

# Meritve mehanskih lastnosti DNA z optično pinceto

Natan Osterman

Seminar pri Fiziki mehkih snovi

november 2006

## Uvod

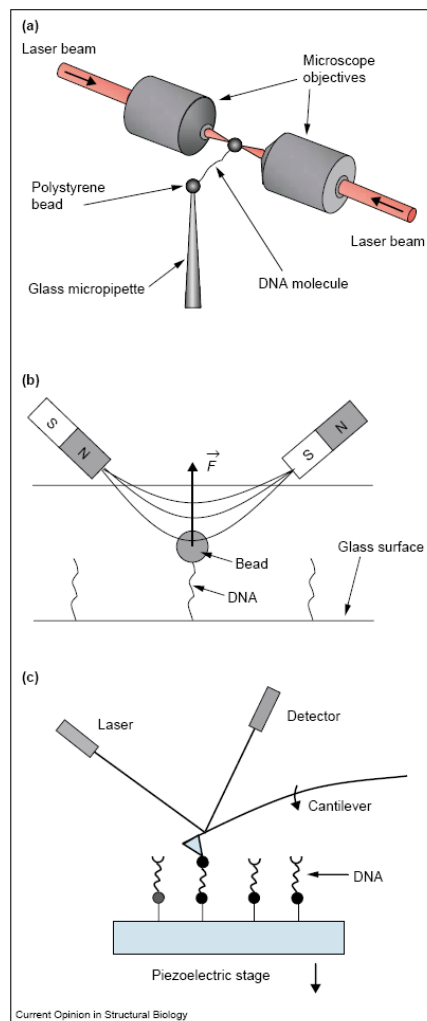
Možnost manipulacije posameznih molekul z nanometrsko natančnostjo in meritev sil z natančnostjo pikonewtona je odprla zanimiva nova področja raziskav v biofiziki. Eksperimenti manipulacije s posamezno molekulo so omogočili preskus različnih teoretičnih modelov lastnosti deoksiribonukleinske kisline (DNA) na popolnoma nov način.

Zaenkrat še ni poznan način, kako bi posamezno makromolekulo (premer reda velikosti  $nm$ ) neposredno zagrabili in z njo manipulirali. V tipičnem eksperimentu s posameznimi molekulami se preučevano molekulo najprej pritrdi na druge, večje objekte, nato pa se s temi objekti manipulira in na njih meri sile. Običajno uporabljeni objekti so koloidi velikosti od nekaj desetink mikrometra pa do nekaj mikrometrov ali pa površina celice<sup>1</sup>, v kateri se nahaja raztopina z opazovanimi makromolekulami.

Za manipulacijo makromolekul je potrebno površine koloidov oz. celice pripraviti tako, da se želeni konec molekule trdno veže na njih. Ko se molekula uspešno veže na površini, recimo en konec na površino celice, drugi pa na površino koloida, se meritve lahko pričnejo. Najpogosteje je DNA pritrjena na koloid s pomočjo kompleksa biotin-streptavidin, ki je ena izmed najmočnejših znanih nekovalentnih bioloških interakcij.

Obstaja več naprav za manipulacijo koloidov, med seboj pa se razlikujejo po principu delovanja in s tem povezano velikostjo in natančnostjo sile na posamezen koloid. Te naprave so (slika 1): optična pinceta, magnetna pinceta in mikroskop na atomsko silo (AFM). Širok nabor tehnik manipulacije je omogočil podrobno preučevanje različnih režimov raztezanja DNA ter interakcij med DNA in različnimi proteini.

Pri optični pinceti (slika 1a) sta en ali dva laserska žarka fokusirana na majhno površino, kar ustvarja optično past, ki privlači dielektrične delce, npr. polistirenske kroglice.



Slika 1: a) laserska pinceta, b) magnetna pinceta in c) mikroskop na atomsko silo

<sup>1</sup> Celica = prostor med mikroskopskim krovnim in objektivnim stekelcem

Molekula DNA je vpeta med v pasti ujeta kroglico in kroglico na mikropipeti. Ko molekulo s premikanjem mikropipete ali pa pasti raztegujemo, lahko merimo silo na kroglico v pasti. Tipčen obseg dosegljivih sil optične pincete je od 0.1 do 150 pN.

Pri merjenju z magnetno pinceto (slika 1b) je en konec molekule DNA pritrjen na magnetno kroglico, drugi konec pa na površino celice. S spreminjanjem velikosti gradienta magnetnega polja lahko spreminjamo silo na magnetno kroglico, kar nam omogoča meritev odvisnosti raztezka molekule v odvisnosti od sile. S to metodo je možna natančna meritev zelo majhnih sil (<1 pN).

V eksperimentih za AFM (slika 1c) so molekule DNA z enim koncem pritrjene na fiksno površino, z drugim koncem pa na iglo (cantilever) mikroskopa na atomsko silo. Ko površino odmikamo stran od igle, lahko preko odmika igle merimo silo, ki je potrebna za določen raztezek molekule DNA.

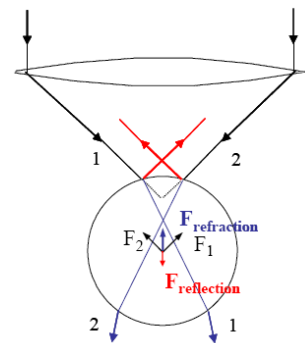
V seminarju bo najprej razložen princip delovanja optične pincete in določanje optične sile na koloid, ujet v optični pasti, nato pa bodo opisani glavni eksperimenti raztegovanja DNA, njihovi rezultati ter ujemanje s teoretičnimi modeli.

