

Wydział Fizyki, Astronomii  
i  
Informatyki Stosowanej  
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika



Janusz Strzelecki

Badanie właściwości mechanicznych  
pojedynczych molekuł DNA o  
strukturze superhelikalnej metodą  
spektroskopii siłowej AFM

*Praca doktorska napisana pod kierunkiem  
Prof. dra hab. Aleksandra Baltera*

Toruń 2011

*Dziękuję prof. Aleksandrowi Balterowi za opiekę nad moją pracą naukową, poświęcony czas i zaufanie.*

*Dziękuję prof. Piotrowi Marszałkowi za możliwość odbycia rocznego stażu w jego laboratorium, wprowadzenie w świat biofizyki pojedynczych molekuł i inspirację tematu pracy.*

*Mojej Żonie i mojej Mamie dziękuję za ich bezcenne wsparcie, motywowanie mnie do pracy i cierpliwość.*

# Spis treści

Lista symboli . . . . .	5
Wstęp . . . . .	7

## Podstawy teoretyczne

<b>1. Zarys budowy i właściwości fizyko-chemicznych DNA . . . . .</b>	<b>13</b>
1.1. Struktura DNA . . . . .	13
1.2. Topologia DNA . . . . .	15
1.3. Oddziaływania między molekułami DNA . . . . .	19
1.4. Właściwości mechaniczne DNA . . . . .	22
<b>2. Budowa i zasada działania mikroskopu sił atomowych . . . . .</b>	<b>27</b>
<b>3. Spektroskopia mechaniczna pojedynczych molekuł . . . . .</b>	<b>33</b>
3.1. Ogólny opis metody . . . . .	33
3.2. Spektroskopia mechaniczna AFM . . . . .	36
3.3. Pozostałe metody spektroskopii mechanicznej . . . . .	43
<b>4. Spektroskopia mechaniczna DNA . . . . .</b>	<b>46</b>
4.1. Rozciąganie DNA . . . . .	46
4.2. Superskręcanie DNA . . . . .	52
4.3. Tworzenie struktury superhelikalnej DNA . . . . .	54

## Konstrukcja aparatury, metody i wyniki pomiarowe

<b>5. Konstrukcja mikroskopu sił atomowych do pomiarów w trybie spektroskopii sił . . . . .</b>	<b>59</b>
5.1. Instrument zbudowany w Duke University . . . . .	59
5.2. Instrument zbudowany w Uniwersytecie Mikołaja Kopernika . . . . .	62
<b>6. Spektroskopia mechaniczna superhelikalnego DNA . . . . .</b>	<b>66</b>
6.1. Założenia i metody eksperymentu . . . . .	66
6.2. Wyniki . . . . .	70
6.3. Analiza danych . . . . .	80
6.4. Wnioski . . . . .	85
<b>Podsumowanie . . . . .</b>	<b>88</b>
<b>Summary . . . . .</b>	<b>89</b>

## Dodatki

Dodatek A Metody spektroskopii mechanicznej . . . . .	93
Dodatek B Schemat konstrukcyjny mikroskopu sił atomowych wyspecjalizowanego do pomiarów siłowych . . . . .	94
Dodatek C Schemat elektroniczny modułu arytmetycznego . . . . .	95
<b>Bibliografia</b> . . . . .	96

# Lista symboli

$\alpha$	kąt, pod którym rozciągany jest obiekt w AFM
$\beta_i$	kąt między odcinkami Kuhna
$\delta$	opór, który ciecz stawia sondzie siłowej
$\eta$	współczynnik lepkości cieczy, w której znajduje się sonda siłowa
$\gamma$	stała odkształcenia piezoelektrycznego
$\kappa$	moduł sprężystości rozciągania odcinka Kuhna
$\omega$	częstotliwość drgań termicznych sondy siłowej
$\Phi$	moduł sprężystości rozciągania polimeru na jednostkę jego długości
$\Pi_{osm}$	ciśnienie osmotyczne
$\sigma$	stopień superskręcenia
$\theta$	kąt pochylenia mikrobekki względem płaszczyzny próbki
$\vartheta$	kąt między składnikami superhelisy
$\vec{R}$	wektor odległości końców łańcucha polimerowego
$\vec{t}_i$	wektor kierunkowy odcinka Kuhna
$a$	promień kulki przybliżającej sondę siłową
$B$	moduł zginania polimeru traktowanego jako pręt
$b$	moduł ugięcia odcinka Kuhna
$d$	odległość międzyosiowa w kondensacie DNA
$d_V$	ugięcie mikrobekki AFM w jednostkach napięcia uzyskanego z fotodiody kwadrantowej
$d_y$	ugięcie mikrobekki AFM w jednostkach długości
$E$	energia konfiguracji polimeru
$F$	siła rozciągająca
$f$	siła oddziaływania między molekułami DNA na jednostkę ich długości
$F_C$	siła oporu stawianego przez superhelisę przy jej zaciskaniu w wyniku rozciągania
$F_R$	siła odpychania między składnikami superhelisy
$F_z$	siła mierzona przy rozciąganiu obiektu pod kątem $\alpha$
$H$	hamiltonian energii mikrobekki AFM
$h$	grubość piezoelektryka
$k$	stała sprężystości sondy siłowej
$k_B$	stała Boltzmanna

$L$	długość obiektu rozciągane
$l$	długość odcinka Kuhna
$L_C$	długość konturu polimeru
$l_p$	długość persystentna polimeru
$L_z$	mierzona długość obiektu rozciągane pod kątem $\alpha$
$Lk$	liczba opleceń (linking number)
$Lk_0$	naturalna liczba opleceń zrelaksowanego DNA
$N$	liczba odcinków Kuhna w polimerze
$n$	liczba par zasadowych
$p$	pęd ruchu mikrobilki AFM
$r$	promień grubości DNA
$S$	moc drgań termicznych sondy siłowej
$s$	droga po obwodni konturu polimeru
$SE$	czułość mikrobilki i układu detekcji jej ugięcia
$T$	temperatura
$t$	czas
$Tw$	liczba skrętoń (number of twists)
$Tw_0$	naturalna liczba skrętoń w zrelaksowanym DNA
$U$	napięcie
$Wr$	liczba zwojów (number of writhes)
$Wr_0$	naturalna liczba zwojów w zrelaksowanym DNA
$x$	wydłużenie polimeru pod wpływem siły
$y$	odkształcenie sondy siłowej
$Z$	suma statystyczna
$z$	długość piezoelektryka
AFM	mikroskop sił atomowych (atomic force microscope)
bp	para zasadowa (base pair)
eFJC	model polimeru statystycznie niezależnych elementów rozszerzony o sprężystość odcinków Kuhna (extended freely jointed chain).
eWLC	model sprężystości polimeru Marko - Siggii rozszerzony o sprężystość entalpiczną (extended worm like chain)
FJC	model polimeru statystycznie niezależnych elementów (freely jointed chain)
WLC	model sprężystości polimeru Marko - Siggii (worm like chain)

# Wstęp

Mimo, że odkrycie struktury DNA dokonane zostało już ponad pół wieku temu, to molekula ta wciąż stanowi fascynujący obiekt badań. Od pełnego zrozumienia mechanizmów jego funkcjonowania w kluczowych procesach biologii komórki uzależniony jest postęp w rozwoju nowych terapii genowych i w inżynierii genetycznej, jak również poznanie początków powstania życia. O ile jednak biochemia DNA została już znacznie rozwinięta, to jego właściwości mechaniczne, topologiczne i elektrodynamiczne badane są dopiero od niedawna. Ich poznanie jest jednak konieczne, aby w pełni zrozumieć organizację materiału genetycznego i mechanizm jego zapisu, kopiowania oraz translacji i transkrypcji do białek [1]. Poznanie to będzie tym pełniejsze, im badane struktury DNA będą bardziej podobne do występujących w żywych komórkach. Najprostszym sposobem organizacji materiału genetycznego w struktury wyższego rzędu, spotykanym głównie u bakterii, jest wprowadzenie dodatkowego skręcenia do podwójnej helisy. W efekcie dochodzi do wzajemnego oplecenia molekuly, podobnie jak ma to miejsce w skręconym sznurze słuchawki telefonicznej. Powstaje wówczas podwójna helisa wyższego rzędu, złożona z dwóch innych podwójnych helis DNA - superhelisa [2].

Już w wykładzie Richarda Feynmana "There is plenty of room at the bottom" [3], którego wygłoszenie uznawane jest za początek nanotechnologii, makromolekuly znajdujące się nawet w najprostszycy organizmach uznane zostały za przykłady maszyn o rozmiarach w zakresie nanometrów. Feynman argumentował, że biologia dostarcza dowodu na to, że inżynieria w nanoskali ma szanse powodzenia i tym samym powinna stanowić główne źródło inspiracji dla nanotechnologii. Kontrola organizacji budulca na poziomie molekularnym umożliwia organizmom uzyskanie materiałów o niezwykłych właściwościach. Prosty przykładem mogą być muszle mięczaków, które choć składają się głównie z kruchego węgla wapnia, to jednak dzięki niewielkiej domieszce białek i złożonej strukturze wewnętrznej stanowią skuteczną ochronę mechaniczną [4]. W bionanotechnologii coraz większą uwagę poświęca się DNA. O ile dla organizmów stanowi ono nośnik informacji, to w nanotechnologii rozważane jest jako materiał konstrukcyjny. Jego ogromną zaletą jako budulca jest fenomenalna wprost zdolność do złożonej samo-

organizacji. Praktyczne wykorzystanie DNA znacznie ułatwia powstała w procesie ewolucji ogromna liczba enzymów, stanowiących gotowy do wykorzystania zestaw narzędzi do jego obróbki. Mogą one ciąć (endonukleazy), sklejać (ligazy) lub skręcać (topoizomery) DNA, jak również kopiować jego odcinki o dowolnej niemal długości (polimeraza) [1]. Przy ich wykorzystaniu DNA może tworzyć różnorodne struktury, w tym również takie, które nie występują w naturze. Przykładem może być tzw. origami DNA [5], klatki i pudełka [6] a nawet nanomaszyny [7]. Aby jednak jakikolwiek materiał mógł być wykorzystany z powodzeniem w postaci budulca konieczne jest poznanie jego właściwości mechanicznych, zarówno w postaci najprostszej, jak i bardziej złożonych struktur.

Zbadanie właściwości mechanicznych DNA posiada zatem istotne znaczenie zarówno pod względem naukowym jak i praktycznym. Konieczna do tego celu jest jednak metoda umożliwiająca pomiar właściwości mechanicznych materiałów na poziomie molekularnym. Jeszcze do niedawna takie doświadczenie rozważane być mogło jedynie w charakterze eksperymentu myślowego. Jednak począwszy od lat '90 XX wieku pojawiać się zaczęły metody spektroskopii mechanicznej pojedynczych molekuł, czyli umożliwiające ich kontrolowaną deformację pod wpływem określonej siły [8, 9]. Metody te, wykorzystujące pułapki optyczne i magnetyczne oraz mikroskop sił atomowych (*atomic force microscope - AFM*) pozwoliły poprzez spektroskopię mechaniczną pojedynczych molekuł DNA na odkrycie m. in. wymuszonego mechanicznie przejścia OS do dłuższej o 70% formy, zachodzącego dla określonej siły oraz weryfikację modeli sprężystości polimerów [10]. Wykonane dotychczas badania w znacznej części skoncentrowane były jednak na DNA liniowym. Nieliczne eksperymenty przeprowadzone dla struktury superhelikalnej DNA wykonane były z wykorzystaniem pułapek magnetycznych [11, 12], metody umożliwiającej kontrolowane skręcanie dwóch molekuł i wytwarzanie struktury superhelikalnej. Metoda ta nie pozwala jednak na stosowanie sił większych niż 10 pN, uniemożliwiając obserwacje w zakresie zmian entalpicznych DNA [8].

Badania opisane w mojej pracy doktorskiej miały na celu przewyższenie tego ograniczenia. Zastosowano w tym celu inne podejście niż stosowane w dotychczasowych eksperymentach - zamiast wytwarzać strukturę superhelikalną poprzez mikromanipulację wykorzystano superskręcone zamknięte koliste plazmidy bakteryjne, w których występuje ona w sposób naturalny. Do rozciągania takich obiektów idealnie nadaje się mikroskop sił atomowych. Pozwala on na dokonywanie pomiarów z najwyższą siłą wśród wszystkich metod



spektroskopii mechanicznej pojedynczych molekuł [8]. Ponadto, poprzez zastosowanie niemodyfikowanego ostrza, z którym rozciągana molekula tworzy wiązania niespecyficzne, mikroskop sił atomowych pozwala na uchwycenie i rozciągnięcie nawet zamkniętego plazmidu. Wiązanie takie z powodzeniem wytrzymuje siły nawet 500 pN. Ograniczeniem takiego podejścia jest zupełna dowolność miejsca podczepienia plazmidu, przez co zamierzone rozciąganie struktury superhelikalnej zachodzi tylko w niektórych przypadkach. W celu ich wykrycia równolegle przeprowadzono eksperyment kontrolny na plazmidach zlinearyzowanych, w których struktura superhelikalna nie występuje. W próbkach plazmidu superskręconego zarejestrowano krzywe, w których przejście OS zachodzi dla znacznie wyższych sił (250 pN) niż można oczekiwać w przypadku zwykłego równoległego rozciągania dwóch molekuł. Krzywe takie nie były obserwowane w próbkach zlinearyzowanych ani też nie występują w literaturze opisującej doświadczenia na DNA liniowym. Wyznaczona z tych krzywych wartość długości persystentnej wykazuje bardzo dobrą zgodność z wartością uzyskaną dla struktury superhelikalnej za pomocą pułapek magnetycznych. Zakwalifikowane zostały zatem one jako pochodzące z rozciągania struktury superhelikalnej DNA. Wysłano hipotezę, że zwiększona sztywność i wyższa siła przejścia OS obserwowana w tych krzywych wynika z wzajemnego odpychania silnie naładowanych fragmentów DNA, zbliżanych do siebie podczas zaciskania rozciąganej superhelisy. Hipotezę tą potwierdziła bardzo dobra zgodność wartości tej dodatkowej siły (30 pN odpowiadające 0.07 pN/nm na jednostkę długości DNA) z wcześniejszymi badaniami nad wzajemnym oddziaływaniem molekuł DNA przeprowadzonymi dla próbek makroskopowych. Zastosowana metoda może zatem z powodzeniem zostać wykorzystana do badań właściwości mechanicznych struktury superhelikalnej na poziomie pojedynczych molekuł. Uzyskane wyniki sugerują też, że topologiczna organizacja DNA posiada, poprzez związek z jego właściwościami elektrodynamycznymi, wpływ na właściwości mechaniczne struktur wyższych rzędów. Rezultaty te prezentowano na konferencji "6th EBSA & British Biophysical Society Congress" jako referat ustny [13].

Aby przeprowadzić opisane powyżej badania, konieczne było skonstruowanie mikroskopu sił atomowych wyspecjalizowanego do pomiarów w trybie spektroskopii mechanicznej pojedynczych molekuł. Istnieje wprawdzie wiele firm oferujących instrumenty komercyjne, posiadają one jednak wiele ograniczeń, takich jak brak możliwości ogniskowania wiązki laserowej w układzie detekcji ugięcia mikrobilki i stosowanie skanerów o znacznej nieliniowości i dryfie, co może poważnie utrudnić pomiary w trybie spektroskopii mechanicz-

nej. Niebagatelne znaczenie ma również wysoka cena tych instrumentów. Ponieważ obecnie dostępne są na rynku skalibrowane skanery piezoelektryczne ze sterownikiem, niskoszumowe lasery i szybkie uniwersalne interfejsy pomiarowe, zbudowanie mikroskopu sił atomowych jest względnie proste i może kosztować ułamek ceny instrumentu komercyjnego.

Praca doktorska rozpoczyna się wstępem teoretycznym. Opisano w nim budowę, topologię, właściwości mechaniczne i elektrodynamiczne DNA w zarysie koniecznym do opisu i interpretacji uzyskanych wyników (Rozdział 1). W Rozdziale 2 przedstawiono budowę i zasadę działania mikroskopu sił atomowych, natomiast jego zastosowanie w spektroskopii mechanicznej pojedynczych molekuł przedstawiono w Rozdziale 3. Dokonano w nim także jego porównania z pozostałymi stosowanymi metodami i omówiono jego zalety i ograniczenia. Przedstawiono także stosowaną w naszych pomiarach termiczną metodę kalibracji mikrobelki oraz wskazano na możliwe źródła niepewności pomiarowych w spektroskopii mechanicznej AFM. W Rozdziale 4, zamykającym wstęp teoretyczny, dokonano przeglądu literaturowego w dziedzinie spektroskopii mechanicznej DNA. Największą uwagę poświęcono w nim pracom opisującym pomiary przeprowadzane w zakresie wysokich ( $>10$  pN) sił oraz rozpatrujących wpływ zmian topologii na mechanikę DNA.

Drugą część pracy doktorskiej poświęciłem opisowi konstrukcji aparatury, koncepcji doświadczenia i prezentacji uzyskanych wyników. Pomiary przeprowadzono za pomocą dwóch instrumentów. Pierwszy został zbudowany przeze mnie pod kierunkiem prof. Piotra Marszałka podczas rocznego stażu w Duke University w Durham (USA). Posiadał on konstrukcję mechaniczną wykonaną w Adaptive Systems and Structures Lab z Center for Biologically Inspired Materials (Duke University) i wykorzystywał głowicę komercyjnego mikroskopu sił atomowych. Drugi instrument wykonałem od podstaw w Zespole Biofizyki Doświadczalnej w Zakładzie Biofizyki i Fizyki Medycznej Instytutu Fizyki Uniwersytetu Mikołaja Kopernika. Ich konstrukcję i wykorzystanie w eksperymencie opisano w Rozdziale 5. Uzyskane za pomocą obu instrumentów wyniki jak również koncepcję samego eksperymentu i jego przygotowanie opisano w Rozdziale 6. Zaprezentowane zostały w nim typy krzywych, które nie zostały włączone do analizy, a także rozważono różne możliwości podczepienia plazmidu do ostrza mikrobelki i krzywe siłowe, które w efekcie powstają. Zestawiono także dane uzyskane z próbek plazmidowych i kontrolnych oraz porównano w celu wyłonienia tych, w których dochodzi do deformacji struktury superhelikalnej. Opisano także hipotezę, wyjaśniającą obecność dodatkowej siły przejścia OS, obserwowanej w wyłonionej grupie

krzywych jako efekt oddziaływań w zaciskającej się superhelisie i porównano z danymi literaturowymi pochodzącymi z pomiarów makroskopowych.

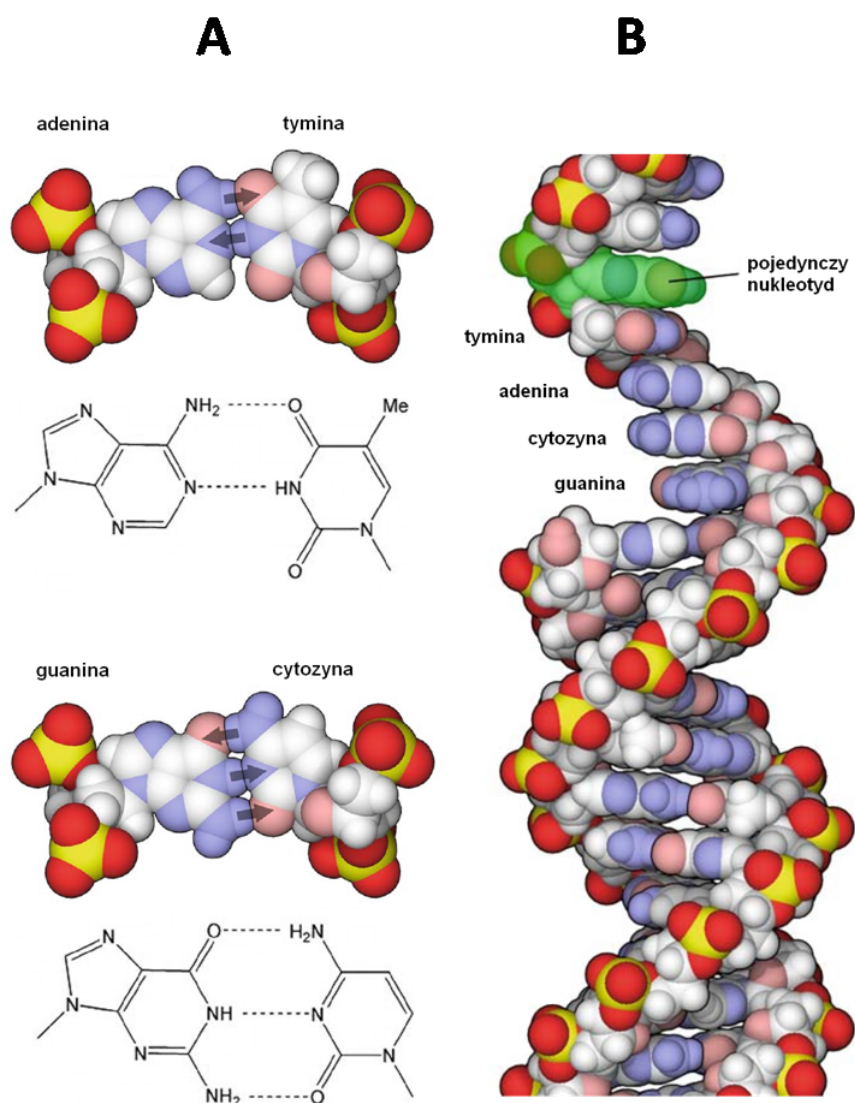
# Podstawy teoretyczne

# 1. Zarys budowy i właściwości fizyko-chemicznych DNA

## 1.1. Struktura DNA

DNA (kwas dezoksyrybonukleinowy) stanowi nośnik materiału genetycznego - w jego niciach zapisane są informacje opisujące jak powinny być zbudowane białka, główny budulec organizmu. W DNA możemy wyznaczyć dwa podstawowe elementy: zasady azotowe, których specyficzna sekwencja umożliwia zapis informacji i fosforanowo - cukrowy łańcuch, pełniący rolę rusztowania, do którego są one przymocowane (Rys 1.1). Utworzona w ten sposób nić DNA posiada określoną kierunkowość - na jednym końcu łańcucha fosforanowo - cukrowego jest grupa 5'-hydroksylowa, na drugim zaś 3'-fosforanowa. Wyróżniamy cztery zasady azotowe: adeninę (A), tyminę (T), guaninę (G) i cytozynę (C). Mogą one łączyć się między sobą tylko w komplementarne pary zasadowe (*base pairs* - bp): A-T i G-C. Zatem dwie jednoniciowe (*single stranded DNA* - ssDNA) cząsteczki DNA mogą utworzyć dwuniciowy dupleks DNA (*double stranded DNA* - dsDNA), jeśli posiadają komplementarną względem siebie sekwencję. Nici te są skierowane antyrównolegle, tak że na jednym końcu znajdują się grupy 5'3', zaś na drugim 3'5'. Powstaje zatem układ dwóch powiązanych ze sobą polimerów, nie ograniczony w żaden sposób co do swojej maksymalnej długości (najdłuższy znany genom posiada  $1.3 \times 10^{11}$  par zasad, czyli nieco ponad 44 metry). Wiązania między parami zasadowymi są wodorowe i tym samym posiadają niższą energię ( $1.6 - 7.2 \times 10^{-20} J = 16 - 72 pN \cdot nm = 4 - 18 k_B T$ ) od wiązań kowalencyjnych ( $4 - 8 \times 10^{-19} J = 400 - 800 pN \cdot nm = 100 - 200 k_B T$ ) w łańcuchu fosforanowo - cukrowym. Mimo, że pojedyncze wiązanie wodorowe może być łatwo zerwane w wyniku ruchów termicznych, to równoległe zastosowanie wielu takich wiązań pozwala na utworzenie stabilnego kompleksu dwóch nici. Jednocześnie jednak, jeśli wiązania te zrywane będą pojedynczo, jedno po drugim, to możliwa jest łatwa denaturacja dsDNA (czyli jego rozdzielenie na

dwie molekuly ssDNA) bez groźby przerwania łańcucha molekuly. Budowa taka umożliwia łatwe wykonanie kopii informacji zapisanej w sekwencji par zasadowych. Po denaturacji wystarczy do nici dobudować komplementarne nukleotydy (zasady azotowe połączone z monomerem fosforanowo - cukrowym) i połączyć je ze sobą. Uzyskuje się wówczas dwie molekuly dsDNA będące dokładną kopią tej, która została podzielona. Proces taki odbywa się w przypadku replikacji przy podziale komórki. Informacja o sekwencji białka może też zostać skopiowana do translacyjnego kwasu rybonukleinowego (tRNA) i zostać przeniesiona do miejsca jego syntezy (translacja) [14, 15].



