

DNS-TMPyP kölcsönhatás nanomechanikai vizsgálata

Doktori tézisek

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

1. Bevezetés

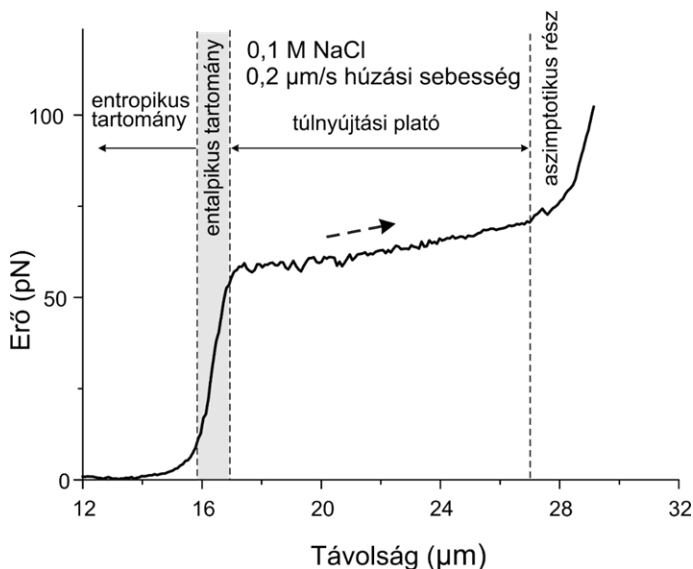
A porfirinek a DNS-kötő molekulák jelentős és széles körben vizsgált csoportját alkotják, köszönhetően strukturális sokféleségüknek és kötési tulajdonságaiknak. Közülük kiemelkedik a doktori munkám tárgyát képező TMPyP, amely erős affinitással kötődik a DNS-hez, valamint figyelemre méltó fluoreszcens tulajdonságokkal rendelkezik. E jellemzők lehetővé teszik széleskörű alkalmazhatóságát a biológiai és gyógyszerészeti kutatásokban.

A porfirineket és származékaikat a fotodinamikus terápiában („Photodynamic Therapy”; PDT) betöltött szerepük miatt nagy tudományos érdeklődés övezi. 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. Ezen felül a kationos porfirinek – mint amilyen a TMPyP is – széleskörű antimikrobiális hatással bírnak. A fotodinamikus vírusinaktiváció szintén fontos kutatási területe a porfirineknek, a TMPyP-t vizsgálták kifejezetten vírusinaktivációs tulajdonságai miatt is. A TMPyP kölcsönhatása a G-kvadruplexekkel szintén nagy tudományos érdeklődést váltott ki, ezen felül a TMPyP-t és származékait felhasználják építőkövekként is funkcionális szerkezetekben.

Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy a TMPyP planáris szerkezetének köszönhetően képes interkalálódni a bázispárok közé, és a kettősszájú DNS kis árkaihoz is képes kötődni. 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. A TMPyP képes kötődni az egyszájú DNS-hez is, és katalizálja a kettősszájú DNS képződését.

Tekintettel arra, hogy a TMPyP komplex módon kötődik a DNS-hez, valamint a kötődés típusa – és ezáltal a DNS-re gyakorolt hatása – több paramétertől függ, ezért doktori munkám során egymolekula vizsgálati módszereket (lézercsipesz, AFM) alkalmaztam a kötődés folyamatának, továbbá a DNS nanomechanikájára gyakorolt hatásának széleskörű feltérképezésére.

A lézercsipeszben a két gyöngy közé kifeszített DNS-t 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 (1. ábra). A kettősszalú DNS erőgörbéje 4 főbb tartományra osztható. Az első tartományban a DNS viselkedését termikus fluktuációk határozzák meg. Ebben a tartományban a DNS szemiflexibilis rúdként modellezhető. A rugalmasság elsősorban entrópikus hatásoknak köszönhető, ezért ezt a tartományt entrópikus tartománynak nevezzük. Ezt követi az entalpikus tartomány, melyben a megnyúlás és az erő közötti kapcsolat megközelítőleg lineáris. Ebben a tartományban, 30-35 pN-nál éri el a DNS a kontúrhosszát. A molekula további nyújtásával elérhető az ún. túlnyújtási átmenet, vagy túlnyújtási plató. Az átmenet során a molekula jelentősen, kontúrhosszán felül mintegy 70%-kal túlnyúlik a húzóerő minimális, néhány pN-os növekedése mellett. A negyedik, aszimptotikus, vagy második entalpikus régiónak is nevezhető részen a DNS-molekula további megnyúlása újbóli, jelentős húzóerő-növekedés mellett érhető el. A két szálát néhány GC-gazdag régió tartja össze a túlnyújtási átmenet után.