## Optična pinceta

Pri eksperimentih s posamezno molekulo je tehnika optičnega ujetja (optična pinceta) posebno priročna, saj omogoča manipulacijo mikronskih in submikronskih delcev na nedestruktiven način. Optična past deluje na principu prenosa gibalne količine fotonov iz laserskega žarka na ujet koloidni delec. Fotoni se na delcu odbijajo ali uklanjajo, kar na delec povzroča dve vrsti sil: sipalna sila je sorazmerna z intenziteto svetlobe in deluje v smeri širjenja žarka (svetlobni pritisk), gradientna sila pa je sorazmerna prostorskemu gradientu intenzitete svetlobe in pri delcih z lomnim količnikom, večjim od okoliške tekočine (dielektrični delci), deluje v smeri gradienta intenzitete.

Za doseg velikega gradienta intenzitete je potrebno uporabiti mikroskopski objektiv z veliko numerično aperturo. Tak objektiv laserski žarek z Gaussovimi profilom močno kolimira, tako da v gorišču objektivna nastane grlo žarka premera reda mikrometra. Rezultanta gradientne in sipalne sile na koloidni delec, ki se nahaja v bližini grla, vedno kaže proti največji intenziteti žarka – delec je ujet v optični pasti (Slika 2).

Namesto ene same optične pasti lahko uporabimo bolj zapletne svetlobne strukture, ki jih je moč ustvariti z interferenco laserskih žarkov ali s holografskimi metodami. Poljubne oblike pasti je možno ustvariti tudi s premikanjem gorišča enega samega laserskega žarka. Če se to premika hitro v primerjavi s tipičnimi relaksacijskimi oz. difuzijskimi časi koloidnega delca, delec to 'čuti' kot kvazi-stacionaren potencial. Take pasti se lahko ustvarijo s sistemom galvanostatičnih zrcal, kjer vpadni laserski žarek odbijajo nastavljiva zrcala, a je zaradi mehanskih lastnosti zrcal težko doseči usmerjanje žarka nad frekvenco 300 Hz. Višje hitrosti so dosegljive z uporabno akusto-optičnih deflektorjev (AOD), v katerih se vhodni laserski žarek ukloni na akustičnem valu znotraj prozornega kristala. Frekvenco akustičnega vala je možno spremeniti v nekaj mikrosekundah, zato se z AOD lahko laserski žarek usmerja in modulira s frekvenco do 100 kHz.



Slika 2: Shema sil na delec v optični pasti. Z rdečo je označena sipalna sila, z modro gradientna sila.

## Določanje lege kroglice

Pri meritvi mehanskih lastnosti DNA je potrebno hkrati izmeriti raztezek molekule in silo nanjo. Oba podatka lahko izračunamo iz lege kroglice v optični pasti. Najpreprostejši način določanja lege koloida je z videomikroskopijo. Digitalna kamera zajema mikroskopsko sliko s frekvenco od 20 pa do nekaj tisoč Hz (pri novejših kamerah), s programsko opremo za analizo slik pa se nato določa pozicijo. Natančnost je odvisna od velikosti in kontrastnosti koloida, povečave mikroskopa ter velikosti piksla na CCD čipu kamere, za mikronske delce pa je natančnost tipično od nekaj pa do 10 nm. Slabost videomikroskopije sta nizka frekvenca vzorčenja (vsako sliko je potrebno »obdelati«, za kar je potrebno nekaj časa) in relativno slaba resolucija. Vsekakor pa je kamera potrebna pri teh eksperimentih, saj je pred samo meritvijo potrebno poiskati in nastaviti prave kroglice na ustrezna mesta.

Boljši način določanja lege ujetih kroglic je kvadrantna detekcija. Pri tem načinu je na optični osi na zadnji goriščni ravnini mikroskopa nameščena kvadrantna fotodioda. Proti njej usmerjen šibek laserski žarek se sipa na ujetem koloidnem delcu, iz signala štirih polj fotodiode pa je z natančnostjo nanometra moč izračunati odmik od centra laserskega žarka. Vzorčenje s fotodiodo je mnogo hitrejše od videomikroskopije – tipična frekvenca je nekaj deset tisoč Hz.

## Umerjanje sile optične pasti

Kroglica v pasti se (vsaj za male odmike) nahaja v parabolčnem potencialu (slika 3) – sila  $F$  nanjo je sorazmerna z odklikom od središča pasti  $x$ ,  $F=kx$ , kjer je  $k$  trdota pasti. Za določanje sile je potrebno čim bolj natančno izmeriti odklik kroglice iz centra pasti, hkrati pa je potrebno poznati trdoto pasti. Za natančno merjenje trdote pasti se uporabljajo tri metode: umerjanje preko viskozne sile upora, iz spektra fluktuacij ujetega delca in preko ekviparticijskega teorema.