Rysunek 1.1. Struktura cząsteczki DNA. Nukleotydy (A) po połączeniu formują nić DNA, która po połączeniu ze swoim komplementarnym odpowiednikiem formuje podwójną helisę (B). Zaadaptowane z [16]

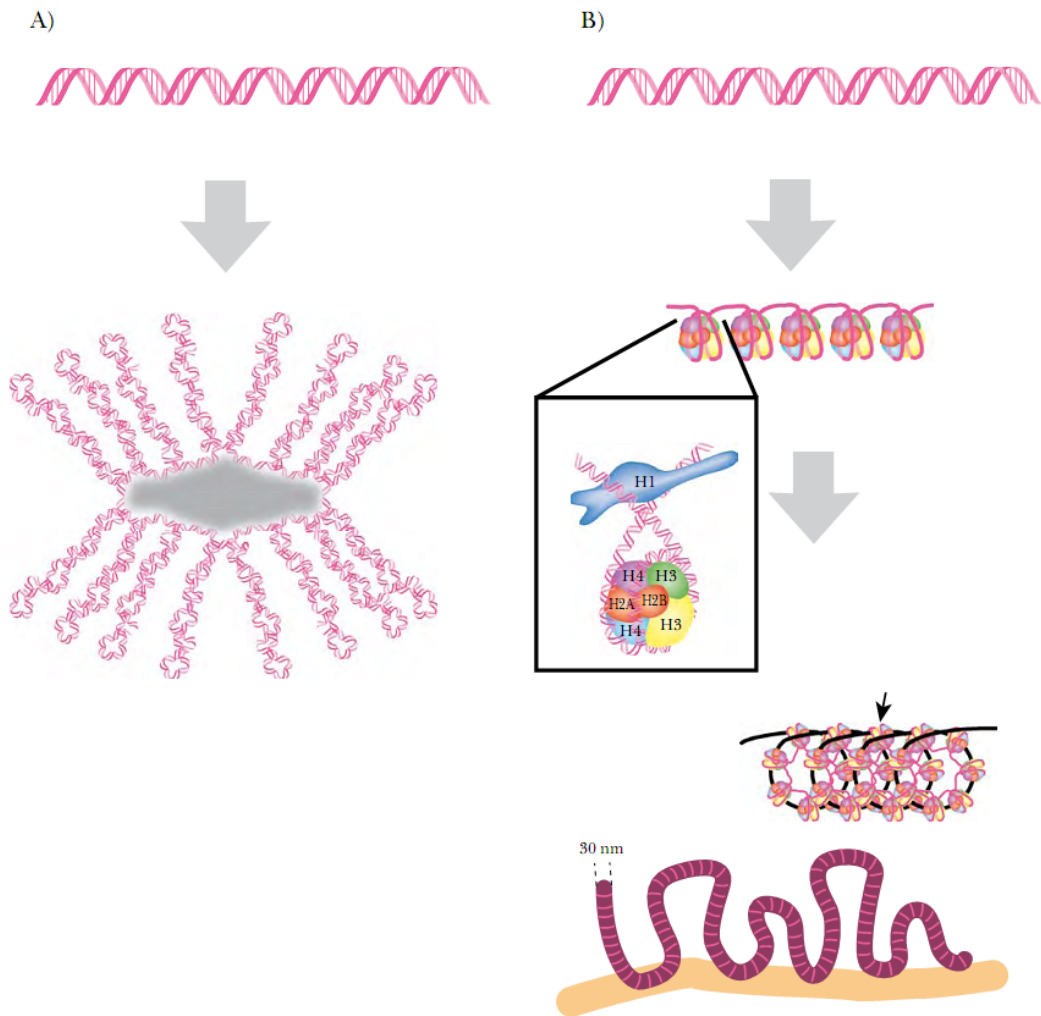
Zasady azotowe i łańcuch fosforanowo - cukrowy charakteryzują się różną rozpuszczalnością w wodzie. Pary zasadowe są hydrofobowe. Natomiast reszty fosforanowe ulegają dysocjacji i łańcuch fosforanowo - cukrowy staje się ujemnie naładowany i hydrofilowy. Dlatego też molekula DNA w wodzie skręca się, formując podwójną helisę [17] i osłaniając w ten sposób pary zasadowe przed wodą. Wymuszone jest to ponadto przyciąganiem par zasadowych w wyniku oddziaływań warstwowych. Formę podwójnej helisy w warunkach fizjologicznych stanowi głównie tzw. forma B-DNA - prawoskrętna, z charakterystyczną mniejszą i większą bruzdą, w której długość jednej pary zasadowej wynosi 0.34 nm, długość skoku helisy 10.4 bp i a grubość helisy 2 nm.

DNA w organizmach zazwyczaj nie stanowi liniowej, swobodnej molekuly. Aby materiał genetyczny, którego długość nawet w przypadku prostej bakterii *E. coli* sięga 1.5 mm, mógł zmieścić się w 1% objętości komórki o rozmiarach 2  $\mu\text{m}$  i by skrócić drogę, jaką mają do przebycia pracujące na nim enzymy, konieczne jest jego gęste upakowanie. Dokonuje się to poprzez zmianę topologii DNA wskutek jego zwijania wokół wyspecjalizowanych białek - histonów i skręcanie. Dochodzi wówczas do odkształcenia molekuł. Zbliżają się do siebie także ich fragmenty, rośnie więc też ich wzajemne oddziaływanie wynikające z ładunku łańcucha fosforanowo-cukrowego [18]. Zagadnienia te omówione są w kolejnych podrozdziałach.

## 1.2. Topologia DNA

Dwuniciowa forma DNA implikuje możliwość jego skręcania, co Watson i Crick zasugerowali w krótki czas po odkryciu jego struktury [19]. Jeśli tylko oba końce dupleksu są unieruchomione, to będzie on mógł ulegać skręceniu. Jednak w przypadku, gdy jedna z nici ulegnie przecięciu, to wprowadzone do dupleksu skręcenie ulegać może relaksacji poprzez rotację wiązań w łańcuchu fosforanowo-cukrowym. Ponadto, forma podwójnej helisy B-DNA zakłada obecność jednego skręcenia na każde 10.4 par zasadowych. Zatem proces replikacji, wymagający rozplecenia fragmentu DNA prowadzić musi do powstawania skręceń w pozostałym fragmencie DNA. Skręcenie takie będzie zgodne (dodatnie) z prawoskrętnym kierunkiem zwojów DNA, powodując jego zaciśkanie natomiast wymuszenie skręcenia o kierunku przeciwnym (ujemnego) prowadzić będzie do rozluźniania podwójnej helisy.

Z doświadczenia codziennego wiemy, że naprężenie powstałe w wyniku skręcenia sznura od słuchawki telefonicznej prowadzi do uformowania na nim

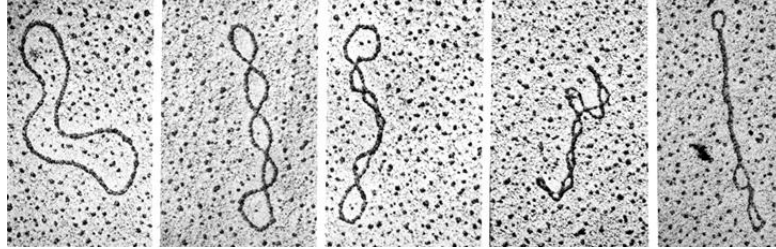


Rysunek 1.2. Organizacja materiału genetycznego u Prokariota (A) i Eukariota (B). Prokariota wykorzystują wielokrotne plektonemy i proste rusztowanie białkowe, podczas gdy Eukariota organizują swoje DNA w formie wielokrotnych soleloidów, stabilizowanych przez białka histonowe. Zaadaptowane z [20].

owijającej się wokół siebie pętli nazywanej plektonemem. Takie zjawisko w przypadku DNA odkryte zostało w wyniku prac nad genomem poliomawirusów, których materiał genetyczny okazał się być zamknięty w formie kolistej [21]. Badania z wykorzystaniem mikroskopii elektronowej i elektroforezy wykazały, że jego helisa posiada skręcenie większe niż odpowiadające formie B-DNA - jest superskręcony. W wyniku tego molekula wielokrotnie oplata się wokół siebie, formując podwójny plektonem. Zamknięta forma kolistą uniemożliwia jego relaksację, o ile nie dojdzie do przecięcia jednej z nici DNA. Mamy zatem do czynienia z utworzeniem helisy przez helisy, czyli strukturą superhelikalną [22]. Poza wirusami materiał genetyczny w formie kolistej i superhelikalnej występuje także u Prokariota (Rys. 1.2A). W szczególności, formę taką posiadają plazmidy, czyli krótkie fragmenty DNA pozachromo-



somalnego, które może być przekazywane między komórkami bakteryjnymi (Rys. 1.3). Plazmidy umożliwiają tym samym przenoszenie genów istotnych dla przetrwania bakterii, jak np. kodujących oporność na antybiotyki [15].



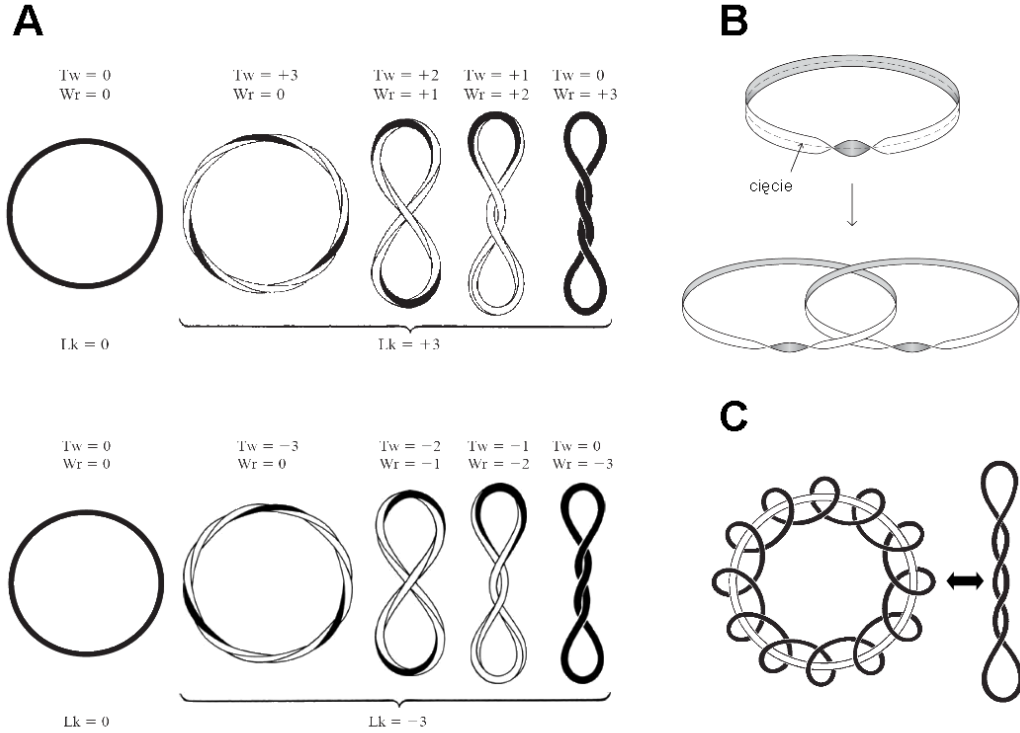
Rysunek 1.3. Kolisty plazmidy z różnym stopniem skręcenia. Zaadaptowane z [23]

Inną formą struktury superhelikalnej obok plektonemu jest solenoid, czyli spirala. Taką formę przybiera materiał genetyczny w organizmach eukariotycznych (Rys. 1.2B). Do utrzymania solenoidu, wiążącego się ze znacznym zgięciem DNA Eukariota muszą wykorzystać liczne białka histonowe, tworząc w efekcie strukturę zwaną chromatyną. Struktura superhelikalna pełni zatem istotną funkcję, umożliwiając upakowanie materiału genetycznego w niewielkiej objętości chromosomu bakteryjnego lub jądra komórkowego. Ponadto superskręcone i zamknięte DNA jest odporne na denaturację, przy czym jednocześnie jego ujemne skręcenie ułatwia lokalne rozplecenia wykonywane przez enzymy.

Ilościowo topologię superhelikalnego DNA opisuje twierdzenie Calugareanu - White'a - Fullera (Rys. 1.4) [24, 25]:

$$Wr + Tw = Lk \quad (1.1)$$

gdzie  $Wr$  to liczba zwojów (*number of writhes*), mówiąca ile razy cała cząsteczka przeplata się sama ze sobą poprzez plektonem albo solenoid (liczba skrzyżowań osi helisy),  $Tw$  jest liczbą skrętów (*number of twists*) którym poddana została cząsteczka (liczba skrzyżowań nici), natomiast  $Lk$  jest liczbą opleceń (*linking number*) jednej nici względem drugiej, które wytworzyłyby się gdyby doszło do denaturacji (całkowita liczba wszystkich skrzyżowań).  $Lk$  pozostaje stała jeśli topologia molekuly jest ograniczona przez uniemożliwienie rotacji jej końców. Przy stałej liczbie opleceń zmieniać się mogą jednak wartości liczb  $Lk$  i  $Tw$ . Liniowe DNA posiada naturalną liczbę skrętów  $Tw_0$  równą liczbie par zasadowych  $n$  podzielonej przez długość jednego skoku helisy, który dla B-DNA wynosi 10.4 bp :  $Tw_0 = n/10.4$ . Jego  $Wr_0 = 0$ , czyli  $Tw_0 = Lk_0$ . Dopiero wprowadzenie jednokrotnego skręcenia przeciwnego do kierunku zwojów ( $-1 Tw$ ) spowoduje powstanie jednokrotnego oplecenia ( $-1$



Rysunek 1.4. Graficzna prezentacja twierdzenia Calugareanu - White'a - Fullera za pomocą dwubarwnej wstęgi. Liczba opleceń  $Lk$  po wprowadzeniu skręcenia  $Wr$  pozostaje stała, natomiast samo skręcenie może być kompensowane przez tworzenie zwojów. W zależności od kierunku skręcenia wszystkie liczby przybierać będą wartości dodatnie (prawoskrętne) lub ujemne (leuoskrętne) (A). Liczbę opleceń  $Lk$  możemy zdefiniować jako liczbę połączeń, jakie powstaną na wstędze po jej skręceniu i wzdłużnym przecięciu (B). Ponieważ liczba zwojów  $Wr$  określa liczbę przepłotów wstęgi względem samej siebie, to solenoid, stanowiący szeregowe ustawienie pętli i plektonem, będący w istocie wielokrotną pętlą są równoważne względem siebie (C). Zaadaptowane z [18, 2]

$Wr$ ) lub, jeśli jest to niemożliwe, dojdzie do rozwinięcia podwójnej helisy [2, 25]. Superskręcenie możemy zdefiniować zatem jako przyrost lub ubytek  $Lk$  względem  $Lk_0$ :  $\Delta Lk = Lk - Lk_0 = Tw + Wr - Tw_0 = \Delta Tw + Wr$ . Stopień superskręcenia  $\sigma$  stanowić zatem będzie

$$\sigma = \frac{\Delta Lk}{Lk_0} = \frac{\Delta Tw + Wr}{Lk_0} \quad (1.2)$$

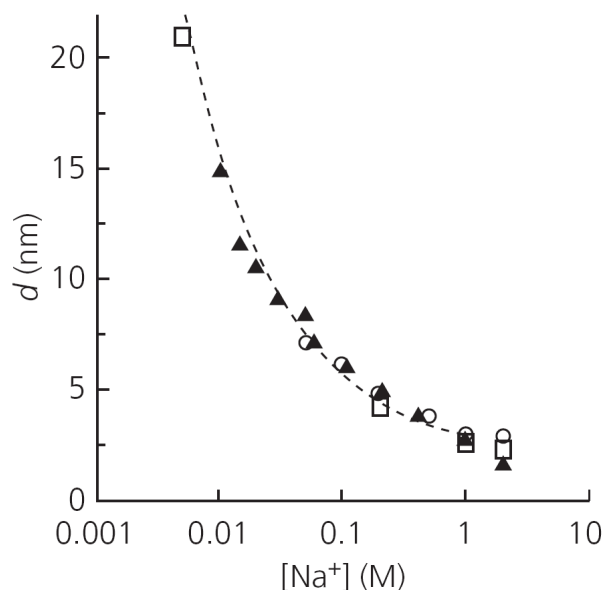
Typowa wartość  $\sigma$  dla ujemnie superskręconego plazmidu bakteryjnego wynosi  $\sigma \approx -0.06$ .

Topologia materiału genetycznego nie jest jednak stała, ponieważ podczas procesów transkrypcji, translacji i replikacji dochodzi do rozdzielania nici, co prowadzi tym samym do zmiany liczby skręceń  $Tw$ . Zmiana taka musi powodować zwiększenie liczby opleceń  $Wr$  i powstanie plektonemu. Kumu-

lacja takich plektonemów prowadziłaby nieuchronnie do splątania materiału genetycznego i śmierci komórki. W celu regulacji topologii DNA zarówno u Prokariota jak i Eukariota istnieje osobna grupa enzymów, nazywana topoizomerazami, odpowiedzialna wyłącznie za modyfikowanie topologii DNA. Enzymy te, poprzez nacinanie nici i kontrolowaną rotację wiązań w łańcuchu fosforanowo - cukrowym (topoizomerazy I,  $\pm 1Lk$ ) oraz przewlekanie przez obuniciowe cięcia pętli (topoizomerazy II,  $\pm 2Lk$ ) zwiększają lub zmniejszają skręcenie materiału genetycznego, korzystając z energii odkształcenia DNA lub ATP. Każde widełki replikacji, wprowadzające do materiału genetycznego dodatkowe skręcenie poprzez rozplatanie nici, poprzedzone są topoizomerazą II, która skręca ujemnie DNA, zapobiegając tym samym powstawaniu plektonemów [2].

### 1.3. Oddziaływania między molekułami DNA

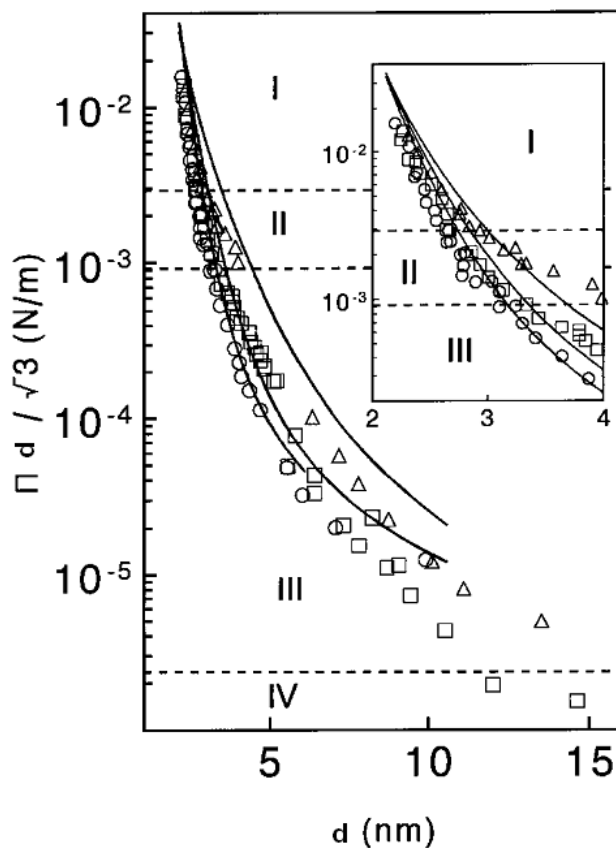
Ponieważ podwójna helisa B-DNA posiada średnicę 2 nm, to poprzez formowanie opisanych powyżej topologicznych struktur możliwa powinna być kondensacja materiału genetycznego w stopniu umożliwiającym zbliżenie sąsiadujących ze sobą fragmentów na taką samą odległość między osiami helis. Jednak dysocjacja fosforanów z łańcucha fosforanowo-cukrowego powoduje, że gęstość ładunku na powierzchni DNA w roztworze wodnym sięga  $1\bar{e}$  na każde 0.17 nm długości, co czyni z niego jeden z najsilniej naładowanych polimerów w naturze. W wyniku tego molekuly DNA będą się silnie odpychać, co stanowi znaczące ograniczenie w kondensacji DNA. Oddziaływanie to może być jednak modyfikowane przez znajdujące się w roztworze jony. W przypadku jonów monowalencyjnych, takich jak  $\text{Na}^+$ , dochodzi do ekranowania ładunku fosforanów, co osłabia wzajemne odpychanie nici lub dupleksów DNA. Sytuacja taka zachodzi w przypadku warunków fizjologicznych, gdzie obecność jonów umożliwia stabilność dupleksu i uformowanie stochastycznego kłęбка o średnicy kilku mikronów, jednak przy zbliżeniu na odległość 1 nm molekuly DNA nadal silnie się odpychają [26, 27, 28]. Dla naładowanych polimerów znajdujących się w roztworze można zdefiniować tzw. średnicę efektywną DNA (*DNA effective diameter*). Odpowiada ona międzyosiowej odległości, na którą mogą zbliżyć się molekuly i stanowi faktyczną średnicę polimeru w roztworze. Badania z wykorzystaniem różnych metod doświadczalnych (Rys. 1.5) i symulacje wykazały, że efektywna średnica DNA może, w zależności od stężenia jonów, być zbliżona do faktycznej średnicy lub też przewyższać ją nawet dziesięciokrotnie.



Rysunek 1.5. Zależność efektywnej średnicy DNA od stężenia molowego jonów  $\text{Na}^+$  wyznaczona za pomocą różnych metod. Krzywa uzyskana z rozważań teoretycznych [29], punkty doświadczalne z pomiarów z wykorzystaniem sedymentacji  $\square$  [30] oraz badań topologii węzłów w kolistym DNA ( $\circ$  [31] i  $\blacktriangle$  [32]). Zaadaptowane z [2].

Mimo wzajemnego odpychania Kulombowskiego, DNA jest silnie skondensowane zarówno w chromosomach, jak i w kapsydach wirusów. Obecność jonów multiwalencyjnych o ładunku równym lub większym niż  $3+$  (najczęściej spermidyna<sup>3+</sup>, spermina<sup>4+</sup> i  $\text{Co}(\text{NH}_3)_5^{3+}$ ) prowadzi do zaskakującego i sprzecznego z intuicją wytworzenia silnego przyciągania między dupleksami [33, 34]. W efekcie dochodzi do kolapsu i uformowania regularnej, toroidalnej struktury uporządkowanego DNA, w której odległości pomiędzy helisami nie przekraczają rozmiarów pojedynczej molekuly wody [35, 36]. Przyciąganie to pojawia się na skutek fluktuacji warstwy multiwalencyjnych jonów znajdujących się w otoczeniu polimeru, co umożliwia powstanie przyciągania nawet między jednakowo spolaryzowanymi i silnie naładowanymi makromolekułami [34].

Głównym narzędziem stosowanym do ilościowych badań oddziaływań między helisami DNA jest metoda ciśnienia osmotycznego (*osmotic stress*) [38]. W metodzie tej do roztworu zawierającego DNA wprowadza się dodatkowy neutralny polimer, np poli(tlenek etylenu) (PEG). Po ustaleniu stanu równowagi osmotycznej kapsułka DNA jest otoczona przez fazę polimeru, która wywiera na nią ciśnienie osmotyczne. Ciśnienie to można regulować przez stężenie polimeru, a dla danej jego wartości można wyznaczyć odległość między dupleksami DNA poprzez rozpraszanie promieniowania rentgenowskiego na



Rysunek 1.6. Krzywe zmian siły na jednostkę długości DNA względem międzyosiowej odległości dwóch dupleksów. Krzywe zmierzone dla różnych stężeń NaCl w roztworze:  $\triangle$  0.1M,  $\square$  0.5M,  $\circ$  1M. Zaadaptowane z [37].

ciekłym kryształ, który tworzą równoległe uporządkowane molekuly DNA. Pozwala uzyskać to krzywe zależności ciśnienia osmotycznego  $\Pi_{osm}$  od odległości międzyosiowej między helisami  $d$  [39, 40, 41].

Wykorzystując wartość ciśnienia osmotycznego  $\Pi$  dla danej odległości międzyosiowej  $d$  można wyznaczyć siłę na jednostkę długości DNA  $f(d)$  działającą między sąsiadującymi parami molekuł, oddalonymi o odległość międzyosiową  $d$  [39] i ustawionymi heksagonalnie:

$$f(d) = \frac{\Pi_{osm} d}{\sqrt{3}} \quad (1.3)$$

Krzywe  $\log(f(d))$  uzyskane dla różnych roztworów przedstawiono na Rys. 1.6.

Podczas wymuszania kondensacji zaobserwowano występowanie odpychania kulombowskiego, słabnącego wraz z rosnącym stężeniem jonów monowalencyjnych. Odpychanie to przy odległościach między osiami mniejszymi od ok. 3 nm przestaje jednak wykazywać zależność od obecności jonów, co sugeruje, że pojawia się wówczas dodatkowe oddziaływanie nie będące od-

działaniem kulombowskim. Jako hipotetyczne źródło tego oddziaływania wskazano nakładanie się i deformację powłok solwatacyjnych wokół duplesów i nazwano je oddziaływaniem hydracyjnym (*hydration repulsion*). W późniejszych pracach technika ciśnienia osmotycznego wykorzystana została również do wyznaczenia krzywych  $f(d)$  kondensacji DNA w obecności jonów multiwalencyjnych [42, 36].