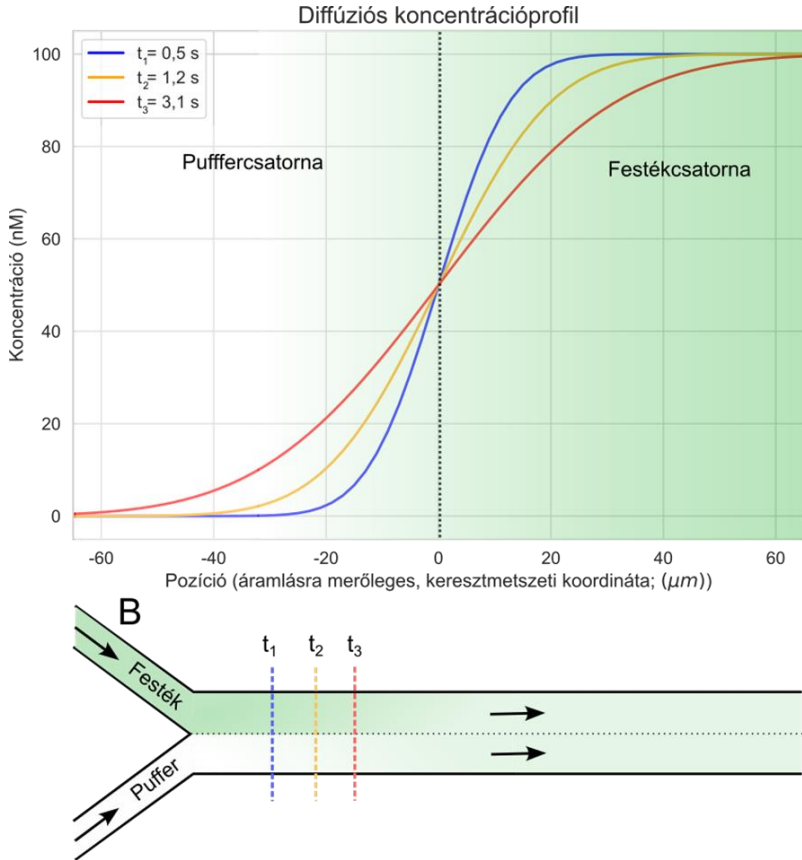


1. ábra. A kettősszájú λ -DNS kísérletesen kapott erő-távolság görbéje 0,1 M NaCl koncentrációnál és 0,2 $\mu\text{m/s}$ húzási sebességnél az erőgörbére jellemző tartományok feltüntetésével: entropikus tartomány, entalpikus tartomány, túlnyújtási átmenet, vagy más néven túlnyújtási plató és aszimptotikus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

A lézercsipeszt gyakran kombinálják mikrofluidikai cellával, melyben a kísérletet végzik. A cellában a lamináris áramlás lehetővé teszi a különböző csatornákon beérkező folyadékáramok szétválasztását. A cella mozgatásával lehetőség nyílik a csapdázó lézerek relatív mozgatására a különböző folyadékáramok között. Ez lehetővé teszi például a mikrogöngyökhöz kihorgonyozott DNS mozgatását 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 vizsgáljuk. Fontos azonban figyelembe venni, hogy a diffúzió következtében a szomszédos puffer- és festékcatornák között egy nem elhanyagolható kiterjedésű koncentrációprofil alakulhat ki. Ezt figyelembe véve kijelenthető, hogy a két csatorna közötti átmenet nem lesz azonnali a koncentrációváltozás szempontjából, különösen a gyorsan kötődő molekulák esetében. A koncentrációprofil az áramlási sebességtől, a puffer- és a DNS-kötő molekulákat tartalmazó csatornák találkozási pontjától mért távolságtól, a molekula diffúziós állandójától és kezdeti koncentrációjától függ (2. ábra).