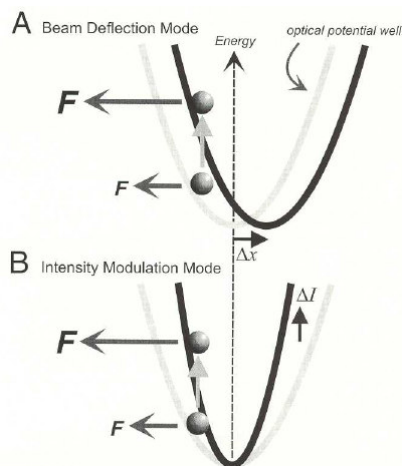
### Umerjanje z viskozno silo

Na premikajočo kroglico v tekočini deluje sila viskozne upora  $F_{vis}$ , ki je podana z enačbo

$$F_{vis} = \gamma v = 6\pi\eta r v$$

kjer je  $\gamma$  koeficient viskozne upora,  $r$  polmer kroglice s hitrostjo  $v$ ,  $\eta$  pa viskoznost okoliške tekočine. Ker sta viskoznost in polmer običajno poznana, se lahko z reguliranjem hitrosti toka okoliške tekočine spreminja viskozno silo na kroglico. Pri konstantni hitrosti toka (in torej konstantni viskozni sili, ki ujeto kroglico izmakne iz centra pasti) se izmeri povprečen odklik iz centra pasti in na ta način določi trdoto pasti.

Ista enačba za silo viskozne upora seveda velja, če okoliška tekočina miruje, premika pa se past z ujeto kroglico. Past lahko fizično premikamo z zunanjo optiko,



Slika 3: V pasti ujeta kroglica je v parabolčnem potencialu. Dva možna načina za konstantno optično silo na kroglico: A) z aktivnim premikanjem žarka se drži odklik kroglice od centra pasti konstanten, trdota pasti je konstantna, B) pri nepremični pasti se z modulacijo intenzitete in s tem trdote pasti drži kroglico na istem mestu.

če pa sistem ne omogoča premikanja pasti, se lahko premika kar cel vzorec. Za precizno premikanje se uporabljajo piezo moduli.

### Umerjanje iz spektra fluktuacij lege delca

Pogosto uporabljena tehnika za kalibracijo optične pasti je meritev Brownovega gibanja ujetega kroglice, na katero poleg sile pasti deluje tudi naključna sila termičnih fluktuacij. Za kroglico velja enačba gibanja

$$\gamma \frac{dx}{dt} + kx = F(t)$$

kjer je  $\gamma$  koeficient viskoznega upora,  $k$  pa trdota optične pasti.  $F(t)$  je naključna sila zaradi termičnih fluktuacij s povprečno velikostjo nič,

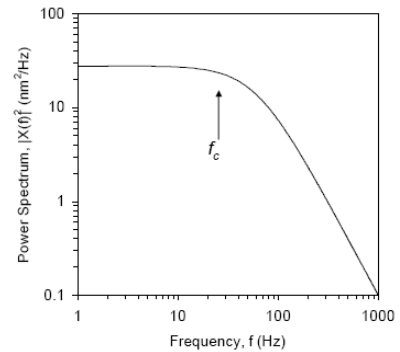
$$\langle F(f) \rangle^2 = 4\gamma k_B T$$

njena spektralna gostota moči pa je konstanta

Če naredimo Fourierovo transformacijo gibalno enačbo kroglice in vanjo vstavimo spekter  $F(f)$ , ter nadomestimo  $f_c = (k/2\pi\gamma)$ , dobimo frekvenčno odvisnosti spektra fluktuacij delca v pasti

$$|X(f)|^2 = \frac{k_B T}{\gamma(f_c + f)^2}$$

Spekter fluktuacij delca (slika 4) je približno konstanten pri nizkih frekvencah do  $f_c$ , kjer se naklon znatno spremeni. Če izmerimo fluktuacije ujetega delca v pasti in nato izračunamo spektralno gostoto moči fluktuacij, lahko iz frekvence  $f_c$  preloma spektra (pri poznanem koeficientu viskoznega upora) določimo trdoto pasti  $k$ .



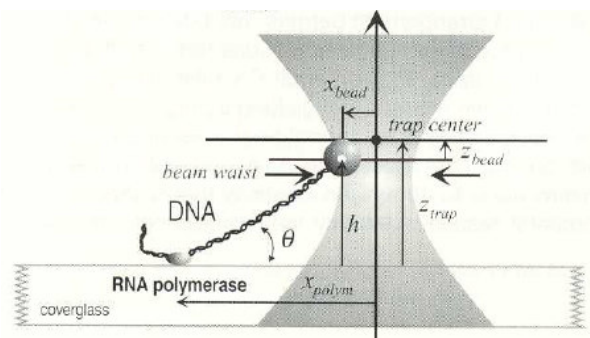
Slika 4: Idealni spekter fluktuacij delca v optični pasti.

### Umerjanje s pomočjo ekvipartijskega teorema

Trdota pasti nastopa v ekvipartijskem teoremu  $\frac{1}{2}k\langle x^2 \rangle = \frac{1}{2}k_B T$ , kjer je  $k_B$  Boltzmanova konstanta,  $T$  pa absolutna temperatura. Z meritvijo povprečnega kvadrata odmika  $\langle x^2 \rangle$  od centra pasti pri naključnem gibanju kroglice zaradi termičnih fluktuacij lahko neposredno dobimo trdoto pasti.