## 1.4. Właściwości mechaniczne DNA

Właściwości mechaniczne DNA odgrywają znaczącą rolę w organizacji materiału genetycznego w komórkach i wirusach, jak również w kluczowych procesach takich jak replikacja, transkrypcja, rekombinacja i naprawa jego uszkodzeń [1]. DNA, tak jak każdy polimer znajdujący się w roztworze, tworzy w wyniku ruchów termicznych nieuporządkowany kłębek, który dodatkowo nieustannie zmienia swój kształt. Jeśli zatem polimer taki ulega rozciąganiu, to najpierw dojść musi do rozwinięcia kłębka. Ponieważ jednak oznaczać to będzie wzrost uporządkowania polimeru poprzez ograniczenie liczby jego możliwych konformacji, to procesowi temu będzie przeciwdziałać entropia. Dopiero po jego rozprostowaniu siła będzie mogła oddziaływać na wiązania wewnątrz polimeru, prowadząc do deformacji jego struktury wewnętrznej lub zrywania wiązań. Zatem mamy do czynienia z dwoma rodzajami sprężystości polimeru - sprężystością entropową dla małych wydłużeń oraz sprężystością entalpiczną, gdy zachodzi rozciąganie samego polimeru. Taką sprężystość, inną niż opisywaną prawem Hooke'a sprężystość metali, wykazują wszystkie materiały polimerowe.

Aby opisać sprężystość entropową polimeru konieczne jest stworzenie modelu kłębka polimeru na gruncie fizyki statystycznej. W modelu Kratky - Poroda [43, 44, 45, 46], polimer stanowi łańcuch  $N$  odcinków jednakowej długości  $l$ , nazywanych odcinkami Kuhna. Odcinki te szczipione są ze sobą złączami, które mogą się swobodnie zginać w każdym kierunku i pod każdym kątem. Konformacja takiego polimeru stanowić będzie błądzenie przypadkowe, gdzie każdy krok długości  $l$  ustawiony będzie w przypadkowym kierunku określonym przez jednostkowy wektor  $\vec{t}_i$ , skierowanym pod kątem  $\beta_i$  względem poprzedniego odcinka, niezależnym od kierunku kroków poprzedzających go i następujących po nim. Długość konturu, czyli całkowita długość polimeru wynosić będzie wielokrotność  $l$

$$L_C = N l \tag{1.4}$$

Energia danej konfiguracji łańcucha w tym modelu stanowi sumę energii ugięcia wszystkich segmentów, przy założeniu, że sztywność każdego odcinka Kuhna opisuje moduł sprężystości zginania  $b$ :

$$E_{KP} = -\frac{b}{l} \sum_{i=2}^N \vec{t}_i \cdot \vec{t}_{i-1} = -\frac{b}{l} \sum_{i=2}^N \cos \beta_i \quad (1.5)$$

Sztywność polimeru w modelu takim można ilościowo zdefiniować poprzez parametr długości persystentnej (*persistence length*). Ponieważ na skutek ruchów termicznych polimer będzie podlegał ugięciom, których wartość będzie zależna od jego sztywności, miarę sztywności stanowić będzie długość persystentna  $l_p$ , na jakiej polimer jest w stanie utrzymać dany kierunek:

$$\langle \vec{t}_i \cdot \vec{t}_j \rangle = \langle \cos \beta \rangle = \exp\left(-\frac{l|i-j|}{l_p}\right) \quad (1.6)$$

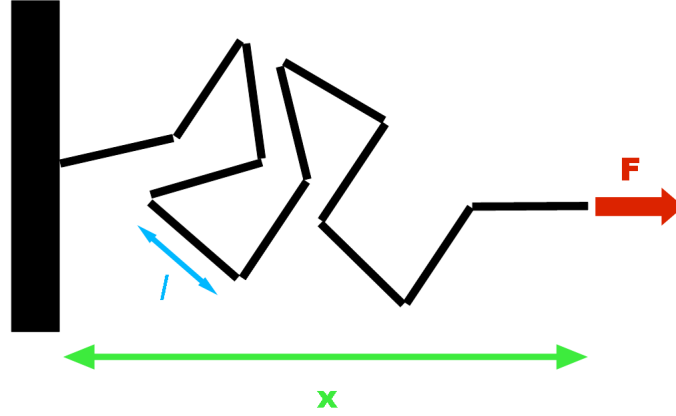
Dla  $l|i-j|$  mniejszego lub zbliżonego do  $l_p$  kąt  $\beta$  będzie miał małą wartość, a fragmenty łańcucha będą miały podobny kierunek. Jednak dla dłuższych fragmentów polimeru, przekraczających  $l_p$ , kąt  $\beta$  będzie mógł przybrać dowolną wartość. Odcinek taki będzie miał zatem końce skierowane w niezależnych od siebie kierunkach. Długość persystentną powiązać możemy z modułem zginania  $B$  całego polimeru, przyjmując, że energia ugięcia jednorodnej belki o długości  $l_p$  w łuk o 1 radian (czyli o promieniu  $l_p$ ) wynosi  $B y/2r^2$ . Przyjmując, że ugięcie zachodzi pod wpływem ruchów termicznych otrzymamy  $\frac{1}{2}k_B T = B/2l_p$ , czyli  $l_p = B/k_B T$  [47].

Rozmiar entropowego kłębka polimeru można opisać za pomocą wektora odległości końców łańcucha  $\vec{R}$ , który stanowi sumę wektorów  $l\vec{t}_i$ . Ponieważ jednak w wyniku ruchów termicznych jego wartość średnia  $\langle \vec{R} \rangle = 0$ , informację o rozmiarach kłębka uzyskać można jedynie z  $\langle \vec{R}^2 \rangle$ . Im większe będą odcinki Kuhna i im więcej ich będzie lub też im większa będzie długość konturu polimeru, tym większy rozmiar będzie miał utworzony przez niego kłębek statystyczny.

$$\langle \vec{R}^2 \rangle = \left( l \sum_{i=1}^N \vec{t}_i \right)^2 = 2Nl l_p = 2L_C l_p \quad (1.7)$$

Pod wpływem przyłożonej do polimeru siły rozciągającej  $\vec{F}$  dojdzie do jego deformacji i wykonania pracy  $-\vec{F} \cdot \vec{R}$ . Zatem  $E_{KP}$  będzie mieć postać

$$E_{KP} = -\frac{b}{l} \sum_{i=2}^N \vec{t}_i \cdot \vec{t}_{i-1} - \vec{F} l \sum_{i=1}^N \vec{t}_i \quad (1.8)$$



Rysunek 1.7. Model łańcucha statystycznie niezależnych elementów - *freely jointed chain (FJC)*

$$E_{KP} = -\frac{b}{l} \sum_{i=2}^N \cos \beta_i - F l \sum_{i=1}^N \cos \beta_i \quad (1.9)$$

Jednym z możliwych rozwiązań modelu Kratky-Poroda jest model łańcucha statystycznie niezależnych elementów (*freely jointed chain - FJC*), w którym  $b = 0$ , a zatem składającego się ze sztywnych odcinków, z ugięciami dopuszczalnymi jedynie na ich połączeniach (Rys. 1.7). Sztywność takiego polimeru uzależniona jest zatem wyłącznie od długości odcinka Kuhna, a  $l = 2l_p$ . Zatem

$$\langle \vec{R}^2 \rangle = Nl \quad (1.10)$$

a

$$E_{FJC} = -\vec{F}l \sum_{i=1}^N \vec{t}_i = -F l \sum_{i=1}^N \cos \beta_i \quad (1.11)$$

Suma statystyczna  $Z$  takiego układu będzie mieć postać:

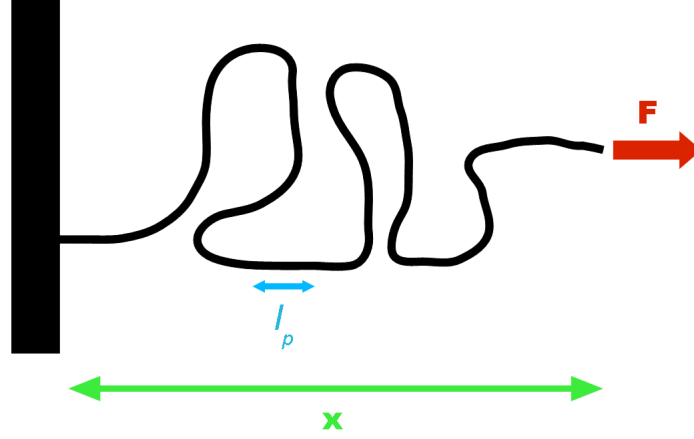
$$Z = \sum_{\vec{t}_i} e^{-\frac{E_{FJC}}{k_B T}} \quad (1.12)$$

Przeprowadzając całkowanie po liczbie mikrostanów polimeru [48] otrzymamy:

$$Z = \frac{2\pi k_B T}{F l} \sinh \frac{F l}{k_B T} \quad (1.13)$$

Wyznaczając energię swobodną takiego układu  $E = -k_B T \log Z$ , możemy otrzymać średnie wydłużenie  $\langle x \rangle = -\frac{\partial E}{\partial F}$ . Stąd





Rysunek 1.8. Model polimeru Marko-Siggii, w postaci izotropowego sznura - *worm like chain WLC*

$$x(F) = L_C \left[ \operatorname{ctgh} \left( \frac{Fl}{k_B T} \right) - \frac{k_B T}{Fl} \right] \quad (1.14)$$

W konfrontacji z doświadczeniami wykorzystującymi spektroskopię mechaniczną [49], które po raz pierwszy umożliwiły bezpośredni pomiar właściwości mechanicznych pojedynczej cząsteczki DNA model FJC okazał się zasadny tylko dla początkowej fazy rozplątywania entropowego kłęбка. Znacznie lepszego opisu dostarcza model Marko-Siggii [50, 51, 44] (*worm like chain* - WLC). W modelu tym polimer stanowi izotropowy, jednorodnie uginający się sznur (Rys. 1.8) o długości konturowej  $L_C$ , czyli w sytuacji, gdy w modelu Kratky-Poroda przyjmiemy  $l \rightarrow 0$ :

$$\frac{E_{WLC}}{k_B T} = \frac{l}{2} \int_0^{L_C} \left( \frac{d\vec{t}}{ds} \right)^2 ds - \frac{F}{k_B T} \int_0^{L_C} \cos \beta(s) ds \quad (1.15)$$

gdzie  $s$  stanowi drogę po obwiedni konturu polimeru. Obliczenie w tym modelu wydłużenia pod wpływem przyłożonej siły jest nietrywialne i w ostatecznej postaci podane zostało przez Marko i Siggie [51].

Średnia odległość między końcami polimeru w modelu WLC wynosi

$$\vec{R} = \int_0^{L_C} \vec{t}(s) ds \quad (1.16)$$

$$\langle \vec{R}^2 \rangle = \left\langle \int_0^{L_C} \vec{t}(s) ds \cdot \int_0^{L_C} \vec{t}(s') ds' \right\rangle = 2l_p L \left[ 1 - \frac{l_p}{L_C} \left( 1 - \exp\left(-\frac{l_p}{L_C}\right) \right) \right] \quad (1.17)$$

Rozwiązanie sumy statystycznej dla modelu WLC stanowi:

$$F(x) = \frac{k_B T}{l_p} \left[ \frac{1}{4} \left( 1 - \frac{x}{L_C} \right)^{-2} + \frac{x}{L_C} - \frac{1}{4} \right] \quad (1.18)$$

Kolejne doświadczenia wykazały bardzo dobrą przydatność tego modelu w zakresie sprężystości entropowej. Model FJC dobrze opisuje natomiast mechanikę ssDNA i polisacharydów, czyli polimerów w których wyróżnić można sztywne fragmenty na podobieństwo odcinków Kuhna. Rozszerzenia zakresu stosowania obu modeli dla zakresu gdzie rolę odgrywać zaczyna sprężystość entalpiczna dokonano wprowadzając moduł sprężystości rozciągania odcinka Kuhna  $\kappa$  lub moduł sprężystości rozciągania polimeru na jednostkę jego długości  $\Phi$  w modelu WLC:

$$x(F) = L_C \left[ \coth \left( \frac{F l}{k_B T} \right) - \frac{k_B T}{F l} \right] \left( 1 + \frac{F}{\kappa} \right) \quad (1.19)$$

$$F(x) = \frac{k_B T}{l_p} \left[ \frac{1}{4} \left( 1 - \frac{y}{L_C} + \frac{F}{\Phi} \right)^{-2} + \frac{x}{L} - \frac{1}{4} - \frac{F}{\Phi} \right] \quad (1.20)$$

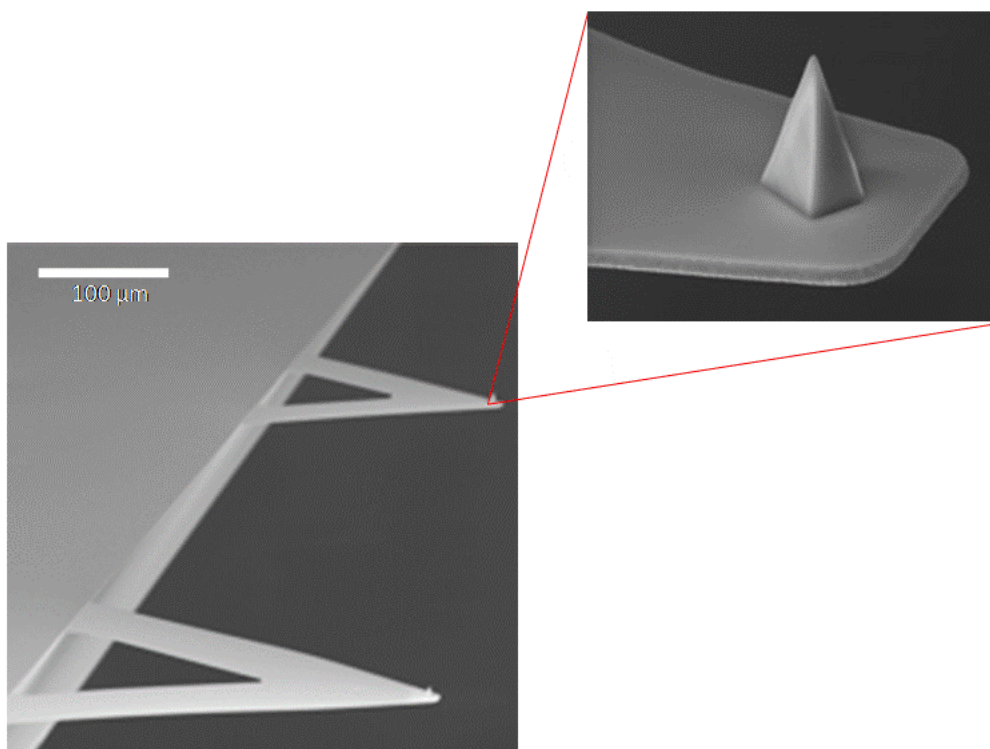
Rozszerzony model WLC (eWLC) można poddać znacznemu uproszczeniu [52, 53] przy dopasowaniach w zakresie dużych ( $>9\text{pN}$ ) sił, gdzie dominuje sprężystość entalpiczna:

$$x(F) = L_C \left[ 1 - \frac{1}{2} \sqrt{\frac{k_B T}{F l_p}} + \frac{F}{\Phi} \right] \quad (1.21)$$

Zarówno za pomocą pomiarów w makroskali (rozpraszanie światła [54], dichroizm przepływów [55], ligacja pojedyncza [56] oraz wymuszone polem elektrycznym zmiany dwójłomności [57] i dichroizmu [58]), jak i dla pojedynczych molekuł z wykorzystaniem spektroskopii mechanicznej (Rozdział 4) oraz mikroskopii sił atomowych [59] i krioelektronowej [60] oszacowano wartość długości persystentnej DNA na ok. 50 nm. Stosując proste analogie, można wyznaczyć moduł sprężystości molekuly DNA. Jeśli przyjmiemy, że DNA stanowi jednorodny pręt o promieniu  $r = 1\text{ nm}$  i module zginania  $B = 50\text{ nm} \cdot k_B T$ , to jego moduł Younga wyniesie  $4B/\pi r^4 = 300\text{ MPa}$ . Zbliżoną wartość modułu Younga posiada pleksiglas, DNA stanowi zatem bardzo sztywny polimer. Jest to jednak zrozumiałe, jeśli weźmiemy pod uwagę, jak duża gęstość ładunku występuje na jego powierzchni i jak silne w związku z tym jest odpychanie między fragmentami tego polimeru [47].

## 2. Budowa i zasada działania mikroskopu sił atomowych

Mikroskop sił atomowych (*Atomic Force Microscope* - AFM) został wynaleziony w 1986 roku [61], jako trzeci po mikroskopie tunelowym (*Scanning Tunelling Microscope* - STM) i mikroskopie bliskiego pola optycznego (*Scanning Near-Field Optical Microscope* - SNOM) mikroskop z sondą skanującą.

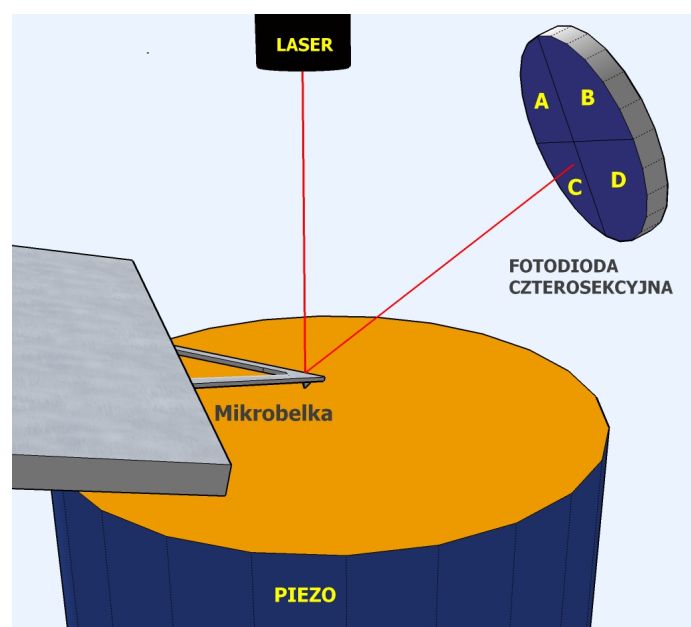


Rysunek 2.1. Mikrobeltka mikroskopu sił atomowych. Zaadaptowane z [62]

Zasadniczą częścią AFM jest sprężysta mikrobeltka (Rys. 2.1) o rozmiarze z zakresu 10-300  $\mu\text{m}$ , wykonana z krzemu lub azotku krzemu i zakończona ostrzem w formie piramidki z wierzchołkiem o promieniu ok. 20 nm. Może mieć różne rozmiary, kształty, oraz stałe sprężystości, w zależności od zastosowań, do których jest przeznaczona. Mikrobeltka jest przesuwana po powierzchni próbki za pomocą przetwornika piezoelektrycznego. Pod wpływem oddziaływań z nierównościami powierzchni mikrobeltka odgina się od położe-

nia równowagi, a poprzez skanowanie rastrowe i monitorowanie wartości tego odchylenia uzyskuje się obraz topografii próbki.

Można wyróżnić dwa podstawowe tryby obrazowania AFM - tryb statyczny i tryb dynamiczny. W przypadku bardzo płaskich próbek (np. obrazowanie sieci krystalicznej) skaner może utrzymywać stałą wysokość i wyłącznie ugięcie mikrobjelki dostarcza informacji o topografii próbki (tryb kontaktowy stałej wysokości). W większości przypadków wykorzystywana jest jednak pętla sprzężenia zwrotnego, która pozwala utrzymywać stały nacisk mikrobjelki na podłoże podczas skanowania, a informacji o topografii dostarcza ruch pionowy skanera, który wodzi po powierzchni próbki. W trybie dynamicznym mikrobjelka pobudzana jest do drgań przez dodatkowy przetwornik piezoelektryczny (lub, w niektórych wersjach, pole magnetyczne), a informacji o badanej powierzchni dostarczają zmiany amplitudy i fazy tych drgań zachodzące pod wpływem oddziaływań ostrza z próbką. AFM, w przeciwieństwie do mikroskopu elektronowego i tunelowego, może obrazować próbki nie przewodzące prądu, jak również pracować w środowisku ciekłym. Ponadto, w trybie dynamicznym, oddziaływanie ostrza z próbką może być bardzo ograniczone, co umożliwi obrazowanie nawet bardzo delikatnych próbek. Cechy te sprawiają, że instrument ten znakomicie nadaje się do obrazowania próbek biologicznych *in vitro*, w środowisku zbliżonym do żywego organizmu.



Rysunek 2.2. Schemat działania mikroskopu sił atomowych z optyczną detekcją ugięcia mikrobjelki

Główną metodą stosowaną obecnie do detekcji odchylenia mikrobjelki jest metoda optyczna (*optical lever detection method*) [63, 64, 65], zbliżona za-

sadą działania do wagi skręceń Cavendisha (Rys. 2.2). Kraniec mikrobjelki pokryty odblaskową warstwą złota jest oświetlany zogniskowaną wiązką laserową. Wiązka ta po odbiciu kierowana jest do detektora położenia, mającego zwykle postać fotodiody czterosekcyjnej. Prądy z poszczególnych kwadrantów, po przetworzeniu na sygnały napięciowe poddane zostają prostej arytmetyce:  $\frac{(U_A+U_B)-(U_C+U_D)}{U_A+U_B+U_C+U_D}$ . Uzyskany sygnał z zakresu -10V...10V wyraża pionową zmianę położenia plamki lasera na powierzchni fotodiody niezależnie od wahań jasności lasera.

Stosowanie tej metody związane jest jednak z pewnymi ograniczeniami. Liniowa zależność między sygnałem napięciowym, a odkształceniem mikrobjelki nie jest spełniona dla dużego jej ugięcia. Nieliniowość pojawia się jednak dopiero przy wychyleniach odpowiadających siłom rzędu 10 nN. Ponadto w układach tych spotkać się możemy z problemem interferencji. Próbkę o błyszczącej powierzchni, takie jak napyłone metale mogą odbijać promień lasera. W sytuacji, gdy laser ustawiony jest prostopadle do powierzchni próbki doświadczyć może zatem do interferencji promienia odbitego z promieniem padającym. Środkiem zaradczym jest stosowanie laserów niskospójnych lub jasnych diod luminescencyjnych. Korzystne jest również odchylenie promienia pod niewielkim kątem względem normalnej do powierzchni próbki, ponieważ wówczas skróceniu ulegnie obszar w którym doświadczyć może do interferencji wiązek. Sytuację poprawia także ogniskowanie lasera, tak by jak najmniej światła wydostawało się poza krawędź mikrobjelki.

Intuicja podpowiada, by podobnie jak w przypadku wagi skręceń odbity promień przebył jak najdłuższą drogę, zwiększając tym samym czułość instrumentu. Pamiętać jednak należy, że światło lasera musi zostać zogniskowane na niewielkim krańcu mikrobjelki do plamki o rozmiarach kilkudziesięciu, a nawet kilku mikrometrów. W efekcie odbita wiązka jest rozbieżna i przesadne zwiększenie jej długości może spowodować, że plamka zajmie całą powierzchnię fotodiody czterosekcyjnej, zmniejszając tym samym, zamiast zwiększając, czułość. Ponadto fluktuacje powietrza, które są tym bardziej zauważalne, im dłuższa jest droga optyczna, zwiększają szum instrumentu.

Wśród metod detekcji ugięcia mikrobjelki AFM, takich jak interferometria [66], czujniki piezorezystywne [67] i pojemnościowe [68], metoda optyczna charakteryzuje się prostotą oraz bardzo dobrą czułością i z powodów tych jest najczęściej stosowana.

