adjustment errors of sunstones in the first step of sky-polarimetric Viking navigation: studies with dichroic cordierite/ tourmaline and birefringent calcite crystals. *R Soc open sci*. 2016 Jan;3(1):150406. IF:2,243

11. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm Dr. Kellermayer Miklósnak a témavezetését, segítségét és biztatását doktori munkám során. Külön köszönöm, hogy lehetőséget biztosított egy olyan korszerű műszer használatára, mint amilyen a Biofizika Intézetben található lézercsipesz.

Szeretném megköszönni Dr. Herényi Leventének azt a rengeteg segítséget és tanácsot, amit tőle kaptam az évek során, szakmai és emberi értelemben egyaránt. Jókedélyűsége és türelme példaértékű számomra.

Köszönöm továbbá Dr. Tordai Hedvignek, hogy segített eligazodni a labormunka útvesztőiben és számos hasznos tanáccsal, valamint észrevétellel járult hozzá doktori munkámhoz.

Köszönöm Dr. Csík Gabriellának, hogy bevezetett a porfirinek világába.

Köszönet illeti Dr. Orosz Ádámot is, hogy porfirinekkal kapcsolatos kérdéseimmel mindig tudtam hozzá fordulni. Filozófiai, pszichológiai és zenei témájú beszélgetéseinket kedves emlékeimként tartom számon.

Nagyon köszönöm Dr. Kiss Bálintnak, hogy megtanított a lézercsipesz használatára és hogy mindig segítségemre volt. Kitartása és szorgalma sok esetben jelentett számomra motivációt.

Szeretném megköszönni Komárné Drabbant Mónikának és Szendefyné Lór Krisztinának, hogy segítségemre voltak a kísérletek előkészítése során.

Köszönetet szeretnék mondani Dr. Csányi Csillának és Dr. Mártonfalvi Zsoltnak, hogy vállalták dolgozatom házi bírálatát.

Továbbá nagy köszönet illeti az Intézet mindazon munkatársait, akik munkájukkal, tanácsaikkal vagy barátságukkal segítségemre voltak az évek során.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném köszönetemet kifejezni Suhajda Erzsébetnek és családomnak segítségükért, támogatásukért és szeretetükért, valamint azért, hogy mindig hittek bennem. Hálásan köszönöm!