### Raztezanje DNA

Enega izmed prvih eksperimentov raztezanja DNA s pomočjo optične pincete so izvedli Wang et al. [1]. Merili so zvezo med silo in raztežkom za posamezno molekulo DNA v različnih purfih. En konec molekule DNA je bil preko ustavljenega kompleksa polimeraze RNA pripet na stekleno površino celice, na drugi konec molekule DNA pa so dodali biotin, da se je vezal na z avidinom prevlečeno polistirensko kroglico, ki so jo držali v optični pasti (slika 5). Raztezanje DNA so dosegli s premikanjem stekelca glede na mirujočo past, lego kroglice v pasti



Slika 5: Eksperimentalna geometrija eksperimenta Wang [1]. En konec molekule DNA je pritrjen na kroglico, uieto v optični pasti. Drugi konec pa pritrjen na kroglico, uieto v optični pasti.

pa so beležili z nanometrsko natančnostjo. Za držanje kroglice pri fiksnem odmiku od centra pasti so uporabljali elektronsko vezje s povratno zanko, ki je pri povečanju odmika kroglice povečala lasersko moč in s tem povečala trdoto pasti. S tako postavitvijo so lahko hitro merili relacijo med silo in raztezkom za posamezne molekule DNA od velikosti ~1 um, podvržene malim (~0.1 pN) in velikim (~50pN) bremenom. Izmerjenim odvisnostim sile od raztezka (slika Wang 6) so poskušali prilagoditi razne teoretične modele elastičnosti.

### Teorija elastičnosti DNA

V preprosti sliki lahko elastično trdoto fleksibilnih polimerov (med katere spada tudi molekula DNA) parametriziramo z njeno dolžino konturja, če ni napetosti,  $L_0$ , persistentno dolžino  $L_p$  in elastičnim modulom  $K_0$ . Persistentna dolžina je merilo za tendenco fleksibilnega polimera, da kaže v isto smer. Polimer se zdi na skali persistentne dolžine približno raven, na razdaljah večjih od persistentne, pa se zvija. V tem primeru je potrebno upoštevati entropične

prispevke k energiji. Razteg polimera zmanjša število možnih konfiguracij, ki jih polimer lahko zavzame, kar pomeni zmanjšanje entropije (in povečanje energije). Elastični modul pa meri intrinzični upor polimera proti vzdolžni napetosti (entalpični prispevek). Oba parametra sta v »črvom-podobnih« polimerih v splošnem povezana – večja kot je persistentna dolžina, večji je modul raztezka.

Obstajata dve glavni skupini teoretičnih modelov elastičnosti polimerov: prva skupina obravnava polimer kot »črvom-podobno-verigo<sup>2</sup>«, druga pa kot »prosto združeno verigo<sup>3</sup>«. Modeli elastičnosti vključujejo entropične in/ali entalpične prispevke, vsak pa deluje na omejenem območju v skladu s teoretičnimi predpostavkami.

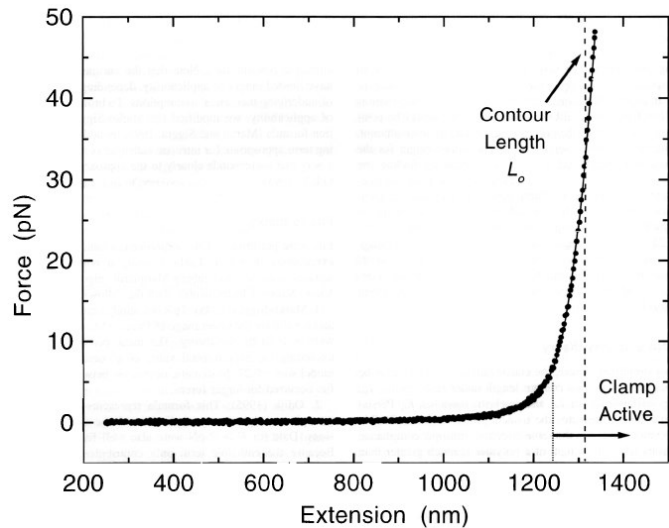
Čeprav mehanske lastnosti DNA močno varirajo glede na lokalno zaporedje in vijačno strukturo, DNA ponavadi modelirajo kot »črvom podobno verigo«. V tem modelu je polimer karakteriziran z enim samim parametrom, fleksijsko persistentno dolžino  $L_p$ , ki je za dvojno vijačnico DNA v fizioloških purfih okoli 50 nm. Polimer je predstavljen kot črta, ki se gladko zvija zaradi naključnih termičnih fluktuacij.

Med persistentno dolžino in elastičnim modulom velja preprosta zveza

$$k_B T = K_0 / L_p.$$

Po tej zvezi je energija za ukrivitev segmenta DNA dolžine  $L$  za kot  $\theta$  s krivinskim radijem  $R/L$  enaka

$$E(\theta) = (k_B T L_p / 2L) \theta^2 / 2L.$$



Slika 6: Izmerjena relacija med silo in raztezkom posamezne DNA molekule pri Wang [1]. Izmerjenim točkam je prilagojen modificiran model Marko-Siggia (neprekinjena črta).

<sup>2</sup> angl. »WLC - worm like chain«

<sup>3</sup> angl. »FJC - freely jointed chain«

Ta model torej napoveduje, da je energetsko bolj ugodno gladko zvijanje molekule, ki deformacijo razporedi na večje razdalje, kot pa ostro zvijanje na diskretnih mestih. Osnovnemu modelu WLC so različni avtorji dodali še druge člene za natančnejši opis relacije med raztežkom in silo.