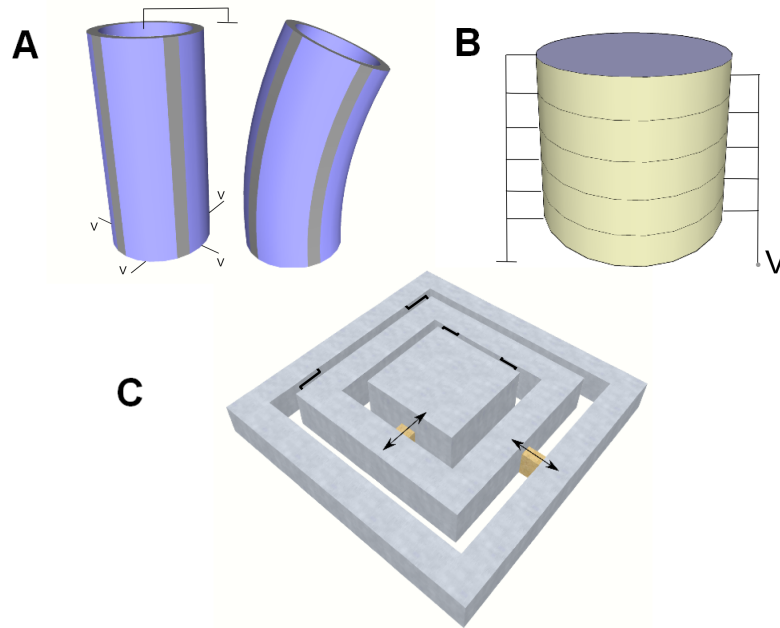
Drugim kluczowym elementem konstrukcji każdego AFM jest przetwornik piezoelektryczny, który pozwala na przesuwanie mikrobjelki względem próbki. Poprzez wykorzystanie odwrotnego zjawiska piezoelektrycznego umożliwia on

wykonywanie kontrolowanych przesunięć rzędu ułamków nanometra. Materiał piezoelektryczny o stałej odkształcenia piezoelektrycznego  $\gamma$ , długości  $z$  i grubości  $h$  pod wpływem przyłożonego napięcia  $U$  wydłuży się o  $\Delta z$ :

$$\frac{\Delta z}{z} = \gamma \frac{U}{h} \quad (2.1)$$

Ta liniowa zależność spełniona jest jednak jedynie dla niewielkich wydłużeń. Nieliniowość, wynikającą z histerezy piezoelektryka można ograniczyć poprzez połączenie przetwornika ze skalibrowanym sensorem wydłużenia i umieszczając układ w pętli sprzężenia zwrotnego (*closed loop*), która koryguje przyłożone napięcie i umożliwia utrzymanie przez przetwornik zadanego wydłużenia. Ceną za tak uzyskaną linearyzację jest jednak zwiększony szum, wprowadzany przez kontroler sprzężenia zwrotnego. Przy obrazowaniu małych obszarów, gdzie przesunięcia i tym samym nieliniowości przetworników piezoelektrycznych są niewielkie, a szумы mogą znacznie obniżyć jakość uzyskanych obrazów skanowanie dokonywane jest w otwartej pętli sprzężenia zwrotnego (*open loop*).

Przetworniki piezoelektryczne stosowane w mikroskopii sond skanujących mają różne formy. Klasyczny skaner ma postać ceramicznej rury o metalizowanych powierzchniach, przy czym warstwa pokrywająca powierzchnię zewnętrzną podzielona jest na cztery części (Rys. 2.3 A). Jeśli do wszystkich czterech sekcji zewnętrznej elektrody przyłożone zostanie identyczne napięcie, to wówczas dojdzie do wydłużenia całego skanera. Natomiast, jeśli napięcie przyłożone do jednej sekcji będzie mniejsze, to wówczas dojdzie do zgięcia przetwornika w kierunku tej sekcji. Wadą tego rodzaju przetworników jest duża nieliniowość ich wydłużenia i ruch przesuwanej próbki po powierzchni sfery prowadzący do zniekształceń w uzyskanym obrazie AFM. Coraz częściej w mikroskopach skanujących wykorzystuje się przetworniki w postaci piezostosu, gdzie elementy piezoelektryczne ułożone są równolegle (Rys. 2.3.B). Przetworniki takie wprawdzie wykonują ruch tylko w jednej osi, jednak po umieszczeniu w oprawie sprężynującej (*flexure stage*) (Rys. 2.3 C) możliwe jest wykonywanie ruchu skanującego. Dzięki temu możliwe jest skanowanie nawet dużych powierzchni bez znaczących odchyłeń od płaszczyzny ruchu i jego całkowite rozdzielenie z ruchem pionowym, wykonywanym przez trzeci piezostos. Ten rodzaj przetworników posiada ponadto, w porównaniu z przetwornikami rurowymi, lepszą charakterystykę dynamiczną, jak również mniejszą nieliniowość.



Rysunek 2.3. Elementy piezoelektryczne stosowane w mikroskopii sił atomowych. Skaner rurkowy (A), piezostos (B) i piezostos zamontowany w oprawie sprężynującej (C).

Dodatkowy przetwornik piezoelektryczny o bardzo niewielkich rozmiarach służy w dynamicznym trybie obrazowania do wzbudzania drgań mikrobilki. Kontroler skanera znajduje się w zamkniętej pętli sprzężenia zwrotnego z systemem detekcji wychylenia mikrobilki, przez co możliwe jest utrzymywanie stałego oddziaływania z próbką w czasie skanowania.

Ponieważ w mikroskopii AFM dochodzi do pomiaru niezwykle małych sił, pomiary mogą zostać łatwo zaburzone przez drgania i hałas. Aby zminimalizować ich wpływ stosuje się izolację antywibracyjną i akustyczną oraz projektuje się konstrukcję nośną mikroskopu tak, by jej drgania w jak najmniejszym stopniu zaburzały ruch mikrobilki. W konstrukcji mikroskopu definiuje się tzw. pętlę mechaniczną, zawierającą przetwornik piezoelektryczny oraz konstrukcję nośną mikroskopu i łączącą mikrobilkę z podłożem [69]. Aby przesunąć częstotliwość rezonansową drgań własnych takiej pętli ku wysokim wartościom, co uniemożliwi jej wzbudzenie przez drgania gruntu, pętla taka powinna być jak najszywniejsza i najlżejsza. Podobne zalety ma stosowanie jak najmniejszych mikrobelek, jednak nie zawsze mogą być one wykorzystane z racji ograniczeń w ogniskowaniu plamki lasera w głowicach instrumentów komercyjnych. Ponadto materiał, z którego wykonany jest AFM powinien mieć małą rozszerzalność cieplną. W celu izolacji od drgań stosuje się układy dużej masy na elastycznym zawieszeniu lub poduszce powietrznej, tworzące oscylator o częstotliwości własnej rzędu kilku Hz, na którym umieszczony zostaje

instrument. Dodatkowo, w celu ochrony przed drganiami wysokich częstotliwości stosuje się podkładki z gumy i silikonu.

W odróżnieniu od innych metod obrazowania, mikroskopia sond skanujących umożliwia nie tylko obrazowanie próbek, ale również manipulację nimi. Największe możliwości posiada AFM, umożliwiając skrawanie powierzchni (nanolitografia) lub przesuwanie znajdujących się na niej obiektów [70]. Mikrobilki AFM, jako sprężyny płaskie mogą być wykorzystane w charakterze dynamometrów, umożliwiając tym samym nie tylko odkształcenie mikro i nanoobektów, ale również jednoczesny pomiar siły, z jaką to odkształcenie zostało wykonane. Ten tryb pomiarowy, znany jako spektroskopia mechaniczna AFM (*AFM force spectroscopy*) szczegółowo omówiony jest w następnym rozdziale.



## 3. Spektroskopia mechaniczna pojedynczych molekuł

### 3.1. Ogólny opis metody

W latach 90 XX wieku pojawiły się pierwsze metody, umożliwiające manipulację mikro i nanoobjektami, połączoną z jednoczesnym pomiarem siły [8]. W klasycznych metodach makroskopowych badań polimerów obserwować można tylko zmiany zachodzące w populacji bardzo wielu molekuł, które dodatkowo niejednokrotnie są wzajemnie powiązane i formują sieć. Tym samym nie wszystkie zjawiska mogą zostać zaobserwowane, ponieważ w próbce dochodzi do uśredniania milionów zdarzeń. Dopiero zastosowanie małych sond siłowych pozwoliło na test tych teorii dla pojedynczych cząsteczek. Metody opisane w tym rozdziale, mimo stosowania sond o rozmiarach mikrometrów, posiadają czułość wystarczającą do obserwacji subtelnych efektów mechanicznych w pojedynczych makromolekułach. Do głównych metod, dostępnych komercyjnie należą pułapki optyczne i magnetyczne oraz mikrobilki AFM. Rzadziej stosowane są manipulacje z wykorzystaniem mikroigieł oraz biomembran. Ze względu na tematykę pracy, najwięcej uwagi poświęcimy mikrobilkom AFM, pozostałe metody opisane będą jedynie skrótowo, w celu pełniejszego zrozumienia Rozdziału.4.

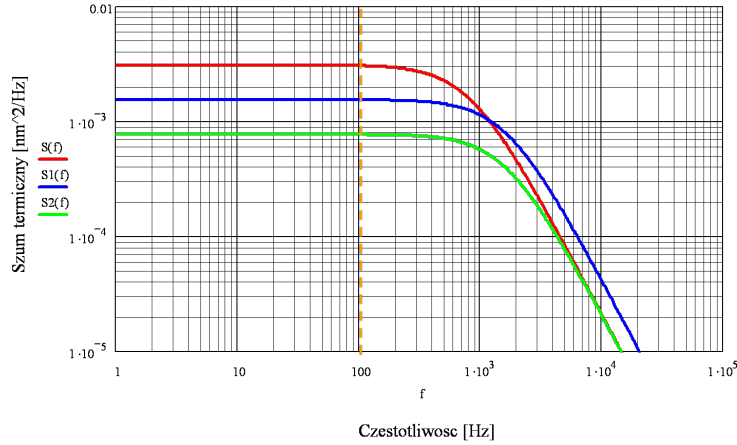
W spektroskopii mechanicznej, niezależnie od zastosowanej metody, doprowadzamy do odkształcenia badanego obiektu (pojedynczej molekuly polimeru), mierząc zarówno wartość siły jak i stopień odkształcenia zachodzącego pod jej wpływem.[71, 72, 8]. Do pomiaru siły wykorzystuje się niskowymiarrowe sondy, do których przyczepia się unieruchomiony na podłożu obiekt. Jeśli taki układ zostanie poddany działaniu siły, to odkształceniu podlega zarówno sonda jak i sam obiekt. Poprzez pomiar odkształcenia sondy  $y$ , przy jej znanej stałej sprężystości  $k$  możemy wyznaczyć siłę rozciągającą  $F$  korzystając z prawa Hooke'a:

$$F = k y \quad (3.1)$$

Siły z jakimi będziemy mieli do czynienia w przypadku makromolekuł w zakresie entropowym będą z zakresu  $k_B T/nm \approx 4\text{pN}$ . Aby możliwe było wykonywanie pomiarów tak niewielkich sił konieczne jest stosowanie sond o rozmiarach mikrometrowych. Niewielki rozmiar sondy powoduje jednak, że podlega ona ruchom termicznym. Gęstość widmowa mocy tych drgań  $S$  dla częstotliwości  $\omega$  można wyrazić jako:

$$S(\omega) = \frac{k_B T}{\pi^2 \delta (\omega + \omega_c)} \quad (3.2)$$

gdzie  $\delta = 6\pi\eta a$  to opór cieczy o współczynniku lepkości  $\eta$  dla sondy w kształcie kulki o promieniu  $a$ , a częstotliwość graniczna  $\omega_c = \frac{k}{2\pi\delta}$ .



Rysunek 3.1. Gęstość widmowa mocy szumu termicznego dla różnego rodzaju mikrosond. Krzywa S2 pochodzi z sondy o dwukrotnie większej stałej sprężystości niż sonda S, natomiast sonda S1 stawia cieczy dwukrotnie mniejszy opór niż sonda S. Pomarańczowa przerywana linia pokazuje przykładowy limit filtra dolnoprzepustowego, zmniejszającego pole pod krzywymi i tym samym zwiększającego stosunek sygnału do szumu.

Nieoznaczoność odkształcenia  $\delta y^2$  w zakresie częstotliwości  $\Delta\omega$  odpowiada polu powierzchni pod wykresem  $S(\omega)$ . Możemy zauważyć (Rys. 3.1), że dla częstotliwości mniejszych niż  $\omega_c$  wartość szumu ma stałą wartość  $\frac{4k_B T \beta}{k^2}$  i w tym zakresie

$$\delta y^2 = \frac{4k_B T \delta}{k^2} \Delta\omega \quad (3.3)$$

$$\delta y = \sqrt{\frac{4k_B T \delta \Delta\omega}{k^2}} \quad (3.4)$$

Natomiast korzystając z (3.1) nieoznaczoność siły wyznaczmy jako:

$$\delta F = \sqrt{4k_B T \delta \Delta\omega} \quad (3.5)$$

Aby zwiększyć rozdzielczość pomiarów siłowych należy zatem korzystać z jak najmniejszych sond, które stawiają cieczy mały opór. Natomiast zastosowanie filtra dolnoprzepustowego pozwala zmniejszyć zakres częstotliwości  $\Delta\omega$  i poprawić stosunek sygnału do szumu [71, 73, 8].

Aby możliwe było przyłożenie siły do rozciąganego obiektu konieczne jest jego umocowanie do podłoża i do samej sondy. Przytwierdzenie to może mieć charakter specyficzny czyli poprzez wiązania elementów komplementarnych (np. ligand-receptor, pary zasadowe DNA). Jeden z tych elementów przytwierdzany jest do sondy i podłoża, drugi natomiast do rozciąganego obiektu. Wówczas zwiększa się prawdopodobieństwo, że sonda zwiąże się z konkretnym obiektem i podczepienie to wystąpi w określonym miejscu. Wadą tego rozwiązania jest ograniczenie siły rozciągającej obiekt do wytrzymałości wiązania specyficznego. Ponadto rozciągnięciu ulega wówczas więcej niż jeden obiekt i mimo, że wykorzystuje się zazwyczaj dobrze poznane łączniki, to ich wkład może utrudnić interpretację krzywych siłowych. Przy wykorzystaniu AFM możliwe jest stosowanie powierzchni niemodyfikowanych i rozciąganie obiektów przyczepionych poprzez wiązania niespecyficzne. Dobierając do ładunku obiektu w roztworze powierzchnie ujemne (mika, szkło) lub dodatnie (złoto) można przyczepić obiekt poprzez adhezję. Dokładna natura wiązań powstających między molekułą a igłą mikrobekki nie została ustalona. Jednak wiązania tego typu wytrzymują naprężenia nawet kilkuset pN, nie wymagają modyfikacji próbki i tym samym uzyskane krzywe siłowe odzwierciedlają wyłącznie odkształcenie obiektów jednego rodzaju.

W badaniach mechaniki pojedynczych molekuł większość eksperymentów polega na monitorowaniu zmian siły podczas rozciągania obiektu do zadanej długości. W pułapkach magnetycznych [8] oraz przy zastosowaniu cyfrowych kontrolerów PID, również w przypadku sond AFM [74] i pułapek optycznych [75] możliwe jest odwrócenie sytuacji, czyli utrzymywanie stałej siły oddziałującej na obiekt i monitorowanie jego wydłużeń. Tryb ten w literaturze jest znany jako *force clamp*.

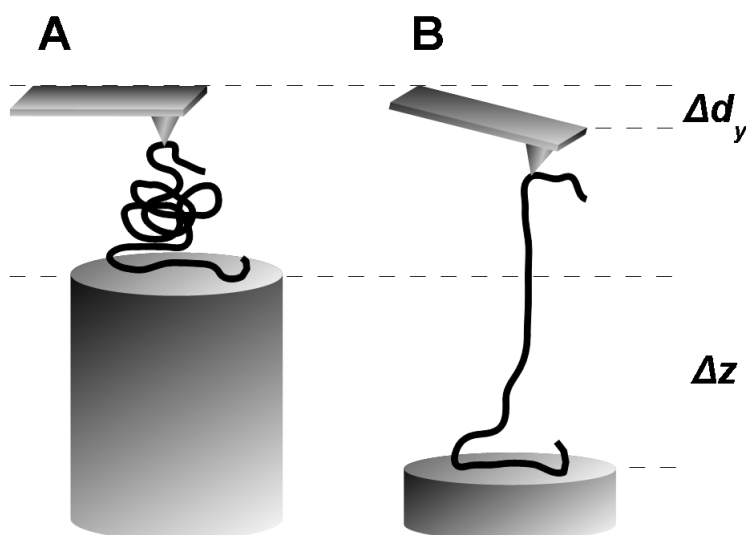
W metodach spektroskopii mechanicznej pojedynczych molekuł pomiary wykonuje się *in vitro*. Przygotowaną sondę umieszcza się w możliwie jak najbardziej jednorodnym roztworze, zawierającym badane molekuły w niewielkim stężeniu w celu ograniczenia wielokrotnych podczepień. Do roztworu tego wprowadza się niekiedy w trakcie trwania eksperymentu dodatkowe mo-

lekuły, w celu wykrycia ich wpływu na mechanikę badanych obiektów. Metody spektroskopii mechanicznej pojedynczych molekuł umożliwiły znacznie lepsze poznanie budowy i funkcjonowania białek modularnych, polisacharydów, motorów białkowych, enzymów oraz DNA [9, 76]. Szczegółowy przegląd literaturowy badań wykonanych dla DNA znajduje się w rozdziale 4.

Należy zaznaczyć, że dla biofizyki pojedynczych molekuł pomiary *in vitro* to jedynie wstęp dla stanowiącego wciąż jeszcze jedynie perspektywę powtarzalnego wykonywania pomiarów siłowych we wnętrzu żyjącej komórki [77].

### 3.2. Spektroskopia mechaniczna AFM

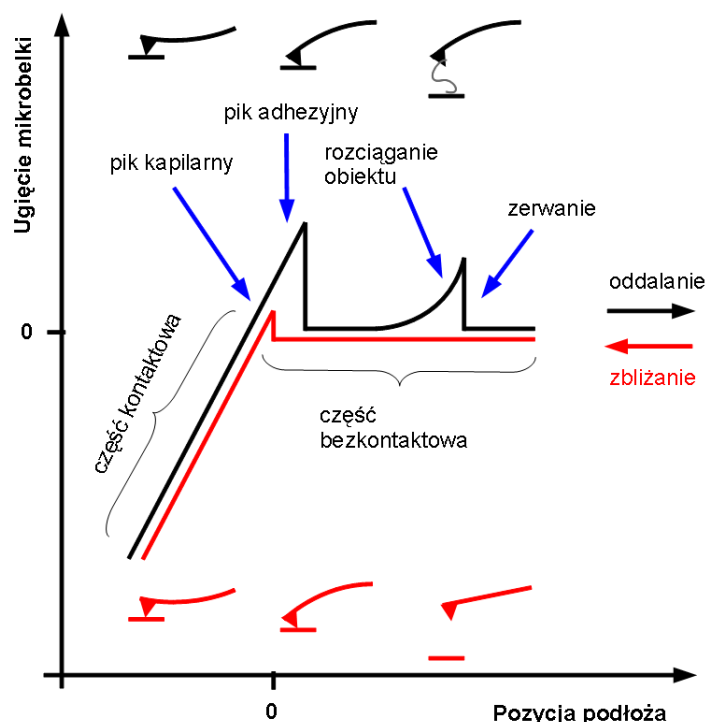
W spektroskopii mechanicznej AFM (Rys.3.2) jako sondę do pomiaru siły wykorzystuje się mikrobekę, do której przyczepiony jest rozciągany obiekt [78]. Miarę siły rozciągającej stanowi stopień jej ugięcia.



Rysunek 3.2. Spektroskopia mechaniczna AFM pojedynczych molekuł. Polimer zaczepiony jest jednym końcem do podłoża przesuwanego za pomocą przetwornika piezoelektrycznego, natomiast drugi koniec przyczepia się do ostrza mikrobekki (A). Mikrobekka AFM funkcjonuje jako dynamometr, a jej ugięcie  $\Delta d_y$  umożliwia pomiar siły podczas rozciągania podczepionego do ostrza obiektu poprzez przesunięcie  $\Delta z$  podłoża (B).

Zamiast skanowania, przetwornik piezoelektryczny wykonuje jedynie ruch w jednym wymiarze. W jego wyniku mikrobekka zbliża się do powierzchni, dotyka jej, a następnie cofa się do pozycji wyjściowej. Celem jest uchwycenie przytwierdzonego do podłoża obiektu, a następnie jego rozciągnięcie. Zarejestrowany wówczas sygnał napięciowy ugięcia mikrobekki oraz wydłużenie przetwornika piezoelektrycznego stanowi podstawę do otrzymania tzw. krzy-

wej siłowej, czyli wykresu zależności odkształcenia obiektu od przyłożonej siły.



Rysunek 3.3. Krzywa zależności ugięcia mikrobjelki od wydluzenia przetwornika piezoelektrycznego, powstająca podczas jej zbliżania i oddalania od podłoża. W czasie oddalania dochodzi również do rozciągnięcia i zerwania pojedynczej molekuly polimeru.

Kształt typowej krzywej siłowej uzyskiwanej podczas kontaktu z twar-  
dym, nie ulegającym odkształceniu w kontakcie z igłą podłożem przedsta-  
wiony jest na Rys. 3.3. Przetwornik piezoelektryczny wydłuża się o zadany  
zakres a następnie cofa, wracając do pierwotnej pozycji. W wyniku tego  
dochodzi do zbliżania i oddalania igły od podłoża z próbką. W począt-  
kowej fazie zbliżania igły, kiedy nie występują oddziaływania z podłożem,  
mikrobjelka nie ugina się, wykonując jedynie niewielkie drgania wynikające  
z ruchów termicznych. W bardzo małym oddaleniu od próbki w wyniku  
działania sił kapilarnych (nieobecnych dla pomiarów przeprowadzanych w  
środowisku pozbawionym wilgoci) następuje przygięcie mikrobjelki i wejście  
w kontakt z podłożem. Mikrobjelka zostaje następnie odgięta przez dalszy  
ruch przetwornika piezoelektrycznego. W wyniku tego na krzywej siłowej  
powstaje jej część kontaktowa, kluczowa w pomiarach nanoindentacji. W  
kolejnej fazie przetwornik zaczyna ruch powrotny. Jeśli próbka przyciąga  
ostrze, to można zaobserwować przygięcie mikrobjelki podczas ruchu powrot-  
nego poza punkt kontaktu, przejawiające się jako pik adhezji. Po oderwaniu

od powierzchni mikrobilka wraca do stanu równowagi. Wyjątkiem jest sytuacja, gdy do ostrza podczepiony został obiekt. Wówczas pozostały zakres ruchu przetwornika piezoelektrycznego umożliwia jego rozciągnięcie, a zmiany naprężenia rozciąganego obiektu w wyniku odkształceń powodują uginanie mikrobilki. Jeśli złapany obiekt nie odzepił się, to możliwa jest obserwacja nie tylko jego rozciągania, ale również relaksacji.

W trybie spektroskopii mechanicznej mikrobilka wykorzystywana jest w charakterze dynamometru. Zatem, zgodnie z prawem Hooke'a

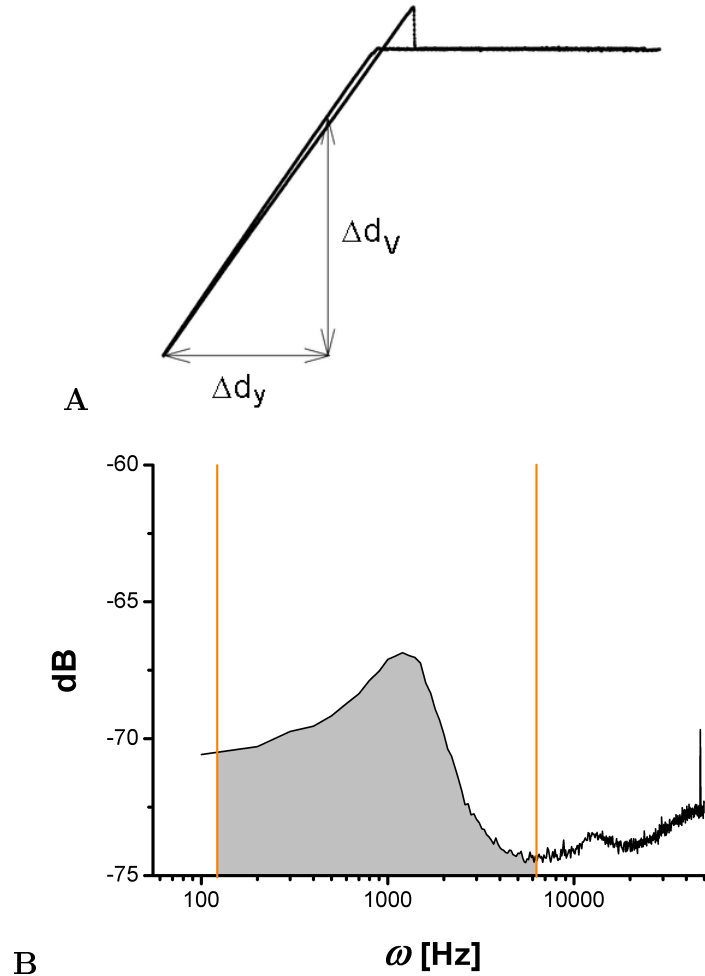
$$F = k \Delta d_y \quad (3.6)$$

aby wyznaczyć siłę  $F$  działającą na mikrobilkę musimy zmierzyć jej odkształcenie  $\Delta d_y$  i znać jej stałą sprężystości  $k$ . Sygnał pochodzący z fotodiody i modułu arytmetycznego wyraża ugięcie mikrobilki w jednostkach napięcia  $\Delta d_V$ , możemy jednak dokonać jego konwersji do jednostek długości poprzez kontrolowane odkształcenie mikrobilki  $\Delta d_y$ , rejestrując jednocześnie sygnał napięciowy  $\Delta d_V$  (Rys. 3.4A). Pozwoli to na wyznaczenie czułości mikrobilki i układu detekcji jej ugięcia:

$$SE = \frac{\Delta d_y}{\Delta d_V} \quad (3.7)$$

Najprościej można to wykonać rejestrując krzywą siłową na twardej i gładkiej powierzchni. Nachylenie części kontaktowej krzywej dostarczy wtedy informacji o czułości układu mikrobilka - fotodiody, czyli o tym, jakiemu ugięciu mikrobilki, zmierzonemu dzięki czujnikowi wydłużenia przetwornika piezoelektrycznego, odpowiada zmiana napięcia na detektorze.