A mikrofluidikai cellában kialakuló koncentrációprofil vizsgálata nem csak az adott DNS-kötő molekula kötődési folyamatainak feltérképezéséhez nyújt lényeges információt, de olyan metodikai lehetőségek előtt is utat nyithat, mint például több koncentráció vizsgálata egyazon mérés során a vizsgált DNS-molekula megfelelő pozicionálásával a koncentrációprofil mentén. Munkám során ezért egymolekuláris perspektívából vizsgáltam meg a folyadékarámok között kialakuló koncentrációprofil, a feltérképezésétől kezdve annak különböző, egymolekula biofizikában történő alkalmazhatóságainak lehetőségéig.



2. ábra. Diffúzió következtében kialakuló koncentrációprofilok mikrofluidikai cellában. **(A)** A puffer- és festékcscatorna között, az áramlás irányára merőleges, egy dimenzió mentén vett koncentrációprofilok 3 időpillanatban, 100 nM maximális koncentrációnál. A két csatorna elméleti határát függőleges szaggatott vonal jelöli, a festékcscatornában lévő, illetve a puffercscatornába átdiffundáló festéket halványzöld háttér jelöli. **(B)** Kétcscatornás mikrofluidikai cella sematikus rajza a 3 időpillanatban vett koncentrációprofilokkal (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.

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 koncentrácioprofil fluoreszcencián és nanomechanikai elven alapuló karakterizálására és egymolekula szinten, lézercsípesszel 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 egyszálú DNS nanomechanikai tulajdonságait?

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

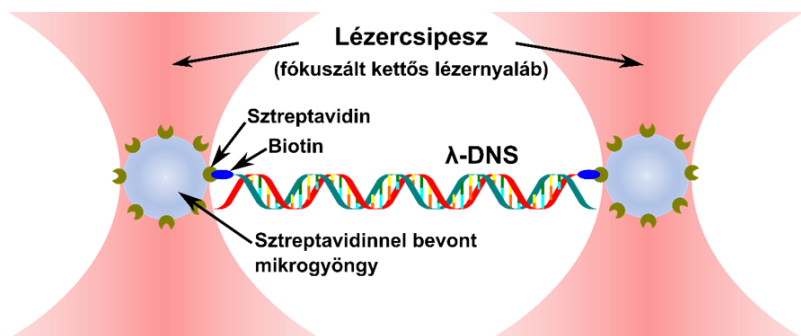
7. Milyen módokon alkalmazható a koncentrációprofil egymolekula kísérletekben?

3. Módszerek

3.1. Lézercsipesszel végzett kísérletek módszerei

A λ -fág DNS-ek mechanikai vizsgálatához egy kétsapdás 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. A mikrogyöngyöket 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 gyöngyöket – már ismét áramlásban – átmozgattam a DNS-eket tartalmazó csatornába, hogy kihorgonyozzam a molekulákat a gyöngyökre a sztreptavidin-biotin kötést felhasználva (3. ábra).



3. ábra. Biotinált, kettősszálú DNS kihorgonyzását bemutató sematikus ábra.

A 3'-3' végein biotinált DNS a sztrepavidinnel bevont, lézercsipeszsel csapdázott mikrogönggyökhöz kötődik. A csapdázó lézer mozgatásával így lehetőség van a DNS-molekula nanomechanikai manipulációjára.

3.1.1. DNS-erőgörbék mérése

Egyetlen DNS-molekula erőgörbéjének meghatározásához először TMPyP nélküli pufferben (kontrollmérés) húztam a molekulát állandó sebességgel. Ezt követően a molekulát az adott koncentrációjú TMPyP-t tartalmazó mikrofluidikai csatornába vittem. A cellában az áramlást a mérések során leállítottam. A DNS-erőgörbék TMPyP-től való függését 3 különböző NaCl-koncentrációnál (0,01, 0,1 és 1 M) végzett mérésorozat esetében vizsgáltam. Egy mérésorozatban belül 5-től 5120 nM-ig terjedő TMPyP-koncentrációkkal dolgoztam, duplázva a megelőző koncentrációt. Adott mérésorozatban belül, és adott TMPyP koncentrációnál 3 különböző nyújtási sebesség mellett vizsgáltam a TMPyP hatását.

3.1.2. Egyszálú DNS lézercsipeszben történő előállítása

Az egyszálú DNS-molekula vizsgálatához a kiinduló molekula egy kettősszálú, λ -fág DNS volt, melynek egyik szála volt a 3'-5' végein biotinálva. A kettősszálú DNS-t annyira kell megnyújtani, hogy a túlnyújtási

átmenet végéhez legyen közel azért, hogy a kettős szálát stabilizáló, bázispárok közötti hidrogénkötések jelentős része felszakadjon. Ezután 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 már a kísérlet során látható, hogy ha az az egyszálú DNS erőgörbéjét veszi fel. Az így kapott egyszálú DNS-t pufferben, valamint 320 nM TMPyP mellett vizsgáltam, külön mérve a TMPyP-nek a DNS-szálból történő kimosódását is pufferben.