Ekperimentalnim podatkom pri [1] se je najbolje prilagajal **modificiran model Marko-Siggia**, ki elastičnost molekule DNA opisuje kot »črvom-podobno-verigo« (WLC). V modelu sta vključena tako entropična elastičnost kot tudi entalpično raztezanje, povezavo med silo raztegovanja  $F$  in raztežkom DNA  $x$  opisuje enačba

$$F = \frac{k_B T}{L_p} \left[ \frac{1}{4(1 - x/L_0 + F/K_0)^2} - \frac{1}{4} + \frac{x}{L_0} - \frac{F}{K_0} \right]$$

kjer je  $L_p$  persistenčna dolžina,  $L_0$  dolžina konturja in  $K_0$  elastični modul.

S prilagajanjem modela podatkom so v pufru z 10mM raztopino  $\text{Na}^+$  dobili persistenčno dolžino DNA molekule  $L_p \sim 47\text{nm}$  in elastični modul raztezka  $K_0 \sim 1100\text{pN}$ . Modelska dolžina konturja molekule se je ujemala s teoretično dolžino, ki je bila izračunana kot zmnožek števila baznih parov v molekuli in razmaka 0.338 nm/par.

### Vpliv ionskega senčenja na trdoto DNA

DNA je negativno nabit polielektrolit. Njena relativno velika persistenčna dolžina ( $\sim 50$  nm) v primerjavi z malo razdaljo med baznimi pari (0.34 nm) je deloma posledica elektrostatskega odboja med negativno nabitimi fosfatnimi skupinami, iz katerih je sestavljeno ogrodje DNA. Torej bi morale elektrostatsko senčenje teh nabojev zmanjšati persistenčno dolžino molekule. Po polielektrolitski teoriji, bi morali pufri z zadostno koncentracijo mono-, di- in trivalentnih ionov nevtralizirati velik delež naboja vzdolž DNA. Dodatek visokovalenčnih ionov, ki so pri senčenju naboja najučinkovitejši, bi zmanjšal persistenčno dolžino na njeno intrinzično vrednost.

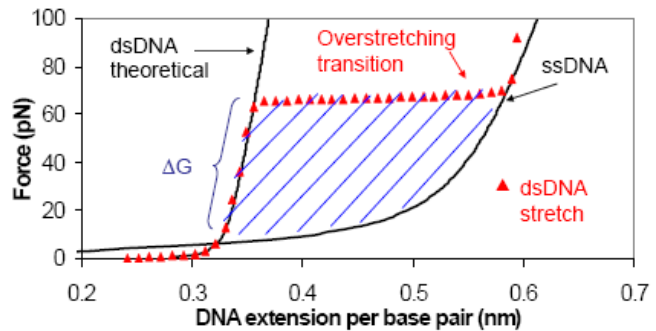
Ko so raztezke DNA merili v raztopinah kationov ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , spermidin $^{3+}$ ), se je izmerjena persistenčna dolžina res zmanjšala. Pri multivalentnih puffih ( $\text{Mg}^{2+}$  in spermidin $^{3+}$ ) je persistenčna dolžina padla na  $L_p \sim 39\text{nm}$ . Ko so koncentracijo spermidina še povečali (kar naj bi še dodatno zasenčilo negativni naboj na DNA), se persistenčna dolžina ni zmanjšala, iz česar je moč sklepati, da je intrinzična persistenčna dolžina DNA okoli 40 nm.

Teorija Podgornika et al. [2], ki opisuje odvisnost elastičnega modula raztezka in persistenčne dolžine molekule DNA od koncentracije soli v raztopini, se ujema z rezultati meritev.

### Raztezek DNA pri večjih silah

Meritve sil, potrebnih za raztezek posamezne DNA molekule, omogočajo študij različnih faz DNA in meritev termodinamskih količin povezanih s pretvorbo med različnimi strukturami nukleinskih kislin. Na primer, v procesu transkripcije RNA in podvojitve DNA, mora biti prebrano zaporedje baz v molekuli dsDNA za gradnjo komplementarne molekule RNA ali DNA. Pred branjem zaporedja baz, je potrebno verigi ločiti. Prehod iz dsDNA v ssDNA, pri katerem so prelomljene baze, ki tvorijo dvojno vijačnico, imenujemo »helix-coil« prehod. Ta prehod je možno preučevati z meritvijo sil, ki so potrebne za raztezanje molekule DNA. V eksperimentih tega tipa so posamezno molekulo  $\lambda$ -DNA pripeli med dve polistirenski kroglici in jo nato kontrolirano raztezali.

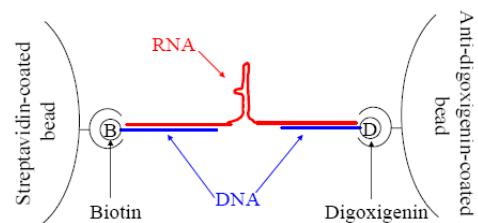
Ko je posamezna molekula DNA raztegnjena nad dolžino njene B-oblike (okoli 0.34nm), se sila, potrebna za nadaljnji raztezek, dramatično poveča. Če je enemu koncu molekule DNA dovoljeno prosto vrtenje, se pri sili okoli 65 pN zgodi kooperativen prehod v pretegnjeno obliko (**Error! Reference source not found.**), pri katerem je dovolj že majhna dodatna sila, da se molekulo raztegne do 1.7-kratnika njene dolžine. Za opis tega pretegnjenega stanja DNA je bil predlagan model nove oblike dsDNA, t.i. S-DNA [10]. Model je napovedal prehod pri višji sili, kot so jo izmerili v eksperimentih, zato sta Rouzina in Bloomfield [10] predlagala alternativni model za pretegotvanje DNA in sicer kot topljenje vezi<sup>4</sup> zaradi sile. V njunem modelu se bazni pari, ki držijo vijačnici DNA skupaj, zlomijo, ko se DNA med prehodom odvijje. Model je konsistenten z eksperimentalnimi rezultati, dobljenimi pri različnih temperaturah in ionskih jakostih.