Aby wyznaczyć siłę powodującą mierzone odkształcenie mikrobilki konieczne jest też znalezienie jej stałej sprężystości  $k$ . Wprawdzie producenci mikrobilek podają wartości ich stałej sprężystości, jednak wskutek wahań grubości można zaobserwować znaczne (60%) rozbieżności  $k$  nawet pomiędzy mikrobilkami pochodzącymi z tej samej serii produkcyjnej. Konieczne jest zatem ustalenie stałej sprężystości mikrobilki przed każdym pomiarem. Służyć do tego może wiele metod, m. in. Sadera [79], zwiększonej masy i wykorzystania mikrobilki referencyjnej [70] i metoda termiczna [80, 81]. Szezej opiszemy metodę termiczną, która dzięki swoim zaletom jest najszerzej stosowana i wykorzystana została również w mojej pracy doktorskiej. Poza swoją prostotą wyróżnia się ona możliwością kalibracji mikrobilek w ośrodku w którym zostanie wykonany pomiar. Jest to o tyle ważne, że ze względu np. na adsorpcję cieczy na powierzchni mikrobilki, jej stała sprężystości



Rysunek 3.4. Wyznaczanie parametrów niezbędnych do skalibrowania mikrobjelki: czułości  $s$  mikrobjelki i układu detekcji jej ugięcia (A) poprzez pomiar nachylenia części kontaktowej krzywej siłowej oraz całki mocy widmowej  $d_V(f)$  dla pierwszego modu drgań (B).

może ulec zmianie i tym samym stosowanie wartości uzyskanych w próżni lub powietrzu może prowadzić do błędnych wartości siły. Metoda termiczna wykorzystuje fakt, że sonda pomiarowa, która jest w stanie równowagi z otoczeniem może być w przybliżeniu traktowana jako oscylator harmoniczny, wzbudzany do drgań przez ruchy termiczne. Jego hamiltonian będzie miał postać:

$$H = \frac{\langle p^2 \rangle}{2m} + \frac{k \langle \Delta d_y^2 \rangle}{2} \quad (3.8)$$

gdzie  $\langle p^2 \rangle$  - uśredniony po czasie pęd ruchu mikrobjelki,  $m$  - masa mikrobjelki,  $k$  - jej stała sprężystości,  $\langle \Delta d_y^2 \rangle$  - uśredniony po czasie kwadrat odkształcenia sondy w wyniku ruchów termicznych. Zgodnie z zasadą ekwi-

partycji energii, zarówno członowi średniej energii kinetycznej jak i członowi średniej energii sprężystości możemy przypisać energię drgań termicznych  $\frac{k_B T}{2}$ . W szczególności:

$$\frac{k \langle \Delta d_y^2 \rangle}{2} = \frac{k_B T}{2} \quad (3.9)$$

$$k = \frac{k_B T}{\langle \Delta d_y^2 \rangle} \quad (3.10)$$

$$k = \frac{k_B T}{\langle \Delta d_V^2 \rangle S E^2} \quad (3.11)$$

Zgodnie z twierdzeniem Parsewala całka mocy sygnału po czasie jest równa całce mocy widmowej po częstotliwości:

$$\int_{-\infty}^{\infty} |d_V(t)|^2 dt = \int_{-\infty}^{\infty} |d_V(\omega)|^2 d\omega \quad (3.12)$$

Zatem wystarczy dokonać rejestracji drgań termicznych mikrobjelki przy ustalonej temperaturze, dokonać transformacji Fouriera i scałkować numerycznie uzyskane widmo drgań. Zakres całkowania ograniczyć należy do piku pierwszej harmonicznej w celu usunięcia wpływu czynników nie związanych z drganiami termicznymi np. wibracje, zakłócenia akustyczne lub szumy elektroniczne (Rys. 3.4B). Ponieważ jednak:

- zastosowany model oscylatora harmonicznego jest jedynie przybliżeniem rzeczywistej mikrobjelki
  - pomiaru  $\langle \Delta d_V^2 \rangle$  dokonuje się dla mikrobjelki swobodnej, podczas gdy  $SE$  mierzone jest dla mikrobjelki podpartej
  - w pomiarze ugięcia metodą optyczną plamka lasera nie jest nieskończenie mała i nie znajduje się dokładnie na końcu mikrobjelki
- konieczne jest skorygowanie wzoru, przy czym czynnik 0.764 prawdziwy jest dla mikrobjelki trójkątnej

$$k = 0.764 \frac{k_B T}{\langle \Delta d_V^2 \rangle S E^2} \quad (3.13)$$

Należy też zauważyć, że w wyniku obecnego w prawie wszystkich mikroskopach sił atomowych pochylenia mikrobjelki względem płaszczyzny próbki o kąt  $\theta$ , mierzona siła  $F$  powinna być skorygowana o  $\frac{1}{\cos^2 \theta}$ . Jednak ponieważ również stała sprężystości wyznaczana w tym samym mikroskopie metodą termiczną lub przy wykorzystaniu mikrobjelki referencyjnej podlega korekcie o  $\cos^2 \theta$ , to oba te czynniki znoszą się i mierzona siła jest poprawna w sytu-

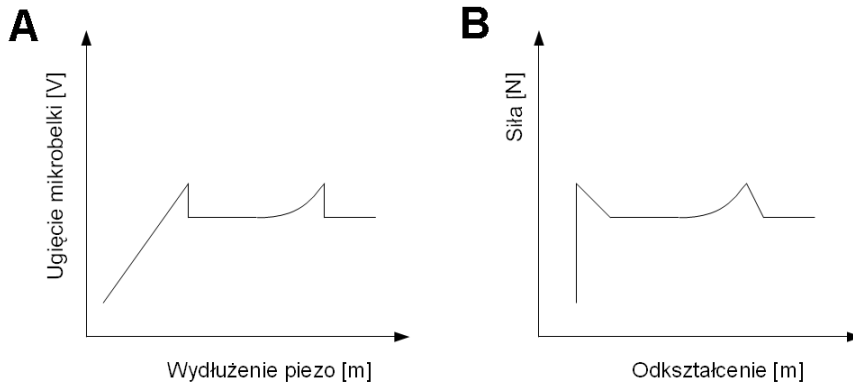


acji, gdy stała sprężystości wyznaczona została w tym samym mikroskopie. Kąt nachylenia mikrobilki uwzględniać trzeba jedynie gdy korzystamy z  $k$  wyznaczonego za pomocą innej metody, bądź też chcemy porównać wyniki wyznaczania  $k$  uzyskane z różnych metod.

Sygnal z czujnika wydłużenia przetwornika piezoelektrycznego  $\Delta z$  odpowiada odkształceniu zarówno mikrobilki  $d_y$  jak i badanego obiektu  $x$ . Konieczne jest zatem odjęcie odkształcenia mikrobilki, przy wykorzystaniu w tym celu uzyskanej poprzednio czułości  $SE$  :

$$x = \Delta z - d_y = \Delta z - SE d_V \quad (3.14)$$

Tym samym otrzymamy krzywą siłową  $F(x)$  (Rys. 3.5).



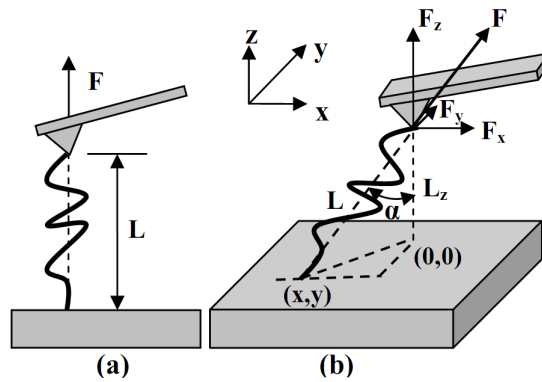
Rysunek 3.5. Krzywa siłowa uzyskana bezpośrednio (A) i po kompensacji ugięcia mikrobilki (B)

W czasie pomiarów dojść może do zafałszowań wyników, które trzeba uwzględnić podczas analizy. Poza szybkimi drganiami termicznymi mikrobilka zgina się również na skutek fluktuacji temperatury (*thermal drift*) w swoim najbliższym otoczeniu, powodując tym samym przesunięcie plamki ze środka detektora i wprowadzając zaburzenie do pomiaru siły. Ma to jednak wpływ na pomiar w przypadku, gdy ruch mikrobilki jest powolny ( $\leq 200$  nm/s). Zaburzenia tego nie można uniknąć, jednak można je znacznie ograniczyć przez rozpoczęcie pomiarów po względnym ustabilizowaniu temperatury układu pomiarowego i korygowaniu ustawień fotodetektora co pewien czas w czasie trwania eksperymentu.

Ruch mikrobilki zaburzony jest również przez efekty hydrodynamiczne, takie jak opór ośrodka w którym porusza się mikrobilka. Ponieważ jest on

proporcjonalny do prędkości, ujawnia się w przypadkach, gdy rozciąganie odbywa się z prędkością większą niż  $3\mu\text{m/s}$ .

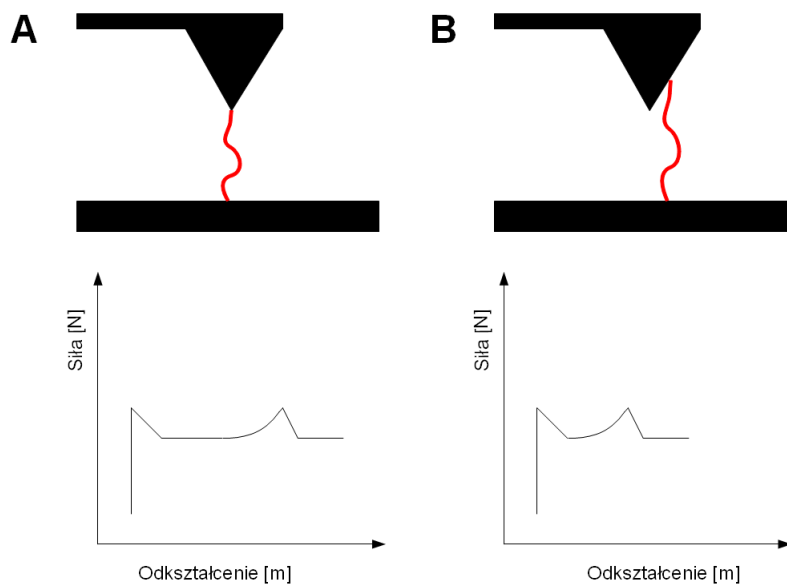
Krzywa siłowa może zostać zniekształcona przez interferencję, opisaną już podczas omawiania mikroskopu sił atomowych. Obecność interferencji przejawia się pojawieniem charakterystycznych garbów w części bezkontaktowej krzywej. Uniknięcie jej możliwe jest dzięki właściwie zaprojektowanemu instrumentowi. Jeśli mimo tego problem ten pojawia się, można próbować zmienić miejsce kontaktu na powierzchni próbki.



Rysunek 3.6. Pomiary siły i wydłużenia w przypadku rozciągania polimeru w sytuacji idealnej (a) i pod kątem  $\alpha$  (b) . Zaadaptowane z [82]

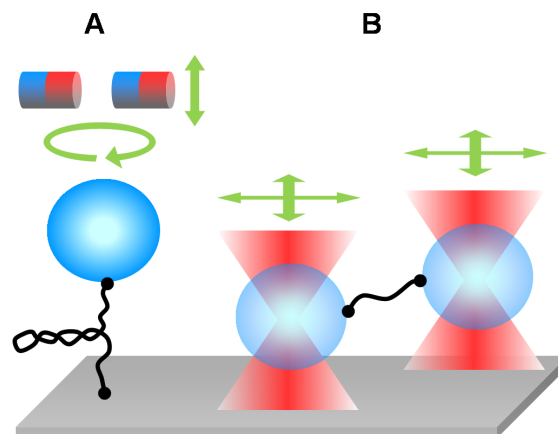
Kolejne dwie przyczyny zniekształceń krzywych siłowych rejestrowanych za pomocą AFM są typowe dla przypadków pomiarów rozciągania pojedynczych molekuł polimerów. Pierwszym z nich jest efekt kąta[82, 83], występujący w sytuacji, gdy oba punkty podczenia długiego polimeru nie leżą na jednej prostej prostopadłej do podłoża (Rys 3.6A), lecz rozciąganie zachodzi pod kątem  $\alpha$  (Rys. 3.6B). Mierzona siła w kierunku  $F_z$  będzie zatem projekcją faktycznej rozciągającej siły  $F$  na oś  $Z$ , podobnie jak długość polimeru  $L$  będzie mierzona jako  $L_z$ . Mierzone wartości wynosić będą zatem  $F_z = F \cos \alpha$  i  $L_z = L \cos \alpha$ .

Ponadto zafalszowania mierzonej długości polimeru może wprowadzać igła mikrobilki (Rys. 3.7). W sytuacji, gdy podczepiany polimer jest o 1-2 rzędów wielkości mniejszy od samego ostrza, miejsce kontaktu czubka igły z podłożem nie zawsze musi pokrywać się z miejscem, do którego podczepia się polimer. Tym samym, gdy polimer podczepi się powyżej czubka ostrza, to na krzywej siłowej nie zostanie zarejestrowana długość fragmentu wykraczającego poza czubek igły. Problem ten można zredukować ograniczając siłę nacisku lub też stosując mikrobilki pozbawione igieł.



Rysunek 3.7. Skrócenie rozciąganego polimeru wynikające z jego podłączenia powyżej czubka igły.

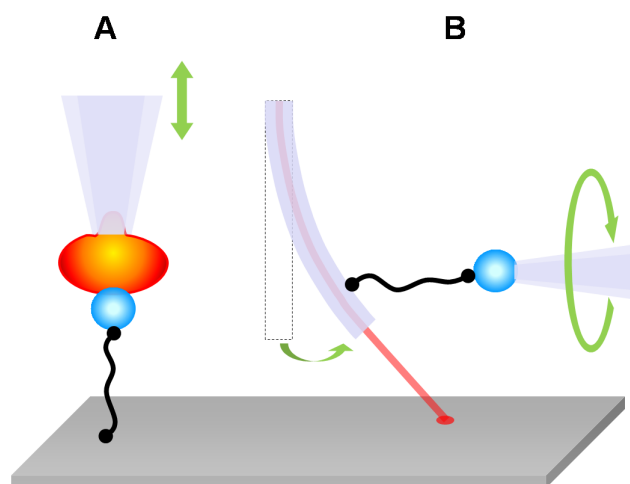
### 3.3. Pozostałe metody spektroskopii mechanicznej



Rysunek 3.8. Metody spektroskopii mechanicznej wykorzystujące pułapki magnetyczne (A) i optyczne (B)

W pułapkach optycznych [84] i magnetycznych [85] (*optical/magnetic tweezers*) wykorzystuje się mikrometrowych rozmiarów kulki zawieszono w cieczy (Rys. 3.8). Kulki te, w przypadku szczypiec optycznych, wykonane są z przezroczystego dielektryka i funkcjonują jak małe soczewki sferyczne. Po zogniskowaniu na ich powierzchni światła lasera ulega ono silnemu za-

łamaniu. Zmiana kierunku pędu fotonów w kulce powoduje powstanie siły ściągnącej kulkę w kierunku ogniska. Natomiast kulki stosowane w pułapkach magnetycznych wykonane są z silnie paramagnetycznego materiału i ich pułapkowanie zachodzi w gradiencie pola magnetycznego. Poprzez przesuwanie lasera lub układu magnesów można manipulować kulką i przyczepionym do niej obiektem, w szczególności zaś odkształcać go, jeśli drugim końcem przyczepiony jest do podłoża. Pułapki magnetyczne poprzez obrót magnesów mają ponadto możliwość wymuszania rotacji kulki i tym samym skręcania przyczepionego do niej obiektu. W pułapkach tych pomiar siły opiera się na wykorzystaniu zależności między amplitudą ruchów Browna kulki, a napięciem rozciąganego polimeru. Przesunięcie kulki obserwuje się poprzez zmiany prążków interferencyjnych obserwowanej przez mikroskop kulki. Obie te metody posiadają znacznie lepszą rozdzielczość niż AFM, jednak zarazem siła rozciągająca nie przekracza 100 pN. Ograniczenie stanowi tu zarówno możliwość wykorzystania w tych metodach wyłącznie specyficznego wiązania sondy z rozciągającym polimerem, jak również niebezpieczne rozgrzewanie próbki przez skupioną wiązkę lasera.



Rysunek 3.9. Spektroskopia mechaniczna wykorzystująca sprężystość komórki zasypanej w mikropiecu (A) i pomiar ugięcia końcówki mikroigły światłowodowej (B).

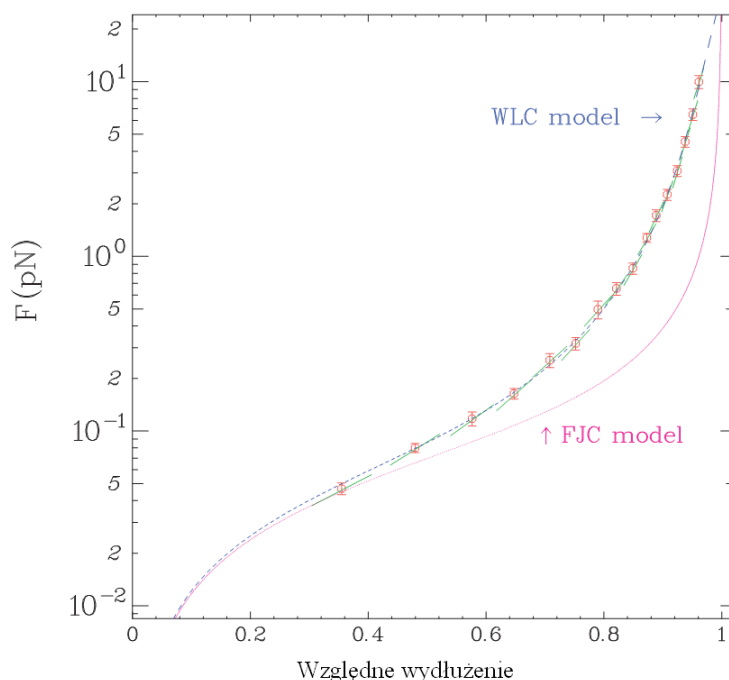
Metodą zbliżoną do mikroskopu sił atomowych są mikroigły [86, 87], wykonane w postaci światłowodu (Rys. 3.9B). Igła taka ugina się podczas rozciągania zaczepionego za jej koniec polimeru, a ugięcie to śledzi się poprzez mikroskopową obserwację ruchu świecącej końcówki światłowodu.

Drugi koniec polimeru przymocowany jest do kulki, przesuwanej za pomocą mikropipety. Dodatkowo możliwe jest również obracanie mikropipety w celu skręcania podczepionych do niej obiektów. W charakterze sond wykorzystuje się także komórki biologiczne, głównie erytrocyty (*biomembrane force probe*) [88], uchwycone przez zassanie końcówką mikropipety (3.9 A). Miarą siły jest więc w tej metodzie ugięcie membrany lipidowej. Ponieważ zmieniając podciśnienie mikropipety można zmieniać naprężenie błony uchwyconej komórki, metoda ta umożliwia zmianę stałej sprężystości sondy siłowej. Przesunięcie mikropipety i odkształcenie błony obserwuje się za pomocą mikroskopu.

## 4. Spektroskopia mechaniczna DNA

### 4.1. Rozciąganie DNA

Pierwszy pomiar odkształcenia pojedynczej cząsteczki DNA przeprowadzony został w 1992 roku przez zespół Carlosa Bustamante [49]. Był to jednocześnie pierwszy pomiar właściwości mechanicznych pojedynczej molekuly. W eksperymencie tym DNA poprzez wiązania specyficzne przyłączono jednym końcem do podłoża, a drugim do kulki paramagnetycznej i poprzez zmiany prędkości przepływu buforu i zmiany pola magnetycznego dokonywano jego rozciągnięcia. Dostępny w tej metodzie zakres sił umożliwił zbadanie zakresu sprężystości entropowej dupleksu DNA, czyli rozwijania kłęбка, który tworzy on w roztworze. Uzyskane krzywe siłowe DNA wykorzystano do weryfikacji modeli sprężystości polimeru (Rys. 4.1). Zachowanie DNA dwuniciowego w zakresie entropowym najlepiej opisuje model WLC [89].



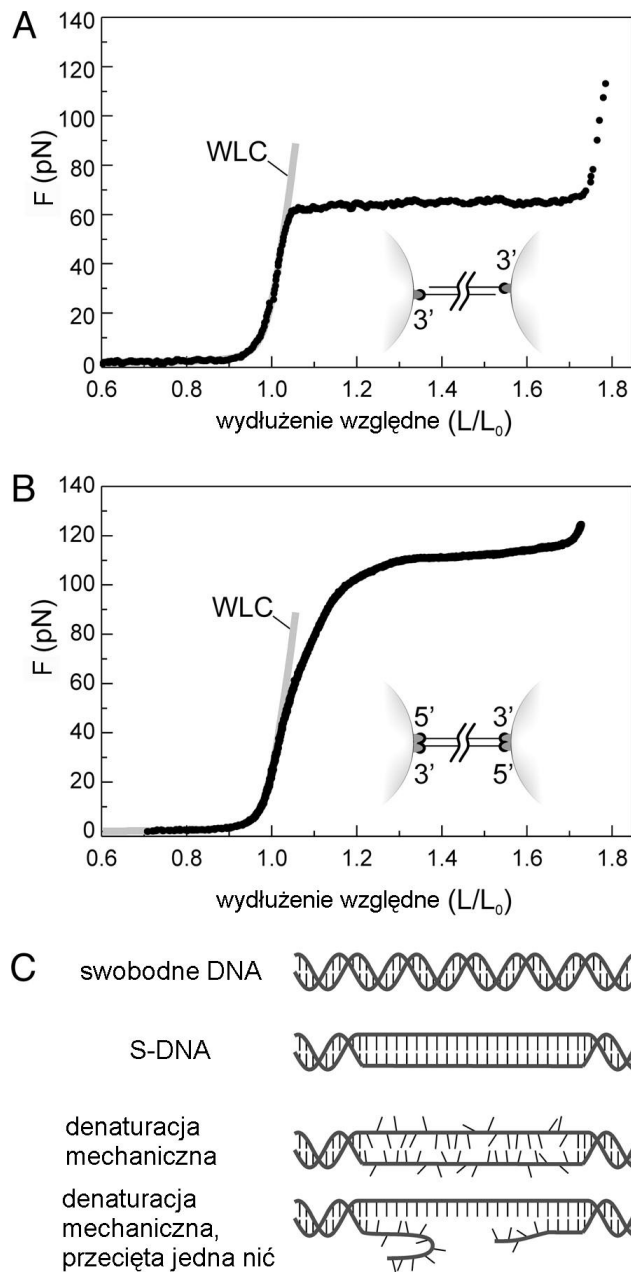
Rysunek 4.1. Krzywa siłowa dsDNA w zakresie entropowym i porównanie z modelami sprężystości polimeru [44].

Kolejne eksperymenty, wykorzystujące pułapki optyczne [90] oraz sondy

światłowodowe [87] umożliwiły zbadanie zachowania DNA również w zakresie sprężystości entalpicznej. Po osiągnięciu siły granicznej rozciągana molekula zwiększa swoją długość o 70% przy praktycznie stałej sile, formując na krzywej siłowej charakterystyczne plateau (*overstretching transition* - dalej nazywane przejściem OS). Siła ta wynosi 65 pN w przypadku, gdy DNA uchwycone zostaje tylko za jedną nić lub jedna z nici jest przecięta i molekula może obracać się podczas rozciągania (Rys. 4.2A). Natomiast w przypadku, gdy ma miejsce zaczepienie za obie nici (3'5'-5'3') i topologia DNA jest ograniczona (Rys. 4.2B) to przejście OS zachodzi dla siły 110 pN [91]. Obecność tego plateau sugeruje, że po wpływie przyłożonej siły dochodzi do znaczących zmian w strukturze molekuly. Podobne, choć znacznie mniejsze plateau obserwowane było w krzywych siłowych pojedynczych molekuł polisacharydów [92] oraz podwójnej helisy miozyny [93] i zidentyfikowane zostało jako wynik wymuszonego przejścia między dwiema konformacjami.