3.1.3. Koncentrácioprofil feltérképezése

A méréseket a TMPyP és a többi csatorna összefolyásától ~100 μm távolságra pozicionáltuk. A kísérletek során végig állandó oldatáramlási sebességet tartottunk fenn. A mechanikai méréseket vagy állandó nyújtási sebesség (500 nm/s) vagy állandó erő (35 pN) mellett végeztük. A fluoreszcencia méréséhez 532 nm-es Nd:YAG lézert (Lumicks) használtunk gerjesztéshez. A fluoreszcenciaemissziót 545-620 nm hullámhossztartományban fotonszámláló lavina fotodiódával mértük. Az idő függvényében vagy az X-Y síkban lévő képeket, vagy a molekuláris távolságot rögzítettük.

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. Az ennek következtében fellépő diffúzió során kialakul egy időben (az áramlás mentén) változó koncentrácioprofil. A DNS-kötő molekula koncentrációjának tényleges keresztmetszeti eloszlását az SxO fluoreszcencia intenzitásának a koncentrácioprofil mentén (azaz az áramlás irányára merőlegesen) vett egydimenziós leképezésével jellemeztük.

A koncentrációprofil mechanikusan is feltérképeztük, melyhez két módszert alkalmaztunk. Az elsőben egyetlen, 35 pN állandó erővel megfeszített kettősszálú DNS-molekulát mozgattunk állandó sebességgel (18,5 $\mu\text{m/s}$) a gradiens mentén, úgy, hogy a molekula tengelye párhuzamos volt az áramlás irányával. A második módszer során a DNS-molekulát gyorsan (500 $\mu\text{m/s}$ sebességgel), diszkrét, 38 μm -es lépésekben mozgattuk a koncentrációprofil mentén és a DNS hosszát az idő függvényében ábráztuk.

3.1.4. Koncentrációlépcső

A koncentrációlépcsőt jelentő kísérletekben a kettősszálú DNS-molekulákat állandó erőknél (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 molekula koncentrációprofil mentén történő mozgása után. Ugyanazt a molekulát továbbá, a TMPyP csatornába történő mozgathatóságnál 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.

3.2. 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) rugólapkákkal pásztáztuk non-kontakt üzemmódban, a rezonanciafrekvencia (~ 20 kHz) közelében fototermikus gerjesztéssel rezonáltatva. A pásztázási sebesség 0,5 $\mu\text{m/s}$ körül

volt, továbbá a pásztázási felbontás 512 pixel/vonal volt minden kép esetében. 100 μ l DNS-mintát cseppentettünk szárított, poli-L-lizin (PLL) bevonatú csillámfelületre. Ezt követően a TMPyP hatásának méréséhez a PLL felületéhez előzetesen kötött kettősszalú 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-szalak ($n=75$) 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. A DNS-molekula végeit a tengelyirányú nyomvonal mentén, a topográfiai maximális magasság felénél lévő pontokban határoztuk meg.

4. Eredmények

4.1. DNS-TMPyP erő-távolság görbék

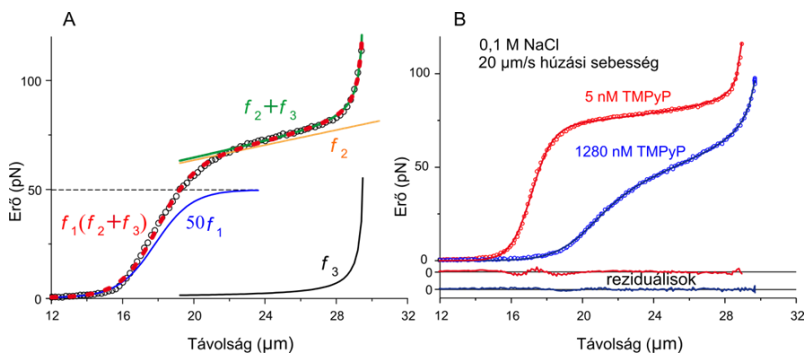
A TMPyP-koncentráció növelése jelentős változásokat eredményezett az erőgörbék minden tartományában, megnövelve a DNS kontúrhosszát és csökkentve az entalpiikus tartomány meredekségét. A túlnyújtási plató magassága a koncentráció függvényében először nőtt, majd csökkent, valamint a meredeksége nőtt a TMPyP-koncentráció emelésével.