Slika 7: Odvisnost med silo in raztekom za posamezne molekule dsDNA (rdeči trikotniki) in ssDNA (desna črna črta). Teoretična krivulja za dsDNA je prikazana z levo črno črto.

Pri silah, še večjih od sile pretega, so opazili še dodaten prehod zaradi ločitve obeh vijačnic<sup>5</sup>. Sila, potrebna za ločevanje vijačnic, je bila odvisna od hitrosti s katero so raztegovali dsDNA, sam prehod pa ne. V teoriji topljenja vezi je prehod v pretegnjeno stanje ravnovesni prehod, drugi prehod pri višji sili pa neravnovesno ločevanje obeh vijačnic, med katerim se zadnji bazni pari, ki držijo obe vijačnici skupaj, ireverzibilno zlomijo. Pri tem je prehodu je pričakovana od hitrosti odvisna sila. Če je model topljenja vezi zaradi sile pravilen, je površina med krivuljama raztezka ds- in ssDNA na sliki **Error! Reference source not found.** enaka prosti energiji prehoda »helix-coil« prehoda.

Bustamantejeva skupina [5] je leta 2001 v eksperimentu pokazala odvijanje/zavijanje malih molekulskih lasnic<sup>6</sup> RNA zaradi aplicirane sile. V meritvi so »odpirali zadrge« različnih molekul z vlečenjem kroglic, ki so bile na oba konca molekule pritrjene z DNA/RNA hibridnimi ročicami (Slika 8). Med odpiranjem dvojne vijačnice RNA z vlečenjem, so izmerili silo okoli 15 pN, kar je podobno kot pri odpiranju DNA.



Slika 8: "Odpiranje zadrge" RNA

Zanimivo je, da je sila, potrebna za ločitev baznih parov DNA ali RNA različna v primerih, ko se dvojno vijačnico vleče vzporedno z baznimi pari (»odpiranje zadrge«) in pri vlečenju pravokotno na bazne pare (pri raztegotvanju DNA). Energija je seveda

<sup>4</sup> angl. »force induced melting process«

<sup>5</sup> angl. »strand separation transition«

<sup>6</sup> angl. »hairpin«

enaka. V obeh primerih je razdalja med baznimi pari  $x=0.34$  nm. Ko je DNA pretegnjena, je končna razdalja med baznimi pari  $x=0.58$ nm (**Error! Reference source not found.**). Pri »odpiranju zadrge« DNA je končna separacija  $x=0.58$ nm za vsak bazni par. Torej je pri pretegovanju  $\Delta X_{\text{pretegovanje}} = 0.24$ nm, pri odpiranju pa  $\Delta X_{\text{odpiranje}} = 0.82$ nm. Če je energija »helix-coil« prehoda  $\Delta G$  obeh procesov enaka, bi moralo biti razmerje obeh sil

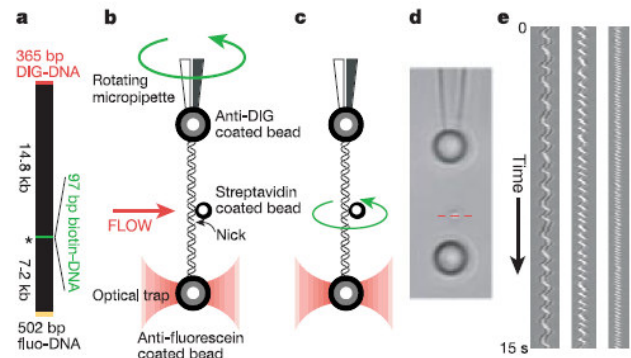
$$F_{\text{odpiranje}}/F_{\text{pretegovanje}} = (\Delta G/\Delta X_{\text{odpiranje}})/(\Delta G/\Delta X_{\text{pretegovanje}}) = \Delta X_{\text{pretegovanje}}/\Delta X_{\text{odpiranje}} = 0.3,$$

Iz **Error! Reference source not found.** lahko tako ocenimo pričakovano silo za »odpiranje zadrge« DNA na 20 pN, kar se ujema z izmerjenimi silami v eksperimentih. V njih so bile pri odvijanju lasnic sile pri vlečenju in sproščanju pri počasnem vlečenju enake, kar je znak za termodinamsko reverzibilnost.