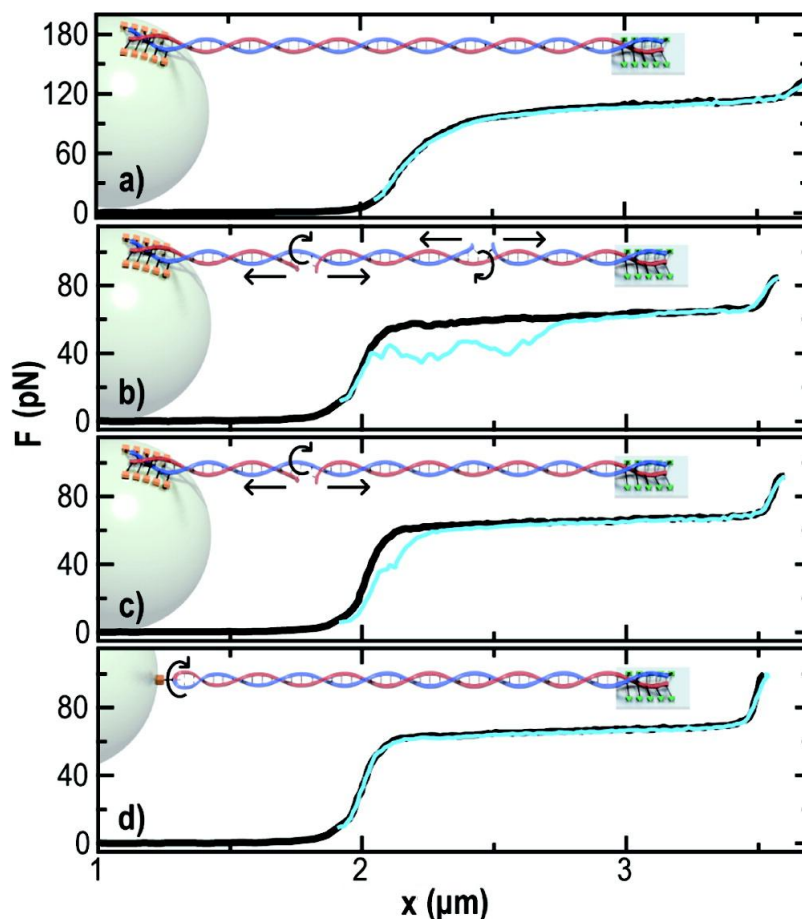
Podczas zmniejszania naprężenia polimeru, przy jednoczesnym monitorowaniu jego naprężenia, można zarejestrować krzywą powrotną, obrazującą relaksację polimeru. W przypadku DNA ograniczonego topologicznie histereza krzywej rozciągania i krzywej relaksacji jest zawsze niewielka i są one do siebie bardzo podobne. Odmienna sytuacja występuje, gdy mamy do czynienia z DNA posiadającym jedno lub więcej uszkodzenia nici - krzywa powrotna odbiega wówczas, często w znacznym stopniu, od krzywej rozciągania. Badania za pomocą pułapek optycznych i wykorzystujące konstrukty DNA umożliwiły rozciąganie nieuszkodzonej molekuly bez ograniczania jej rotacji podczas rozciągania [95], a uzyskane krzywe posiadały plateau przejścia OS na poziomie 65 pN i nie wykazywały histerezy (Rys. 4.3). Wielkość histerezy uzależniona jest zatem od stopnia uszkodzenia DNA i jest odzwierciedleniem trudności z odtworzeniem jego struktury podczas relaksacji w skali czasowej eksperymentu. Ograniczenie topologii jest natomiast czynnikiem decydującym o sile, dla jakiej zajść może przejście OS.

Istnieją dwie konkurencyjne teorie tłumaczące pochodzenie przejścia OS w dsDNA (Rys. 4.2C). Według pierwszej, zjawiskiem odpowiedzialnym za powstawanie plateau jest przejście konformacyjne B-DNA do hipotetycznej, wydłużonej formy S-DNA (Rys. 4.10A) [87], natomiast druga tłumaczy je jako wynik jego denaturacji mechanicznej [96]. W doświadczeniu, w którym doprowadzano do przejścia OS w obecności wiążącego się z wolnymi parami zasadowymi gliksalu, obserwowano w efekcie zaburzenie krzywej powrotnej. Sugeruje to, że wiązania par zasadowych zostały zerwane podczas przejścia OS, a przyłączenie gliksalu uniemożliwia ich odtworzenie w czasie relaksacji



Rysunek 4.2. Sprężystość DNA w zakresie entalpicznym. Przejście OS ma postać plateau, odpowiadającego wydłużeniu DNA o 70% początkowej długości. Dla DNA uchwyconego za jedną nić (A) przejście to zachodzi dla siły 65 pN, natomiast w przypadku uchwycenia za obie nici 110 pN (B). Przejście OS tłumaczy się jako konformacyjne przejście z formy B-DNA do S-DNA lub też częściową denaturację mechaniczną (C). Zaadaptowane z [94].

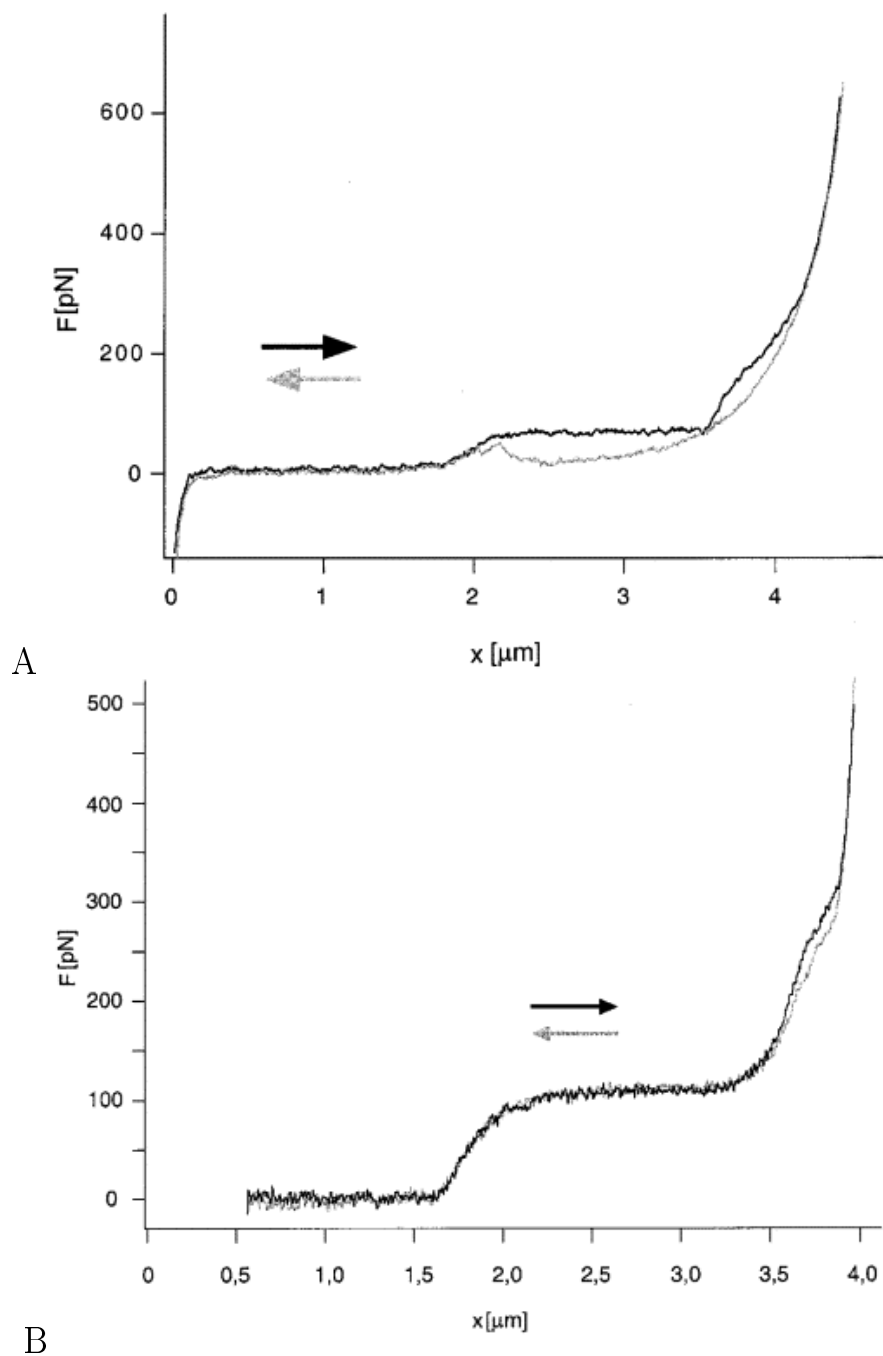




Rysunek 4.3. Wpływ ograniczenia topologii na histerezę krzywej siłowej rozciągania i relaksacji dsDNA. Krzywa (A) powstała w wyniku rozciągania nieuszkodzonego dsDNA zaczepionego za obie nici. Kolejne krzywe powstały w wyniku przecięcia jednej z nici w dwóch (B) i jednym miejscu (C). Konstrukt DNA rozciągany w przypadku (D) nie był uszkodzony i umożliwiał rotację w miejscu zaczepienia. Zaadaptowane z [95].

[97]. Jeszcze lepszego potwierdzenia hipotezy o częściowej denaturacji dostarczyło wykonanie pomiarów spektroskopii mechanicznej pułapek optycznych i fluorescencji pojedynczych molekuł w kanałach mikrofluidycznych, umożliwiającą wprowadzanie naprężonej molekuly do środowisk zawierających oznakowane specyficznie fluorofory [94, 98].

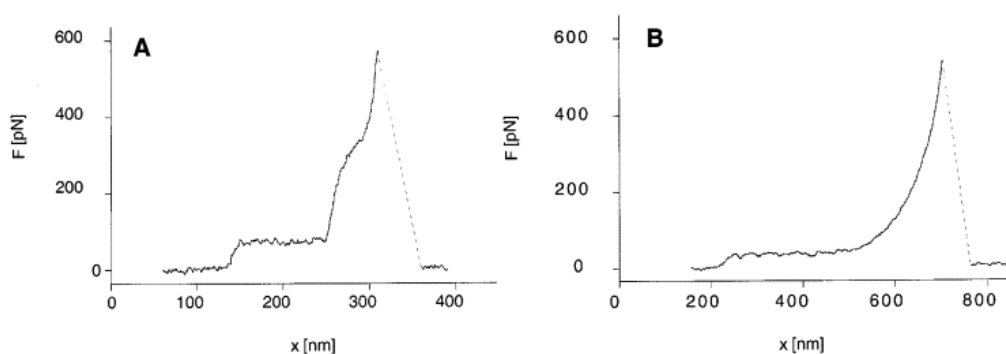
Zastosowanie AFM [100, 99, 101] umożliwiło rozciąganie DNA z większą siłą, a ponadto, ponieważ mikrobilka za każdym razem wykonuje ruch przybliżający i oddalający od próbki, możliwe było obserwowanie histerezy krzywych rozciągania i relaksacji podczas każdego pomiaru (Rys. 4.4). Zaobserwowano, że przy siłach na poziomie ok. 150-300 pN ujawnia się obecność drugiego, chociaż znacznie mniej wyeksponowanego plateau. Zaobserwowano też, że histereza znacząco wzrasta po przekroczeniu tego plateau, a w wielu przypadkach krzywa powrotna upodabnia się do krzywej pochodzącej



Rysunek 4.4. Krzywe siłowe dsDNA uzyskane za pomocą AFM, wykazujące obecność drugiego plateau i histerezę rozciągania i relaksacji. Krzywa (A) pochodzi z molekuly złączonej za jedną nić, natomiast (B) z molekuly o ograniczonej topologii. Zaadaptowane z [99].

z ssDNA. Bezpośrednie zestawienie z krzywymi pochodzącymi z ssDNA i dopasowanie do tej krzywej modelu FJC pozwoliły na stwierdzenie, że po przekroczeniu drugiego plateau dochodzi do pełnej denaturacji i dalszemu rozciąganiu oraz relaksacji podlega pojedyncza nić DNA. Ok. 5% krzywych posiadało przejście OS na poziomie 110 pN i w oparciu o poprzednie eksperymenty zidentyfikowane zostało jako pochodzące z rozciągania molekuł uchwyconych za obydwie nici (podczepienie za końce 3'5'-5'3'). W krzywych tych histereza pozostawała niewielka również po osiągnięciu drugiego plateau.

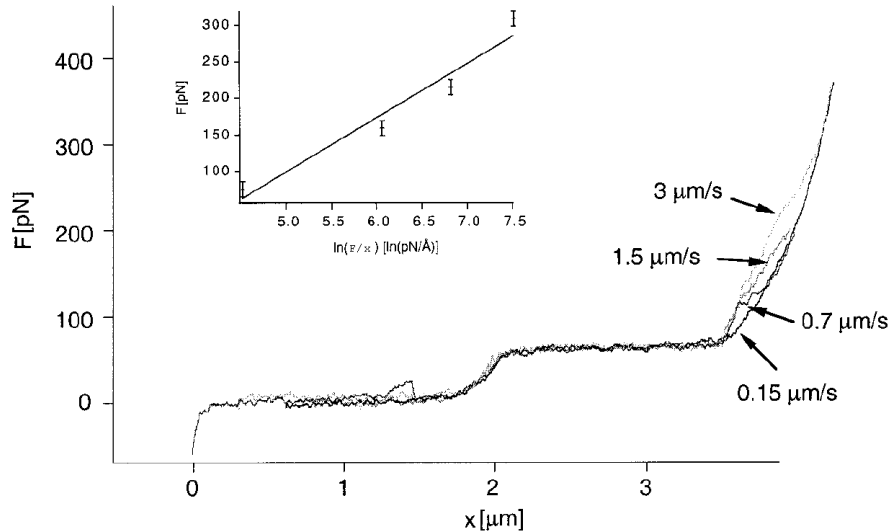
Przeprowadzono również doświadczenia z konstrukcjami poli dG-dC i poli dA-dT (Rys. 4.5). Dla konstrukcji składających się z par A-T otrzymano krzywe o przejściu OS na poziomie 35 pN i całkowicie pozbawione drugiego plateau. Krzywe pochodzące z posiadających silniejsze wiązania konstrukcji par G-C posiadały natomiast przejście OS na poziomie 65 pN, podobnie jak ma to miejsce w DNA zawierającym oba rodzaje zasad. Różnice występowały natomiast w drugim plateau, które pojawiało się dla 300 pN, czyli siły dwukrotnie większej niż miało to miejsce w DNA faga lambda [100, 99].



Rysunek 4.5. Krzywe siłowe uzyskane dla konstrukcji poli dG · poli dC i poli dA · poli dT. Zaadaptowane z [99].

Dokonano także rejestracji krzywych siłowych dla różnych szybkości zmian siły rozciągającej (Rys. 4.6). O ile przejście OS nie wykazuje zależności od dynamiki rozciągania, to można ją zaobserwować dla drugiego plateau - jego poziom jest tym większy, im szybciej przyrasta siła. Sugeruje to, że proces zachodzący w przejściu OS jest równowagowy w skali czasowej eksperymentu, natomiast proces którego odzwierciedleniem jest drugie plateau jest nierównowagowy.

Wspomniany w rozdziale 3.2 efekt kąta wprowadza do krzywej siłowej DNA, z racji znacznego wydłużenia w wyniku przejścia OS, znaczne zaburzenia. Długość plateau przejścia OS znacznie się wydłuża poza standardowe 70% długości konturowej. Plateau staje się nachylone, a jego średnia siła



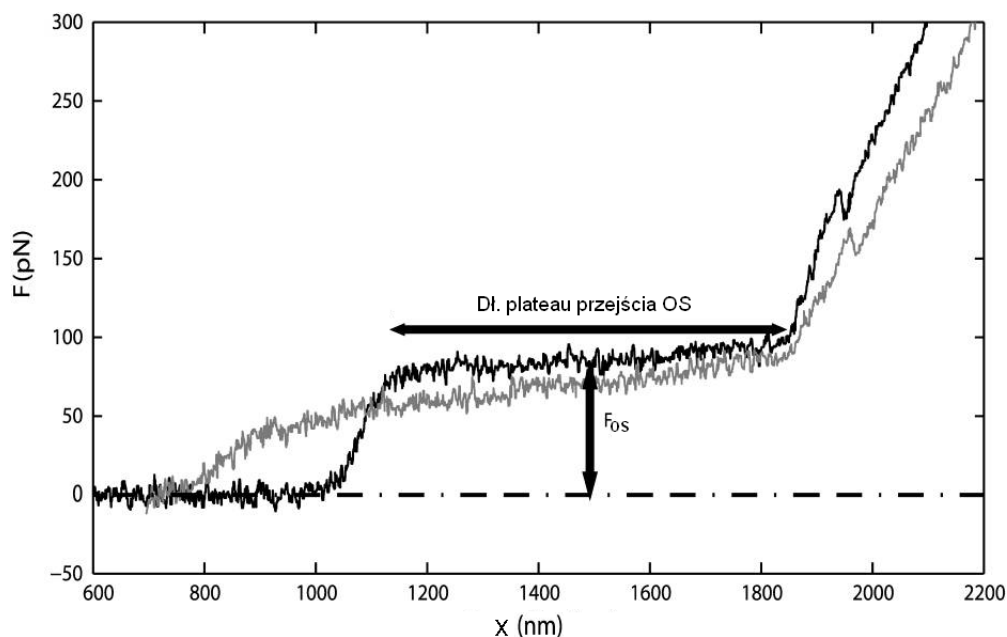
Rysunek 4.6. Dynamiczna spektroskopia mechaniczna dsDNA. Siła przejścia OS nie zmienia się, niezależnie od szybkości rozciągania. Wyraźne zmiany wykazuje natomiast drugie plateau. Logarytmiczny wykres we wstawce obrazuje zależność między końcową siłą drugiego plateau a szybkością narastania siły. Zaadaptowane z [99].

spada (Rys. 4.7). Prowadzić to może do zafałszowania wyników pomiarowych [82, 83].

Zupełnie odmienne właściwości mechaniczne niż pojedyncze molekuly dsDNA wykazuje ssDNA (Rys. 4.8). Z racji mniejszej o połowę gęstości ładunku i obecności wolnych nukleotydów, umożliwiających formowanie par zasadowych w obrębie tej samej molekuly, ssDNA stawia znacznie większy opór niż dsDNA w początkowej fazie rozciągania (Rys. 4.8). Ze względu na jego budowę (sztywne elementy połączone rotującymi wiązaniami) do jego krzywej siłowej lepiej można wykonać dopasowanie modelu FJC. Krzywa ta nie posiada plateau takich jak przejście OS [90]. Jedynie w przypadku, gdy rozciągane były fragmenty ssDNA składające się z samych nukleotydów adeninowych (poli dA) zaobserwowano obecność dwóch plateau dla sił 20 pN i 80 pN, które postulowano jako wynik rozrywania oddziaływań warstwowych między parami zasadowymi i deformacji konformacyjnych wewnątrz łańcucha fosforanowo-cukrowego [102, 103].

## 4.2. Superskręcanie DNA

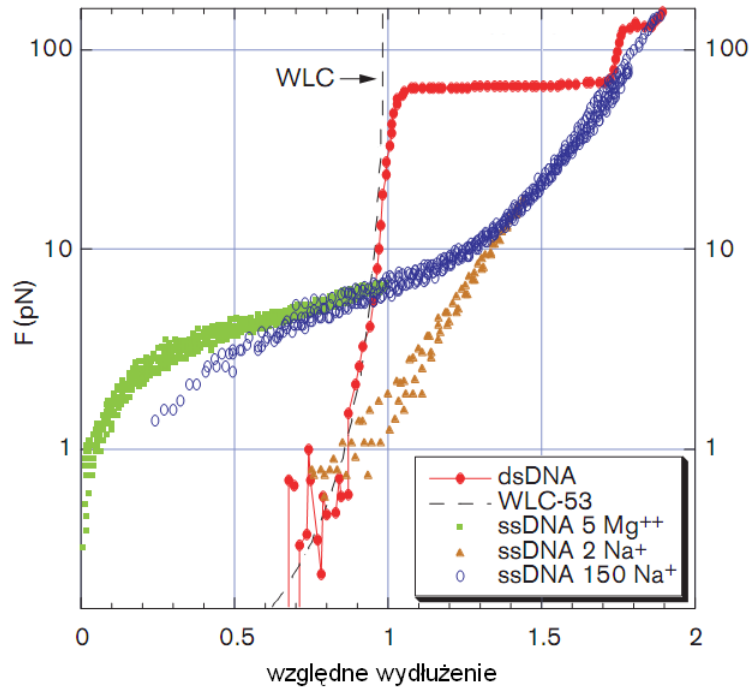
Poza odkształceniem DNA poprzez rozciąganie wykonano też liczne eksperymenty, w których duplekisy DNA poddawane były działaniu sił torsyjnych, umożliwiając tym samym kontrolowanie ich topologii. Pułapki magne-



Rysunek 4.7. Wpływ efektu kąta na krzywą siłową DNA. Można zaobserwować, że dla molekuly rozciąganej pod kątem mierzona siła przejścia OS jest mniejsza, a jego plateau jest wydłużone. Zaadaptowane z [83]

tyczne umożliwiają kontrolowane wymuszanie superskręcenia pojedynczych dsDNA, utrzymując jednocześnie stałą siłę rozciągającą. Dla sił nie przekraczających 0.5 pN, niezależnie od kierunku skręcania po kilkunastu obrotach kulka paramagnetyczna, do której molekula była przyczepiona, zaczynała być intensywnie ściągana (Rys 4.9A). Zinterpretowano to jako efekt formowania plektonemu po wpływie skręcenia [105, 11]. Przy zwiększonym naprężeniu (ok. 1pN) molekuly zaobserwowano, że plektonem formuje się tylko przy skręceniach zgodnych z kierunkiem helisy DNA, natomiast dla wyższych sił nie powstaje on wcale. Dodatkowe pomiary, połączone z symulacjami sterowanej dynamiki molekularnej [106] doprowadziły do zaproponowania nowej formy dsDNA, która powstaje, gdy B-DNA zostaje silnie skręcone, a naprężenie uniemożliwia powstanie plektonemu. W wyniku tego molekula podlega mechanicznej denaturacji, nici ściśle owijają się wokół siebie, natomiast rozdzielone pod wpływem skręcenia dupleksu pary zasadowe ustawione zostają na zewnątrz helisy, odwrotnie niż ma to miejsce w B-DNA. Formę taką nazwano P-DNA (Rys. 4.10A), na cześć Linusa Paulinga, który jako pierwszy ją zaproponował, na krótko przed odkryciem Watsona i Cricka [107].

Zastosowanie sond siłowych w postaci cienkich światłowodów pozwoliło nie tylko skręcać DNA, ale umożliwiło także rozciąganie skręconego w określonym stopniu dsDNA (Rys. 4.9B) [91]. Przy braku skręcenia uzyskano znaną z innych doświadczeń krzywą z charakterystycznym plateau na po-



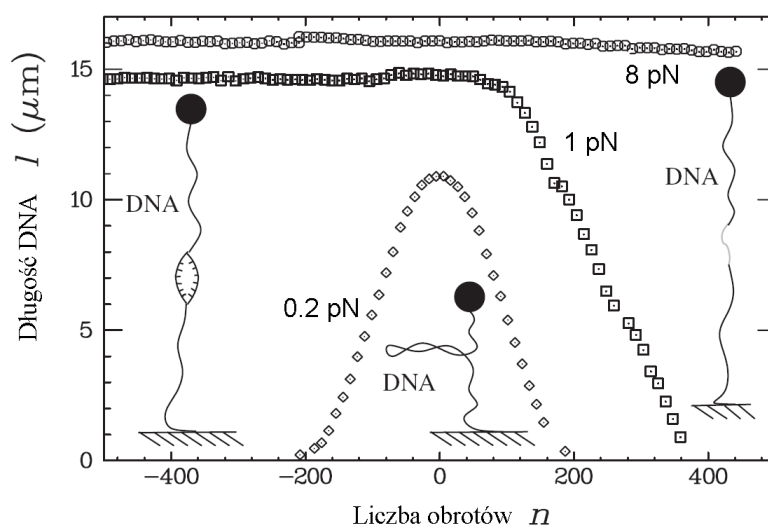
Rysunek 4.8. Porównanie krzywych siłowych dsDNA i ssDNA w różnych stężeniach jonowych. Zaadaptowane z [104]

ziomie 110 pN. W zależności od kierunku wprowadzanych skręceń krzywa ta ulegała zmianom. W przypadku, gdy dsDNA skręcane było w kierunku przeciwnym do kierunku helisy pojawiało się dodatkowe plateau dla sił ok. 50 pN. To dodatkowe przejście wynika z obecności fragmentu rozwiniętego w wyniku skręcenia, które w trakcie rozciągania wymaga mniejszej siły dla przejścia OS. Taka rozwinięta forma DNA, pozbawiona struktury helikalnej nazwana została L-DNA, od kierunku (L-left) w którym jest skręcona względem B-DNA. Skręcenie w kierunku zgodnym z kierunkiem helisy przejawia się natomiast pojawieniem się małego plateau na poziomie 20 pN powstającym w wyniku rozwijania plektonemu powstałego w trakcie skręcenia. Kolejne doświadczenia umożliwiły zapostulowanie diagramu przemian fazowych DNA (Rys. 4.10B), opisującego formę w której znajduje się DNA w zależności od skręcenia i rozciągającej siły [108].