A húzási sebesség növelésével megfigyelhető volt a görbéken egy enyhe elmozdulás a TMPyP-mentes, illetve magasabb koncentrációk esetén az alacsonyabb koncentrációjú állapot irányába. Ez a hatás azonban – a vizsgált tartományokon belül – kisebb mértékű eltéréseket eredményezett.

A NaCl-koncentráció emelésével a TMPyP hatása a DNS erőgörbéjére nézve jelentősen csökken az entrópiikus és az entalpiikus tartományokban is. Magas (1 M) NaCl-koncentráció esetén a DNS kontúrhossza csak elhanyagolható mértékben változik meg, még magas

TMPyP-koncentráció esetében is csak a túlnyújtási plató meredeksége mutat változást.

Mivel a kettősszálú DNS-TMPyP erőgörbéket több környezeti tényező mellett is vizsgáltam, melyek egymással ellentétesen, illetve egymást erősítve hathatnak a rendszer nanomechanikájára, ezért kidolgoztunk egy olyan modellt, mely a nanomechanikai változások részletes leírását és kvantitatív meghatározását segíti elő, valamint jól illeszkedik a teljes erőgörbére (4. ábra). A modell paramétereit alapján az egyes hatások és azok mértéke külön is vizsgálhatók fényt derítve olyan tartományokra is, ahol a DNS a legérzékenyebb egy adott kísérleti paraméter megváltozására.



4. 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 ($50f_1$)), 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: 5nM (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.

A 0,1 M NaCl esetében mért erőgörbék az eWLC („extensible Worm-Like Chain”) modellel is illesztettem, így meghatározva a DNS perzisztenciahosszát, kontúrhosszát és a nyújtási modulusát különböző TMPyP-koncentrációknál és húzási sebességeknél. A húzási sebességek tekintetében nem volt számottevő különbség a 3 illesztési paraméter értékeiben. A meghatározó tényező a TMPyP hatása volt, mely főként alacsony koncentrációk esetén fejt ki jelentős hatást a DNS-t jellemző 3 paraméterre. A kettősszalú 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 25 nm, illetve 300 pN körüli értékeken stabilizálódott. Ezek alapján elmondható, hogy a kettősszalú DNS nyújthatóbbá és hajlékonyabbá vált a TMPyP megkötése után.

Az egyszalú DNS erőgörbéjének vizsgálata alapján a TMPyP hatása egyértelműen jelentkezik, az egyszalú DNS kontúrhosszát és perzisztenciahosszát is megváltoztatja. A kontroll és a TMPyP kimosódása utáni erőgörbe között nincs különbség, a folyamat teljesen reverzibilis a DNS-szal nanomechanikájára nézve.

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

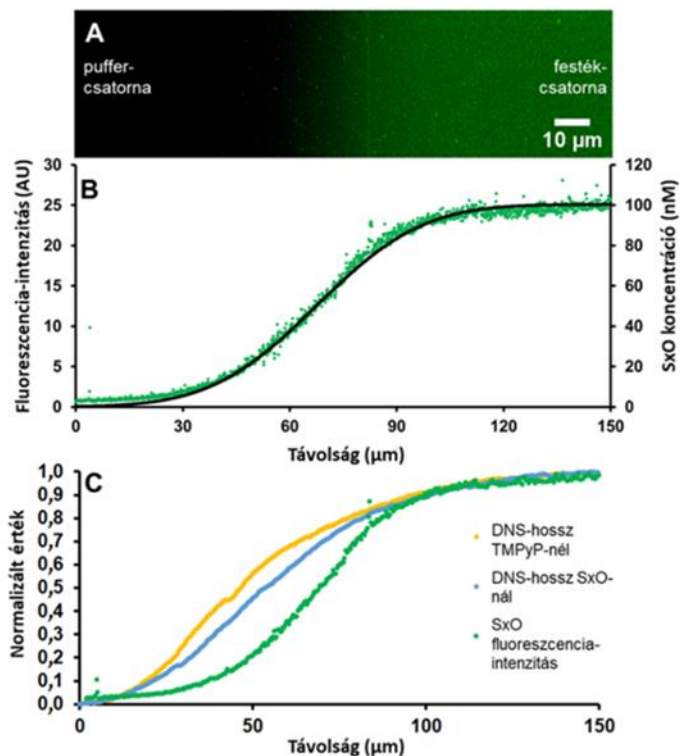
A TMPyP DNS hosszát megnövelő hatását a felülethez kötött kettősszalú DNS-molekulák kontúrhosszának AFM-mel végzett közvetlen mérésével is vizsgáltuk. Mind kontroll, mind pedig TMPyP-vel kezelt esetben, több kép alapján 75-75 DNS-t vizsgáltunk meg. 250 nM TMPyP és 0,1 M NaCl jelenlétében a kontrollhoz képest 9,9%-os kontúrhossz-növekedést mértünk.