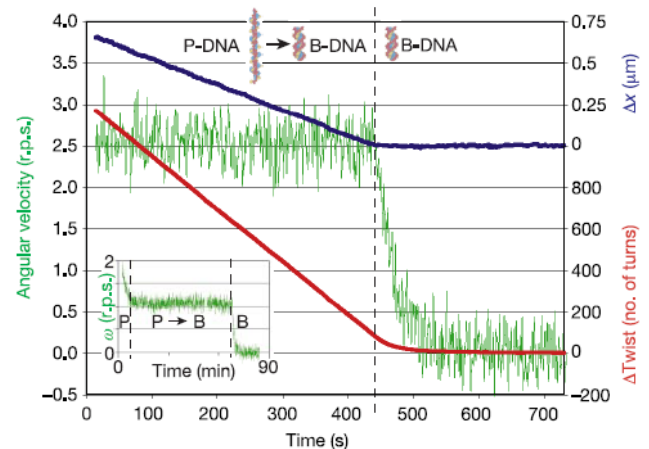
### Torzijsko zvijanje DNA

K popolnemu opisu mehanskih lastnosti DNA sodi tudi efekt navora na molekulo. Odvisnost navora od števila zasukov molekule je prva merila Bustamantejeva skupina [7]. S torzijsko napetostjo preveč in premalo navite DNA so vrteli submikrometrsko kroglico, ki je služila kot umerjeno breme.

Za ta poskus so najprej modificirali molekulo 22 kbp dolgo DNA – oba konca so modificirali (na enem kratek segment DIG-DNA, na drugem fluo-DNA), hkrati pa so v molekulo vstavili 97 bp dolg segment biotinilirane DNA (slika 9a). V koloidni raztopini so se na en konec molekule selektivno ujele kroglice, prevlečene z anti-DIG, na drug konec na anti-fluorescinsko kroglice, na vmesni del pa streptavidinske kroglice. Eno kroglico so ujeli v mikropipeto (s sposobnostjo rotiranja), kroglico na drugem koncu pa v optično past (slika 9b). Poskus so izvajali v tekoči celici<sup>7</sup>: če v celici ni bilo toka tekočine, se je molekula DNA pri rotiranju mikropipete lahko prosto vrtela; pri toku tekočine pa je na srednjo kroglico deloval navor, tako da DNA ni mogla



Slika 9: Eksperimentalna postavitve za meritve navora DNA



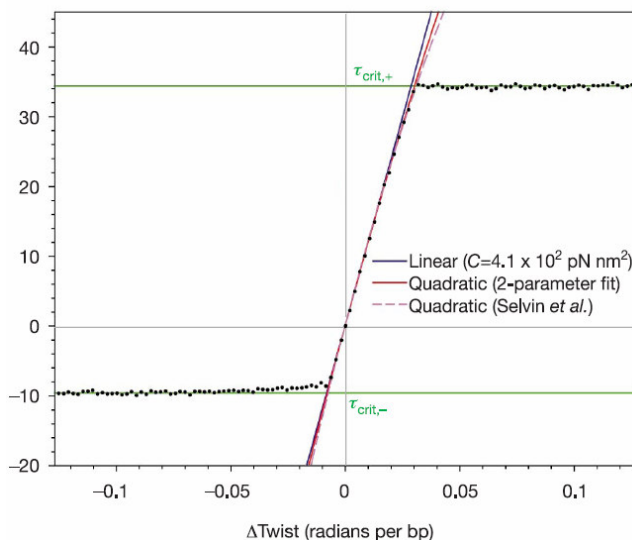
Slika 10: Primer analize rotacij pri eksperimentu [7], ko so sprostiti molekulo, navito za 1200 obratov. Graf prikazuje število obratov (rdeče), razteg molekule (modro) v odvisnosti od časa pri konstantni napetosti. Pri prenavljanju se del DNA spremeni v P-obliko. P-DNA se odvijanju spreminja nazaj v B-DNA.

<sup>7</sup> angl. »flowcell« - odprta celica; od zunaj je možno spreminjati tok tekočine skozi celico



slediti rotacijam mikropipete in so jo tako lahko navijali oziroma odvijali (slika 9c).

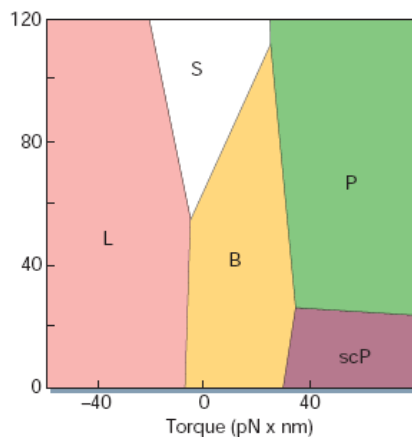
V močno prenaviti DNA, ki je napeta s silo  $>7\text{pN}$ , se del molekule spremeni iz klasične oblike B-DNA v razširjeno obliko z veliko vijačnostjo, imenovano P-DNA. S tem eksperimentom so potrdili, da je prehod iz B v P obliko visoko kooperativen prehod, saj se zgodi pri konstantnem navoru. Pri sprostitvi, tj. odvijanju prenavite molekule, se prehod iz P v B kaže z zmanjševanjem raztega. Ko se vsa molekula spremeni v B-DNA, ostaja razteg pri enaki napetosti konstanten, torzijska napetost pa se sprosti (slika 10). Za pretvorbo celotne 14.8 kilo baznih parov (kbp) dolgega segmenta DNA v P-DNA so jo morali naviti s 4000 obrati, kar kaže, da sta na vsak obrat vijačnice približno 2.7 bazna para. Iz sprememb v raztegu so zaključili, da je oblika P-DNA 50% daljša od B-DNA.