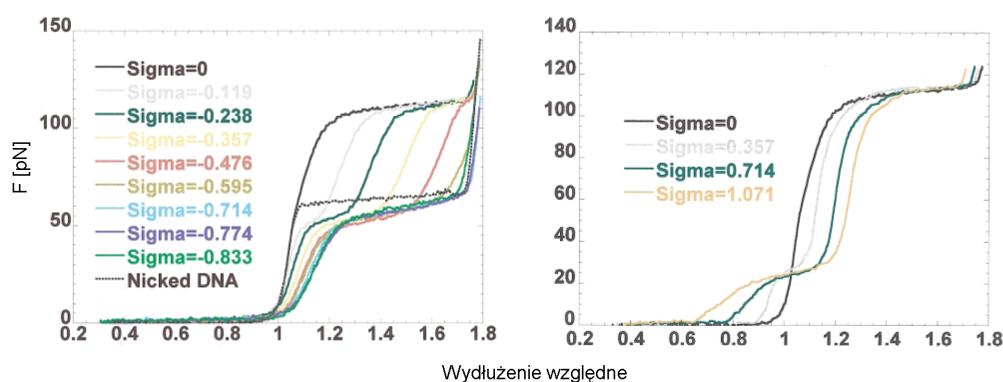
### 4.3. Tworzenie struktury superhelikalnej DNA

Opisane powyżej badania pozwoliły bardzo dobrze opisać właściwości mechaniczne DNA liniowego, istotne dla zrozumienia wielu procesów komórkowych. Jednak DNA w takiej formie jedynie bardzo rzadko znajduje się w

A

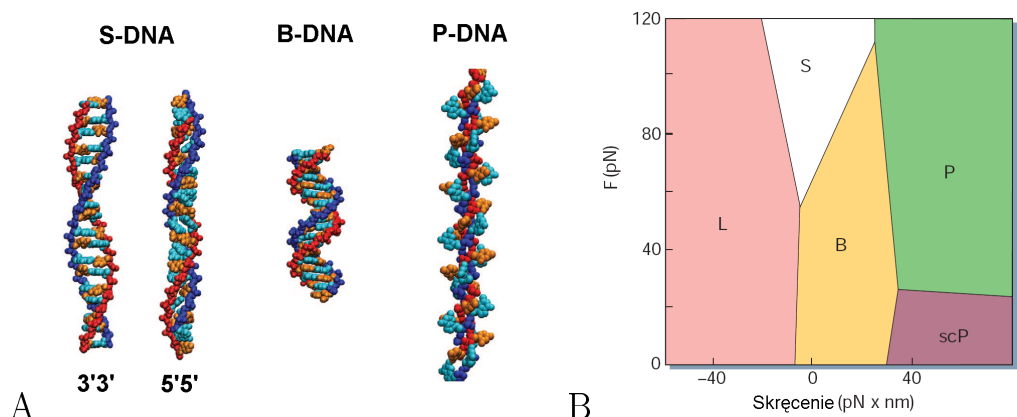


B



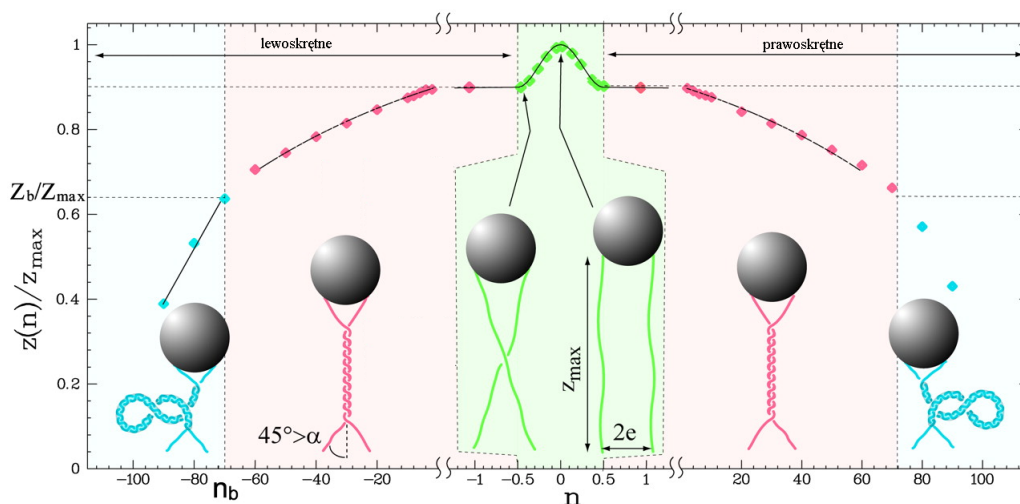
Rysunek 4.9. Zmiany długości DNA pod wpływem wprowadzonego skręcenia przy stałych siłach (A) oraz wpływ skręcenia na przejście OS (B). Zaadaptowane z [44, 91]

żywych organizmach. Jak opisano to w podrozdziale 1.2, materiał genetyczny formuje superhelikalne plektonemy bądź też spirale chromatynowe i w takiej właśnie formie podlega odkształceniom w komórkach. Taka sytuacja ma miejsce np. podczas podziału komórki, gdzie naprężeniu podczas rozdzielania podlega materiał genetyczny i jego kopia. Również podczas całego cyklu życiowego komórka podlega licznym zewnętrznym czynnikom mechanicznym, które zgodnie z najnowszymi badaniami mogą mieć wpływ na genom [109]. Ostatnie badania sugerują również, że sam kształt materiału genetycznego może mieć, poza sekwencją, znaczenie w przechowywaniu informacji genetycznej [110]. Konieczne jest zatem zbadanie właściwości mechanicznych struktury superhelikalnej (w której dwie helisy DNA są skręcone względem siebie) oraz chromatyny. O ile chromatyna została pod tym względem dobrze zbadana zarówno za pomocą pułapek optycznych jak i AFM [111], to



Rysunek 4.10. Forma B-DNA i hipotetyczne formy S-DNA i P-DNA. Wymuszane mechanicznie przejścia między tymi formami opisane mogą być diagramem fazowym. Zaadaptowane z [10, 1]

właściwości mechaniczne struktury superhelikalnej zostały zbadane jedynie w ograniczonym zakresie. Eksperymenty przeprowadzono z wykorzystaniem pułapek magnetycznych, które wykorzystane zostały do skrećenia dwóch dupleksów DNA (Rys. 4.11). Rejestrując długość takiego układu względem stopnia jego skrećenia obserwowano stopniowe jego skracanie zakończone przejściem (zinterpretowanym jako powstawanie plektonemu), podobnie jak miało to miejsce w przypadku superskrećania pojedynczej molekuly [11, 12].



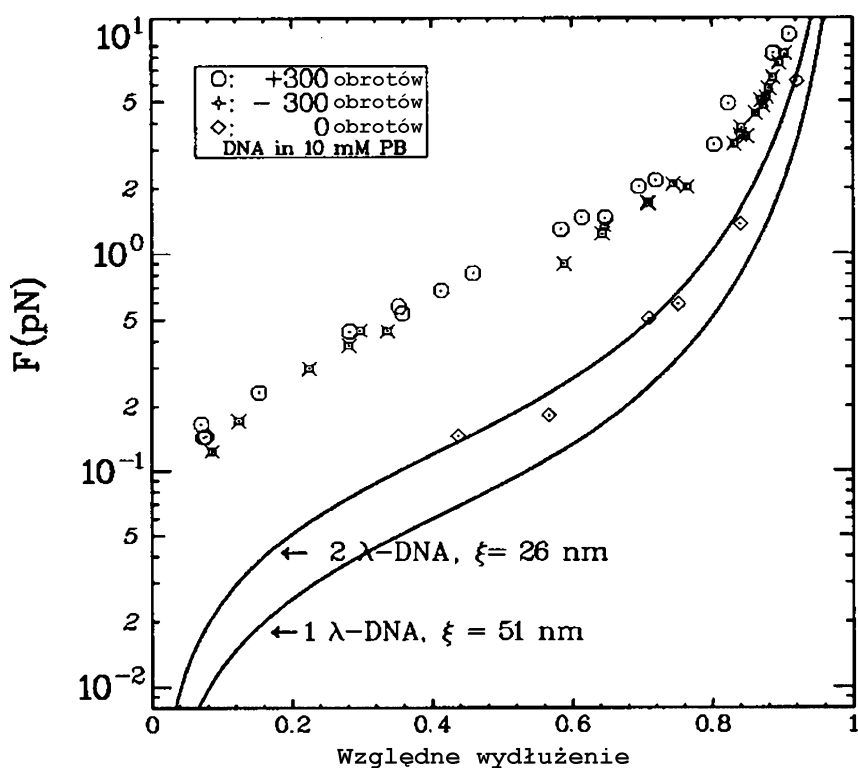
Rysunek 4.11. Zmiana długości dwóch skrećanych molekuly DNA [112]

Zarejestrowano również krzywe siłowe dla takiego układu (Rys. 4.12). Jednak ograniczona siła rozciągająca pułapek magnetycznych pozwoliła na zbadanie właściwości mechanicznych dwóch skrećonych molekuly DNA jedynie dla sił mniejszych niż 10 pN. W zestawieniu znormalizowanych krzywych siłowych pojedynczej molekuly, dwóch molekuly oraz struktury super-



helikalnej można było zaobserwować, że molekuly skręcone stawiają znacznie większy opór podczas rozciągania niż molekuly rozciągane równolegle [11]. Wyniki te pokrywały się z wnioskami badań teoretycznych [105], które wskazywały, że na właściwości mechaniczne takiej struktury istotny wpływ będzie miało wzajemne odpychanie ujemnie naładowanych dupleksów oraz zginanie i skręcanie helis, które musi pojawić się podczas rozciągania.

Wykorzystanie jednocześnie czterech pułapek optycznych również pozwoliło na kontrolowane przeplecenie dwóch molekuly DNA [113]. Układ taki wykorzystany został do przesuwania jednej molekuly względem drugiej i pomiaru ich wzajemnego tarcia. Nie zostały wykonane jednak pomiary rozciągania powstałej struktury superhelikalnej.



Rysunek 4.12. Zestawienie krzywych siłowych uzyskanych dla pojedynczej molekuly dsDNA, dwóch dsDNA rozciąganych równolegle oraz po ich dodatnim lub ujemnym skręceniu. [11]

Zbadanie właściwości mechanicznych struktury superhelikalnej z wykorzystaniem mikroskopu sił atomowych, który umożliwia przeprowadzenie pomiarów w zakresie entalpicznym stanowi przedmiot tej rozprawy doktorskiej.

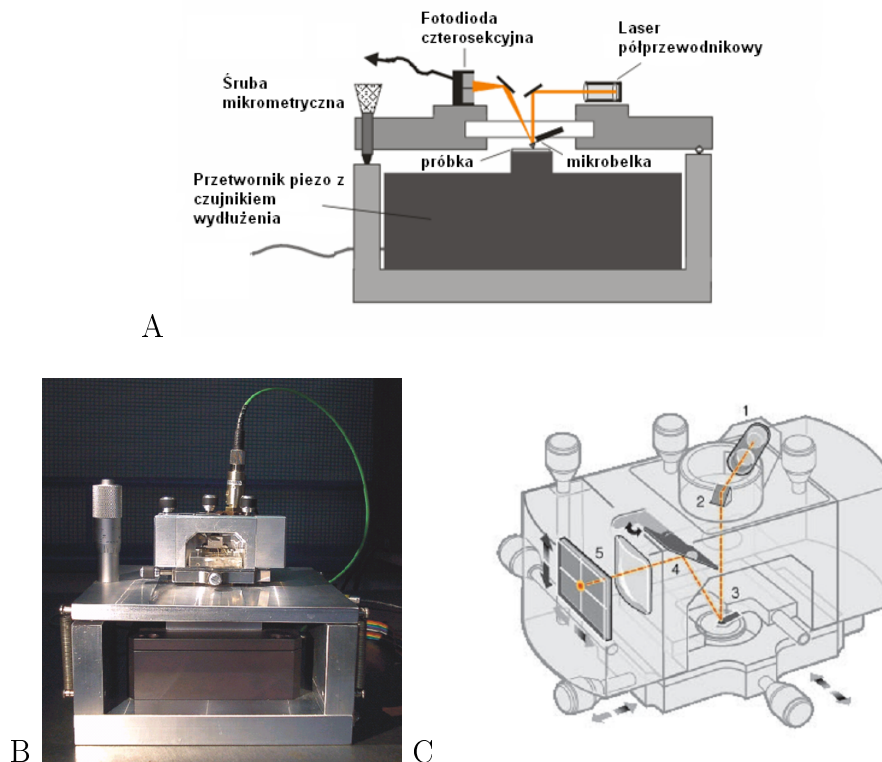
# Konstrukcja aparatury, metody i wyniki pomiarowe

## 5. Konstrukcja mikroskopu sił atomowych do pomiarów w trybie spektroskopii sił

### 5.1. Instrument zbudowany w Duke University

Konstrukcja tego instrumentu oparta była na koncepcji pierwszego mikroskopu wyspecjalizowanego do pomiarów w trybie spektroskopii mechanicznej, który powstał w 1992 roku w laboratorium Hermanna Gauba z uniwersytetu Ludwika Maksymiliana w Monachium i zaadaptowany został następnie przez inne zespoły. Instrument ten wykorzystywał głowicę komercyjnego AFM Multimode firmy Digital Instruments (byłe Veeco, obecnie Bruker), osadzoną na korpusie wykonanym z aluminium w formie dwóch równolegle ułożonych płytek. Rurkowy skaner piezoelektryczny zastąpiony został jednowymiarowym przetwornikiem w postaci piezostosu (Rys. 5.1). Przetwornik ten wyposażony jest w oporowy czujnik wydłużenia i może pracować w zamkniętej pętli sprzężenia zwrotnego. Zastosowanie piezostosu umożliwiło zarówno zredukowanie szumów poprzez wyeliminowanie ruchów bocznych piezoelementu, jak również znacznie lepszą linearyzację ruchu przetwornika. Na końcu przetwornika przymocowany był magnes, którego zadaniem było unieruchomienie próbki, umieszczonej na podłożu przyklejonym do żelaznego krążka. W instrumencie tym przetwornik podnosił i opuszczał próbkę względem mikrobilki umieszczonej w komórce cieczowej znajdującej się w głowicy. Podczas eksperymentu najpierw zgrubnie zbliżano próbkę do mikrobilki za pośrednictwem śruby mikrometrycznej, stanowiącej jeden z trzech punktów podparcia płytki z umieszczoną na niej głowicą. Po wejściu w kontakt z podłożem, co sygnalizowało odgięcie mikrobilki można było wykonywać precyzyjne ruchy próbką przetwornikiem piezoelektrycznym, sterowanym kontrolerem lub sygnałem stałonapięciowym generowanym w uniwersalnym interfejsie pomiarowym za pomocą programu sterującego. Natomiast liniowo rosnący do określonej wartości, a następnie malejący impuls napięciowy wy-

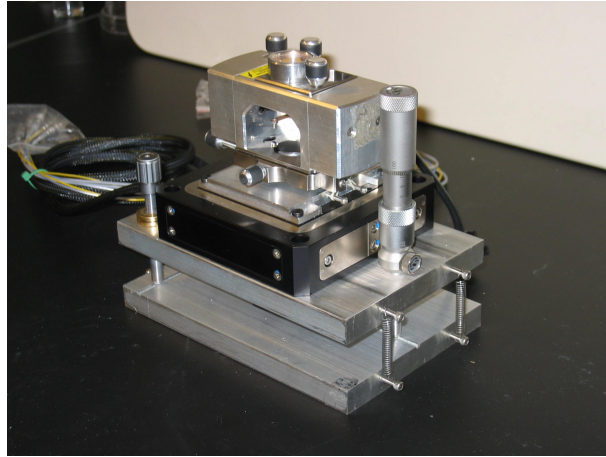
dłużał, a następnie skracał piezostos w zakresie ustalonym przez program w celu złapania, rozciągnięcia i relaksacji pojedynczej molekuly.



Rysunek 5.1. AFM wyspecjalizowany do spektroskopii mechanicznej i wykorzystujący komercyjną głowicę AFM firmy Veeco/Bruker. Schemat konstrukcji (A) i wygląd ogólny (zaadaptowane z [114]). Schemat budowy głowicy AFM Multimode firmy Veeco/Bruker, zastosowanej w tej konstrukcji. Kolorem pomarańczowym oznaczono bieg wiązki laserowej. 1 - moduł laserowy z kolimatorem i ogniskowaniem, 2 - pryzmat, 3 - mikrobelka umieszczona w uchwycie, 4 - zwierciadło, 5 - fotodioda czterosekcyjna. Zaadaptowane z [115]

W niektórych przypadkach dokonywano również przeróbki głowicy AFM, wymieniając standardowy moduł laserowy na półprzewodnikowy laser połączony światłowodem z kolimatorem i soczewką ogniskującą. Umożliwiał on znacznie lepsze zogniskowanie światła na końcu mikrobelki, niż ma to miejsce w układach komercyjnych. Pozwala to na ograniczenie zakłóceń wynikających z interferencji, jak również wykorzystanie nowej generacji niskowymiarowych mikrobelk.

Instrument zbudowany w Duke University, podobnie jak wcześniejsze wersje wykorzystywał komercyjną głowicę AFM (Rys. 5.2). Część mechaniczna została zaprojektowana i wykonana przez grupę Adaptive Systems and Struc-



Rysunek 5.2. AFM wyspecjalizowany w spektroskopii mechanicznej, skonstruowany w Adaptive Systems and Structures Lab z Center for Biologically Inspired Materials w Duke University. Fot. Monica Riviera

tures Lab z Center for Biologically Inspired Materials w Duke University (<http://asaslab.mems.duke.edu>). Autor wykonał jednostkę arytmetyczną (Dodatek B) oraz zaadaptował program akwizycji danych do nowej generacji interfejsów pomiarowych. Projekt ten zmodyfikowano względem poprzednich rozwiązań poprzez wykorzystanie piezostosu wyposażonego w pojemnościowy (zamiast oporowego) czujnik wydłużenia (Physik Instrumente, P-753, zakres ruchu  $15\mu\text{m}$ ), oraz wprowadzeniu dodatkowego piezoelementu, umożliwiającego precyzyjny ruch ostrza w płaszczyźnie poziomej i zmianę jego pozycji na powierzchni (Physik Instrumente, P-733.2, zakres ruchu  $30\mu\text{m}$ ).

Przed rozpoczęciem pomiaru głowicę Veeco ze znajdującą się w komórce mikrobekłą umieszczano pod optycznym mikroskopem odwróconym w celu ustawienia plamki lasera, a następnie mocowano na postawie instrumentu. Z głowicy pobierano sygnały napięciowe z czterech kwadrantów fotodiody. Trafiały one do modułu arytmetycznego, a powstały w wyniku sygnał napięciowy przechodził przez strojony filtr dolnoprzepustowy Bessela (firmy Frequency Devices) ustawiony na  $500\text{Hz}$  w celu poprawienia stosunku sygnału do szumu. Następnie, razem z sygnałami z czujników wydłużenia z przetworników piezoelektrycznych zbierany był przez uniwersalną kartę pomiarową DAQ PCI-6259 firmy National Instruments. Jest to karta 16 bitowa, z częstotnością próbkowania  $1.25\text{ MS/s}$  dla sygnałów wejściowych i  $2.86\text{ MS/s}$  dla sygnałów wyjściowych. Z karty tej sygnały sterujące kierowane były do sterowników przetworników piezoelektrycznych (Dodatek B).

Instrument sterowany był przez program napisany w środowisku LabView firmy National Instruments. Dzięki wykorzystaniu interfejsu pomiarowego tej samej firmy możliwe było napisanie programu sterującego bez konieczno-

ści tworzenia dedykowanych sterowników sprzętowych. Środowisko LabView umożliwia także łatwe modyfikacje programu i interfejsu graficznego oraz dostosowywanie go do potrzeb eksperymentu. Program stosowany w opisywanych pomiarach został zaadaptowany przez autora do LabView wersji 7.1 i interfejsów serii M i sterowników Ni-DAQmx. W programie możemy wyróżnić trzy niezależne moduły:

- Moduł sterowania i akwizycji danych
- Moduł kalibracji mikrobekki
- Moduł analizy danych

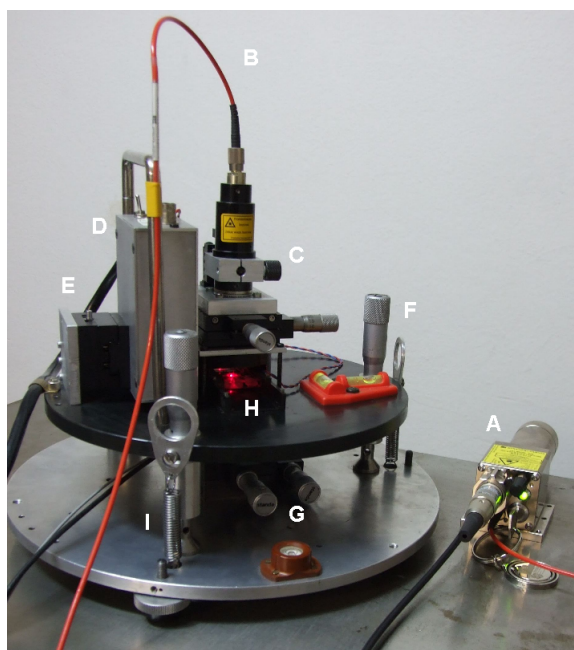
Moduł kalibracji umożliwia zebranie widma drgań termicznych mikrobekki i wykonanie jego analizy fourierowskiej. W module sterowania generowane są napięcia kierujące ruchem przetworników piezoelektrycznych oraz w czasie rzeczywistym monitorowane jest wychylenie mikrobekki i wydłużenie przetwornika piezoelektrycznego. W wybranym przez użytkownika momencie dokonąć można rejestracji krzywej siłowej. Program generuje wówczas zadaną liczbę sygnałów napięciowych (typowa wartość to 10 000), rosnących liniowo do zadanej wartości, a następnie malejących, sterujących ruchem piezostosu. W każdym z tych punktów jednocześnie zbierana była wartość sygnału z sensora wydłużenia i fotodiody. Uzyskana krzywa, jeśli wykazywała interesujące cechy, była następnie zachowywana. Moduł analizy umożliwiał przeglądanie zebranych danych, porównywanie krzywych oraz dopasowywanie modeli sprężystości polimerów.

W celu izolacji instrumentu od drgań umieszczono go na powietrznym stole optycznym.

## 5.2. Instrument zbudowany w Uniwersytecie Mikołaja Kopernika

W celu kontynuowania badań rozpoczętych w Duke University, jak również do wykorzystania w przyszłych badaniach, zbudowano mikroskop AFM w Zakładzie Biofizyki i Fizyki Medycznej (Rys. 5.3). Budowa została sfinansowana w przeważającej części ze stypendium *Krok w Przyszłość edycja I i III* jak również grantu promotorskiego i środków statutowych Zakładu Biofizyki i Fizyki Medycznej. Środki te nie były jednak wystarczające, by bezpośrednio zaadaptować projekt zastosowany poprzednio. W celu redukcji kosztów zastosowano głowicę własnej konstrukcji zamiast komercyjnej. Pozwoliło to jednak na łatwe dostosowanie konstrukcji do lasera półprzewodnikowego (Schäfter+Kirchoff, 51nanoFCM). Jednostka arytmetyczna uzupełniona zo-

stała o fotodiodę kwadrantową QP50-6-18 firmy Pacific Silicon Sensor oraz konwerter I/U. Zastosowano tylko jeden przetwornik piezoelektryczny, do ruchu w osi pionowej z oporowym sensorem wydłużenia (Physik Instrumente, P-741, zakres ruchu  $16\mu\text{m}$ ). Pozwoliło to uzyskać w pełni operacyjny instrument za kwotę ok. 35000 PLN, czyli 1/10 ceny instrumentu komercyjnego. Projekt konstrukcji autor wykonał wspólnie ze starszym technikiem Bogdanem Szymańskim, pracownikiem technicznym Zespołu Biofizyki Doświadczalnej.