4.3. Koncentrációprofil mentén végzett kísérletek

A többcsatornás mikrofluidikai cellával megvalósítható az oldat hatékony szabályozása és koncentrációgradiens létrehozása a szomszédos mikrocsonnak határán. A koncentrációgradiens kialakításához a két, szomszédos, lamináris áramlású mikrocsonna egyike magas koncentrációban tartalmazta a DNS-kötő molekulákat (SxO, TMPyP), míg a szomszédos csatorna csak puffert tartalmazott.

A kialakuló koncentrációprofil az SxO fluoreszcenciáján alapuló képalkotással, valamint DNS segítségével történő mechanikus pásztázással jellemeztük (5. ábra). Az alkalmazott SxO-koncentráció 100 nM volt. A puffer- és a festékcsonnak határterületének vizsgált tartományán végzett fluoreszcencia-képalkotás egy olyan területet mutatott, ahol a fluoreszcenciaintenzitás fokozatosan nőtt a puffercsatornától a festékcsonna felé (5/A ábra). A megfelelő intenzitásprofil ábrája egy szigmoidális függvényt mutatott (5/B ábra). Az intenzitásprofil illesztése $23,3 \pm 0,1 \mu\text{m}$ diffúziós távolságot eredményezett. 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. Az SxO esetében mért DNS-hosszgörbének az illesztése $29,0 \pm 0,2 \mu\text{m}$ távolságot eredményezett (5/C ábra).

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.



5. ábra. A mikrofluidikai cellában két mikrocsatorna között kialakuló koncentrációprofil karakterisztikája. **(A)** Pásztázó konfokális mikroszkópos kép két, szomszédos mikrocsatorna közötti (puffer- és festékcatorna) területről. A kezdeti SxO-koncentráció (jobbra) 100 nM. A zöld színezés mesterséges. **(B)** Az SxO-koncentrációprofil mentén mért fluoreszcenciaintenzitás (zöld pontok). A fekete, folytonos vonal a kísérleti adatokra illesztett egyenletet jelöli. **(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 µm/s állandó sebességgel történő mozgásával. Referenciaként az SxO fluoreszcenciaintenzitás adatai is láthatóak az ábrán (zöld).

Ezt követően a molekulát gyorsan visszavitettem 0 TMPyP-re, miközben továbbra is fenntartottam az állandó erősintet, és mértem a DNS hosszváltozását az idő függvényében. Az időfüggő DNS-hosszváltozásokra illesztett függvényekkel meghatároztuk a TMPyP kötési és disszociációs erőfüggő sebességi állandóit. A k_0 értéke a kötési reakcióra 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.

5. 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 erőteljes 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 koncentrációnál 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 kettősszalú DNS kontúrhossza, míg perzisztenciahossza és nyújtási modulusa csökkent a vizsgált koncentrációknál.

4. A TMPyP egyszalú DNS-hez történő kötődése és a DNS erőgörbéjének, ezáltal nanomechanikájának megváltozása kimutatható volt közvetlen, egyszalú 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 kettősszalú 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 mikrocatorna között, diffúzió következtében kialakuló koncentrációprofil jól karakterizálható fluoreszcens mikroszkópia és előfeszített, kettősszalú 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.

6. Saját publikációk jegyzéke

6.1. A disszertációhoz kapcsolódó közlemények

Kretzer B, Herényi L, Csík G, Supala E, Orosz Á, Tordai H, et al. TMPyP binding evokes a complex, tunable nanomechanical response in DNA. *Nucleic Acids Research*. 2024 Jun 29;gkae560. 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

6.2. 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