Slika 11: Navor v odvisnosti od zasuka DNA

V relaciji med navorom in zvijanem za DNA sta dve območji konstantnega navora, ki sta posledica strukturnih prehodov na  $+34\text{ pN nm}$  in  $-9,6\text{ pN nm}$ , in vmes skoraj linearno območje zvijanja B-DNA (slika 11). Pri navijanju je prehod na plato  $34\text{ pN nm}$  zelo oster zaradi velike kooperativnosti prehoda B-P. Prehod pri  $-9,6\text{ pN nm}$  je manj kooperativen zaradi formiranja denaturirane DNA. Ker ima DNA skupno levo-ročno zavrtost ( $13\text{ bp/obrat}$ ), so po koncu tega prehoda tako pod-navito stanje označili kot L-DNA.

Torzijsko elastičnost B-DNA pogosto obravnavajo kot elastičnost izotropne palice: navor narašča linearno z zasukom  $\tau = C/L(\theta - \theta_0)$ , kjer je  $L$  dolžina palice,  $\theta$  kot zasuka,  $\theta_0$  je zasuk v ravnovesju ( $35$  stopinj na bazni par),  $C$  pa torzijski modul. Torzijski modul v okolici ravnovesja so prej ugotavljali na različne načine, tipične vrednosti so bile od  $300\text{--}480\text{ pN nm}^2$ , v tem eksperimentu pa so iz prilagajanja izmerjenim podatkom navor-zasuk določili  $C=410\text{ pN nm}^2$ , iz termičnih fluktuacij koloidov različnih velikosti, ki so bili prilepljeni na vmesni del DNA, pa  $C=440\text{ pN nm}^2$ .



Slika 12: Fazni diagram sila-navor za DNA. DNA se lahko nahaja v 5 različnih strukturnih stanjih, ki se

ko so DNA raztegovali z večjimi silami, so pri približno  $65\text{ pN}$  opazili kooperativen prehod v S-DNA, obliko, ki je  $70\%$  daljša od B-DNA. Struktura S-DNA je še predmet debate, znano pa je, da je manj zavita od B-DNA. Pri pretegovanju molekule torej pride tudi do odvijanja – izkaže se, da je  $\Delta x/\Delta\theta = 3,7\text{ nm/obrat}$ , kar ustreza ponovitvi vijačnice na  $33$  baznih parov pri S-DNA. Pri relaksaciji molekule pod  $65\text{ pN}$  napetosti se molekula ponovno navije v B obliko.

Večje napetosti molekule povzročijo večje napore pri odvijanju –prehod med B in S tako označuje neke vrste Clausius-Clapeyronova koeksistenčna linija med silo in navorom. Skupaj z napetostno odvisnim kritičnim navorom pri prehodih P-B ter L-B, je skupina predlagala fazni diagram sila-navor za raztegnjeno in zavito DNA (slika 11).

## Zaključek

Seminar se sicer fokusira na manipulacijo posamezne molekule DNA z optično pinceto in rezultate eksperimentov s to tehniko, vendar pa so principi in tipi meritev DNA enaki za vse tri tehnike manipulacije. V dobrem desetletju raziskav so s temi tehnikami razkrili mehanske lastnosti DNA ter osnove interakcij med DNA in ostalimi molekulami, ki sodelujejo pri transkripciji, podvajanju in rekombinaciji. V naslednjem desetletju se bodo verjetno raziskave usmerile v še podrobnejšo analizo mehanskih interakcij v teh osnovnih celičnih procesih.

## Literatura

- [1] Wang, M.D., Yin, H., Landick, R., Gelles, J., and Block, S.M. Stretching DNA with optical tweezers. *Biophys. J.* **72**: 1335-1346 (1997)
- [2] Podgornik R, Hansen PL, Parsegian VA. Elastic moduli renormalization in self-interacting polyelectrolytes. *J. Chem. Phys.* **113**: 9343-9350 (2000)
- [3] Mark C. Williams and Iouliia Rouzina. Force Spectroscopy of Single DNA and RNA Molecules. *Current Opinion in Structural Biology* **12**: 330-336 (2002)
- [4] Cluzel P, Lebrun A, Heller C, Lavery R, Viovy JL, Chatenay D, Caron F. DNA: An extensible molecule. *Science* **271**:792-794 (1996)
- [5] Liphardt J, Onoa B, Smith SB, Tinoco I, Jr., Bustamante C. Reversible unfolding of single RNA molecules by mechanical force. *Science* **292**:733-737 (2001)
- [6] Rouzina I, Bloomfield VA.. Force-induced melting of the DNA double helix. 1. Thermodynamic analysis. *Biophys. J.* **80**(2):882-893 (2001).
- [7] Bryant, Z., Stone, M. D., Gore, J., Smith, S. B., Cozzarelli, N. R. and Bustamante, C.. Structural transitions and elasticity from torque measurements on DNA. *Nature* **424** (6946): 338-341 (2003)
- [8] Bockelmann, U., Thomen, Ph., Essevez-Roulet, B., Viasnoff, V., Heslot, F. Unzipping DNA with Optical Tweezers: High Sequence Sensitivity and Force Flips, *Biophys. J.* **82**: 1537-1553 (2002)
- [9] C. Bustamante, Z. Bryant, and S.B. Smith, Ten years of tension: single-molecule DNA mechanics, *Nature* **421**, 423-427 (2003)