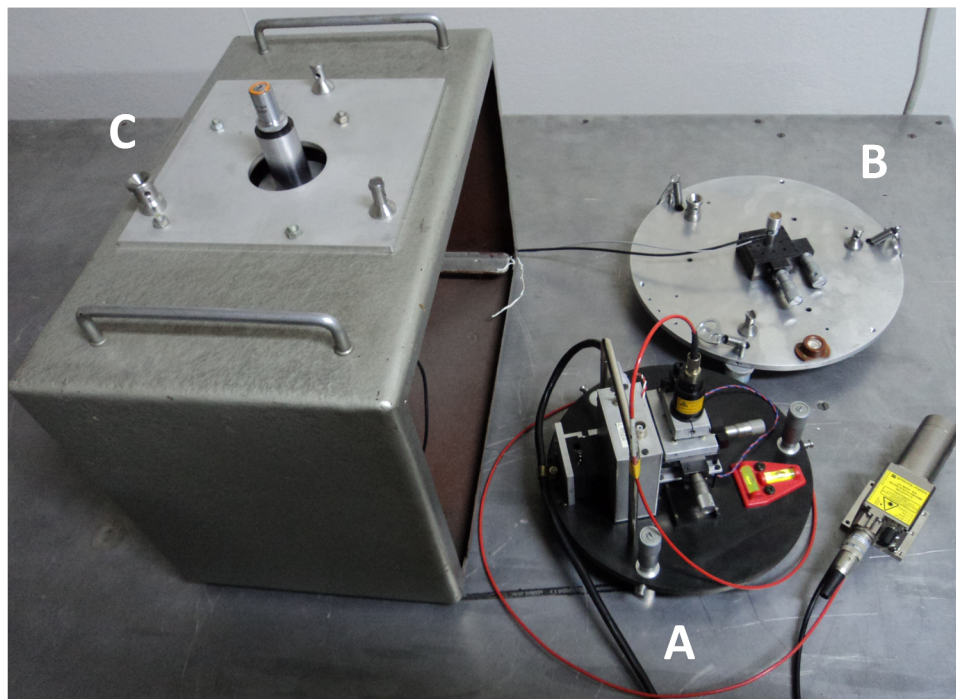


Rysunek 5.3. Instrument skonstruowany w Zakładzie Biofizyki i Fizyki Medycznej. A - laser, B - światłowód, C - kolimator lasera ze stolikami do pozycjonowania na mikrobelle i ogniskowania, D - fotodioda kwadrantowa z przedwzmacniaczem i jednostką arytmetyczną, E - pozycjonowanie fotodiody, F - śruba mikrometryczna zbliżająca mikrobelle do powierzchni, G - przetwornik piezoelektryczny ze stolikiem pozycjonującym, H - komórka cieczowa, I - sprężyny usztywniające.

Instrument składa się z:

- głowicy zawierającej komórkę cieczową z mikrobelle, układ detekcji ugięcia mikrobelle, jednostkę arytmetyczną i śrubę mikrometryczną do zgrubnego zbliżania (Rys. 5.4A)
- podstawy z piezostosem wraz z magnetycznym mocowaniem próbki, umieszczonym na stoliku XY (Rys. 5.4B)

— stacji dokującej, pozwalającej na stabilne ustawienie głowicy i podgląd mikrobjelki przez mikroskop z kamerą przemysłową w celu ustawienia plamki lasera na mikrobjelce i jej zogniskowania (Rys. 5.4C).



Rysunek 5.4. Części składowe instrumentu zbudowanego w UMK: głowica (A), podstawa (B) i stacja dokująca (C)

Ponieważ dysponowano jedynie masywnymi stolikami translacyjnymi i znaczna redukcja masy była niemożliwa, zoptymalizowano konstrukcję pod względem sztywności i stabilności. Cała konstrukcja ma kolistą geometrię i posiada trzy punkty podparcia rozstawione na planie trójkąta równobocznego, z których dwa są ruchome. Połączenie głowicy i podstawy jest usztywnione przez ściągnięcie sprężynami. W konstrukcji tej pętla mechaniczna wynosi 55 milimetrów. Wykorzystano komórkę cieczową do pomiarów w trybie kontaktowym, stosowaną w mikroskopie typu Multimode firmy Veeco/Bruker. Utrzymywana była w dopasowanej prowadnicy za pomocą dwóch płaskich sprężyn z brązu. Zastosowany laser niskoszumowy i niskospójny (51nanoFCM Schäfter+Kirchoff) o układzie kolimacyjno-ogniskującym który umożliwia zredukowanie interferencji w stosunku do typowych laserów komercyjnych oraz precyzyjne zogniskowanie plamki lasera do rozmiaru ok. 10  $\mu\text{m}$  na końcu mikrobjelki. Dodatkowo laser odchylony był od pionu o  $2^\circ$  w celu dalszej redukcji interferencji. Schemat konstrukcyjny mikroskopu znajduje się w Dodatku B.



Przed pomiarem głowica umieszczana była na stacji dokującej, gdzie laser naprowadzano i ogniskowano za pomocą stolików translacyjnych oraz centrowano fotodiode przy mikrobełce zanurzonej w buforze identycznym do zastosowanego w eksperymencie. Następnie głowica przenoszona była na podstawę z założoną próbką, gdzie po ustabilizowaniu termicznym wykonywano kalibrację i rozpoczynano eksperyment.

W celu ograniczenia szumów elektronicznych zarówno fotodiode jak i jednostkę arytmetyczną umieszczono na jednej płytce drukowanej i zamknięto w ekranującej aluminiowej obudowie, która poruszana była stolikiem XY dla wycentrowania plamki lasera. Sygnały z jednostki arytmetycznej i sensora wydłużenia piezostosu kierowane były do karty pomiarowej PCI-6251 firmy National Instruments, która ma identyczną charakterystykę, jak zastosowana w opisywanym poprzednio instrumencie karta 6259, posiada jedynie o połowę mniej wyprowadzeń. Umożliwiło to użycie wykorzystanego poprzednio programu, dostosowano jedynie interfejs graficzny.

W celu izolacji instrumentu od drgań umieszczono go na układzie dwóch stalowych płyt traserskich, z których większa (ok. 1000kg) ustawiona była na podłodze na warstwie styropianu, a mniejsza (ok. 50kg) spoczywała na dętce samochodowej. Wyższe częstotliwości drgań tłumione były przez gumowe nóżki instrumentu.

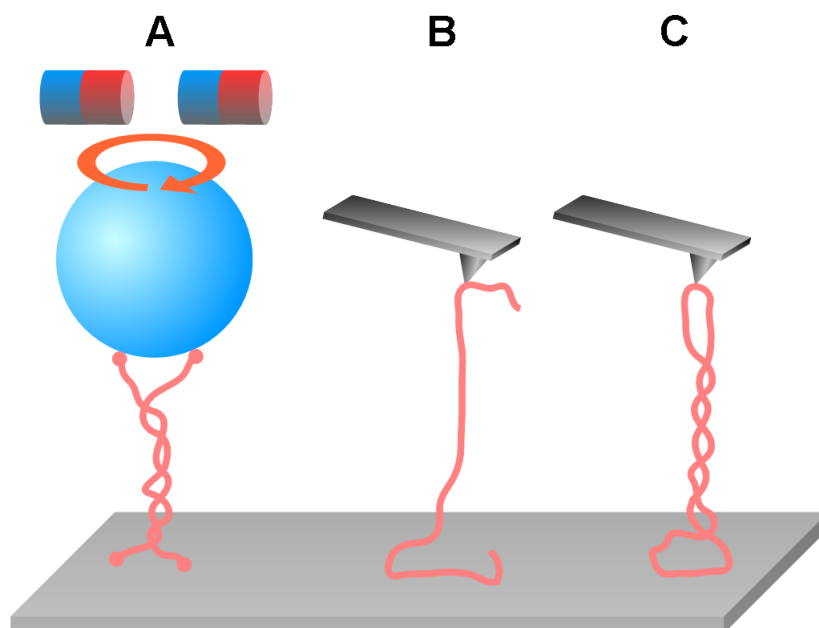
Poza pomiarami opisanymi w tej pracy doktorskiej instrument ten wykorzystany został również w badaniach nad rozwijaniem neuronalnego białka kontaktyny 4 [116] oraz  $\alpha$  neureksyny (dane złożone do publikacji).

## 6. Spektroskopia mechaniczna superhelikalnego DNA

### 6.1. Założenia i metody eksperymentu

Celem naszym było zbadanie właściwości mechanicznych struktury superhelikalnej i pomiar oddziaływań między molekułami DNA na poziomie pojedynczych molekuł. Opisane w Rozdziale 4 pomiary z wykorzystaniem pułapek magnetycznych umożliwiły wprawdzie znakomitą kontrolę skręcenia DNA, jednak siła rozciągania za pomocą tego instrumentu (Dodatek A) nie wystarcza do obserwacji denaturacji takiego układu. W naszych pomiarach wykorzystaliśmy naturalnie występującą strukturę superhelikalną w superskręconym plazmidzie bakteryjnym. Plazmid był chwytny i rozciągany za pomocą mikroskopu sił atomowych, analogicznie jak w przypadku doświadczeń z DNA liniowym (Rys. 6.1). W celu zidentyfikowania krzywych siłowych powstałych w wyniku deformacji struktury superhelikalnej wykonano pomiary kontrolne na plazmidzie zlinearyzowanym, w którym struktura ta została usunięta.

AFM stanowi idealne narzędzie do spektroskopii mechanicznej superskręconego plazmidu ze względu na możliwość przyłożenia bardzo dużej siły rozciągającej jak i możliwość wykorzystania wiązań niespecyficznych ostrza z molekułą i złotym podłożem. Zgodnie z ostatnimi badaniami, wiązania w takim przypadku tworzą się między atomami złota i wolnymi nukleotydami [117], a podczepione w ten sposób molekuly wytrzymują rozciąganie z siłą nawet 500pN [99]. Wolne pary zasadowe nie są jedynie obecne na końcach liniowego DNA, ale wskutek tzw. *DNA breathing* pojawiają się również lokalnie w wyniku fluktuacji termicznych w nieuszkodzonym DNA w warunkach fizjologicznych i skali czasowej rzędu 50  $\mu$ s [118]. Ujemne skręcenie obecne w plazmidzie zwiększa nawet prawdopodobieństwo takich zdarzeń i stabilizuje powstałe w ten sposób lokalne denaturacje [119]. Spektroskopia mechaniczna AFM z wykorzystaniem wiązań niespecyficznych jest zatem odpowiednim narzędziem do badania zarówno DNA w postaci liniowej jak i superskręconego plazmidu. Ponieważ jednak wiązanie niespecyficzne nie daje możliwości wyboru miejsca podczepienia, sytuacje gdy plazmid zostanie uchwycony za obie



Rysunek 6.1. Koncepcja pomiaru właściwości mechanicznych struktury superhelicznej. Stosowana w poprzednich badaniach metoda pułapki optycznej (A) umożliwia dobrą kontrolę skręcenia molekuł, posiada jednak zbyt małą siłę rozciągającą. Zastosowanie AFM i wykonanie porównawczych badań DNA liniowego (B) i kolistego (C) pozwala na wykorzystanie naturalnie występującej struktury superhelicznej w superskręconym plazmidzie.

pętle plektonemu i dojdzie do rozciągania struktury superhelicznej dotyczyć będą jedynie części wszystkich wyników pomiarowych.

Pomiary rozpoczęte zostały podczas rocznego stażu autora w Single Molecule Force Spectroscopy Lab, Center for Biologically Inspired Materials, Duke University kierowanym przez prof. Piotra Marszałka a następnie, po skonstruowaniu koniecznej aparatury, kontynuowane były w Zakładzie Biofizyki i Fizyki Medycznej Instytutu Fizyki UMK. Wykorzystano kolisty plazmid pUC18 w postaci superhelicznej. Posiada on 2686 par zasadowych, co odpowiada długości ok. 913 nm. Preparatyka pUC18 podczas badań w Duke University wykonana została w laboratorium dr Piotra Mieczkowskiego z Duke University Hospital. Został on namnożony w bakteriach *E.coli* z mutacją *endA* i oczyszczony za pomocą zestawu “Maxi plasmid purification kit” firmy QIAGEN. Plazmid został następnie umieszczony w roztworze buforującym (Tris-EDTA 10 mM (pH 8) zawierającym 150 mM NaCl) w stężeniu 50  $\mu\text{g/ml}$ . W próbkach kontrolnych plazmid został zlinearyzowany za pomocą enzymu *EcoRI*. W badaniach wykonanych w UMK wykorzystano pUC18 zakupiony z firmy Fermentas, a preparatykę wykonał dr Robert Lenartowski z Zakładu Genetyki Instytutu Biologii Ogólnej i Molekularnej UMK.

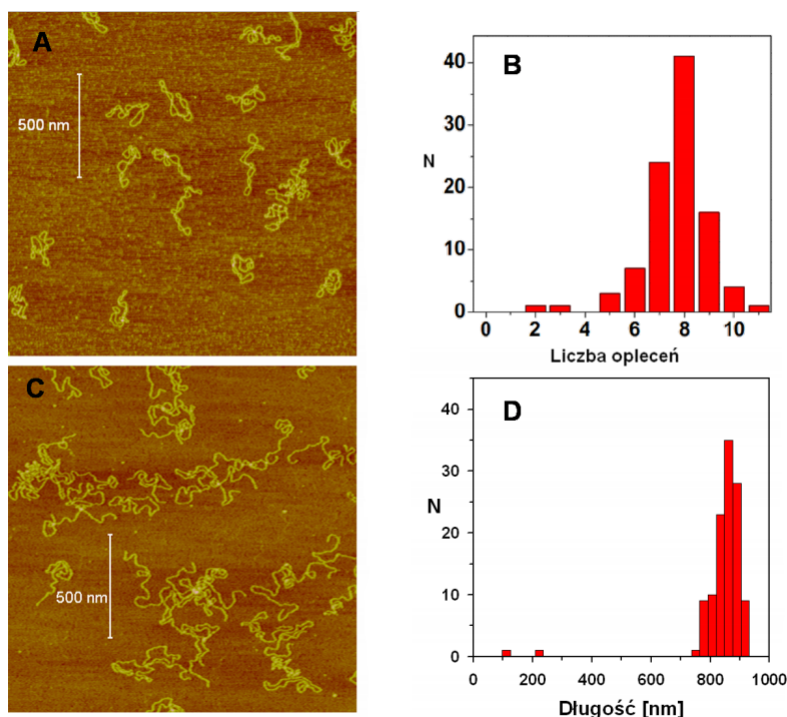
Jako podłoże do inkubacji wykorzystywano szkło, na powierzchni któ-

regu naparowane zostało złoto (200 Å) na podłożu z chromu (20 Å). Przed doświadczeniem ok 50 µl buforu z DNA nanoszono na powierzchnię złota i inkubowano przez całą noc, zabezpieczając przed wyschnięciem. Szkiełko następnie naklejano na żelazny krążek, umieszczano na przetworniku piezoelektrycznym i nakrywano komórką cieczową, uzupełniając niedobór buforu. Wykonano również próby inkubacji na powierzchni świeżo zdartej miki funkcjonalizowanej za pomocą MgCl<sub>2</sub>. O ile uzyskano dzięki temu zwiększenie częstotliwości podczepiania, to znacznie rzadziej obserwowano siły większe niż 100 pN i większość uchwyconych molekuł DNA zrywała się przed osiągnięciem przejścia denaturacyjnego.

Do zbadania linearyzacji za pomocą enzymu, stopnia zanieczyszczenia oraz superskręcenia plazmidu wykorzystano obrazowanie w trybie kontaktowym za pomocą mikroskopu sił atomowych Multimode IIIa firmy Veeco (Rys. 6.2). Plazmidy superskręcone i zlinearyzowane, umieszczone w buforze PBS o stężeniu 137 mM NaCl nanoszone były na świeżo odsłoniętej warstwie miki i inkubowane przez 5 minut. Następnie powierzchnię miki delikatnie spłukano i osuszono. Obrazowanie wykonał dr Yong Jiang z Single-Molecule Force Spectroscopy Lab.

Wykorzystując uzyskane obrazy AFM dokonano pomiaru długości zlinearyzowanych molekuł i zliczenia ilości przepleceń w plazmidach. Analiza statystyczna wykazuje, że przy tym stężeniu jonów w plazmidach występuje zwykle 9 przepleceń, natomiast po rozcięciu plazmidu uzyskujemy DNA liniowe o długości 860 nm. Weryfikacji próbek dokonano także przy wykorzystaniu elektroforezy żelowej.

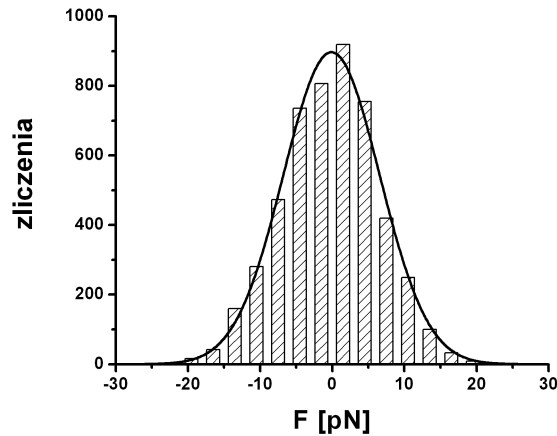
We wszystkich pomiarach siłowych wykorzystano mikrobilki typu Microlever C (MLCT-AUHW) firmy Veeco (obecnie Bruker), o długości ok. 320 µm i kształcie trójkąta. Przed eksperymentem wykonywano kalibrację mikrobilek metodą termiczną (Podrozdział 3.2), uzyskując wartości z zakresu 0.015-0.019 N/m. Ponieważ dla DNA przejście OS występuje dla określonej siły 65 pN, może ono służyć do kontroli metody kalibracyjnej [121]. W celu oszacowania stosowanej metody kalibracji wybrano z pomiarów na zlinearyzowanym pUC18 10 krzywych, które można było jednoznacznie zidentyfikować jako pochodzące z rozciągania molekuł bez ograniczenia rotacji i gdzie długość plateau odpowiadała 70-80% długości konturowej, co świadczyło o tym, że rozciąganie odbywało się jedynie przy niewielkich odchyłkach od pionu i wpływ efektu kąta na pomiar siły był znikomy. Średnia wartość siły przejścia OS dla tych krzywych wynosi  $65.3 \pm 1.1$  pN, co stanowi bardzo dobrą zgodność z danymi literaturowymi (Rozdział 4) i świadczy, że



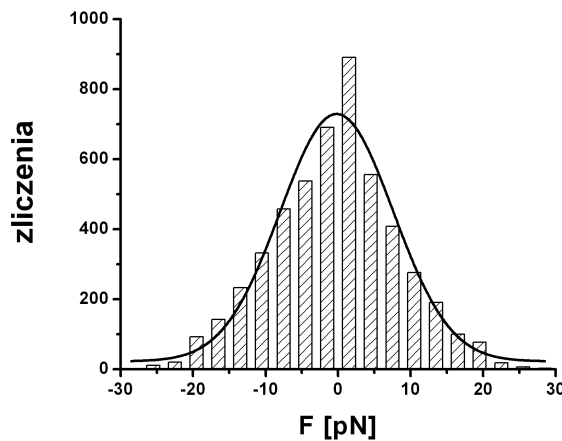
Rysunek 6.2. Obrazowanie plazmidu pUC18 za pomocą AFM - forma superskręcona (A) i zlinearyzowana (C). Wykorzystując 21 zarejestrowanych obrazów AFM dla każdego rodzaju próbek wykonano zliczanie ilości przepleceń w próbkach superskręconych oraz pomiary długości zlinearyzowanych molekuł. Obrazy A, B i C zaadaptowane z [120]

metoda kalibracji jest poprawna. Jednocześnie jednak uwzględnić trzeba, że zmiany temperatury, zakłócenia akustyczne lub niedokładne wyznaczenie czułości wynikłe z zanieczyszczenia podłoża mogą prowadzić do nieznacznego zawyżenia lub obniżenia wartości stałej sprężystości podczas niektórych eksperymentów. Poziom drgań termicznych dla stosowanych mikrobelki, przy wykorzystaniu filtra dolnoprzepustowego o częstotliwości granicznej 500Hz wynosił 6.5pN RMS dla instrumentu zbudowanego w Duke University i 8.6 pN RMS dla instrumentu zbudowanego w Uniwersytecie Mikołaja Kopernika (Rys. 6.3). Stanowi on niepewność pomiaru siły w naszych eksperymentach. Różnice w rozdzielczości pomiaru sił między zastosowanymi instrumentami można uznać za pomijalne.

Poprzez opuszczanie głowicy za pomocą śruby mikrometrycznej doprowadzano do kontaktu mikrobelki z podłożem z siłą ok. 1 nN i utrzymywano go, pozwalając na wytworzenie niespecyficznych wiązań między ostrzem a DNA. Następnie uruchamiano podprogram, który wykonywał ruch przetwornikiem piezoelektrycznym i oddalał próbkę od mikrobelki na odległość ok. 300 nm, a potem ponownie doprowadzał do kontaktu. Ruch ten wykonywany



A



B

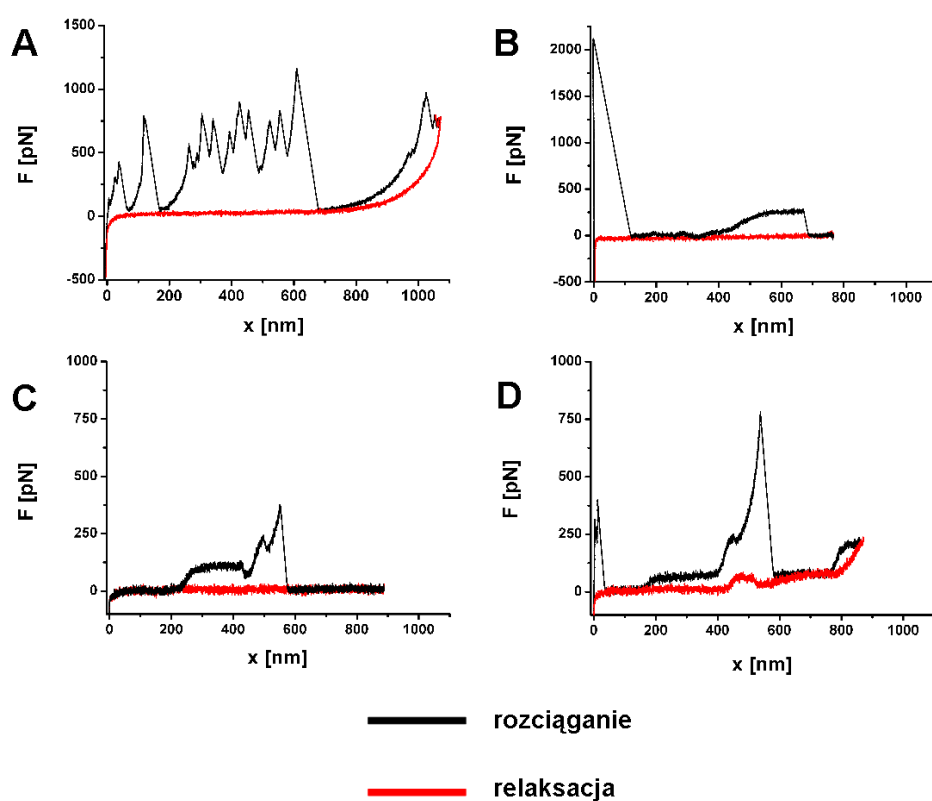
Rysunek 6.3. Histogram szumu termicznego mikrobilki typu Microlever C zarejestrowany w buforze, w dużej odległości od powierzchni, przy zastosowaniu filtrowania dolnoprzepustowego dla częstotliwości granicznej 500Hz przy wykorzystaniu instrumentu zbudowanego w Duke University (A) i Uniwersytecie Mikołaja Kopernika (B). Odchylenie standardowe wynosi odpowiednio  $\sigma_A = 13.4 pN$  i  $\sigma_B = 15.6 pN$ .

był ze stałą szybkością 400 nm/s. W wyniku otrzymywano krzywą siłową, którą zapisywano, jeśli można było zidentyfikować cechy charakterystyczne dla mechaniki pojedynczej molekule DNA. W sytuacji, gdy po rozciągnięciu i relaksacji molekule nadal podczepiona była do ostrza, oddalano o kilkanaście nm próbkę w celu uniknięcia kontaktu z powierzchnią przy następnym pomiarze. Postępowanie takie umożliwia wykonywanie nawet setek kolejnych cykli pomiaru rozciągania i relaksacji na tej samej molekule DNA.

## 6.2. Wyniki

Zebrano 206 krzywych siłowych z próbek superskręconego i 206 krzywych ze zlinearyzowanym plazmidu. Pod uwagę brano tylko te krzywe, które wy-

kazywały obecność przejścia OS i przynajmniej początek drugiego plateau. Odrzucono krzywe, które sugerowały rozciąganie więcej niż jednej molekuly jednocześnie, czyli te które po odzepieniu wykazywały rozciąganie kolejnego obiektu, jak również te, które posiadały wielokrotne przejście OS (Rys. 6.4). Z krzywych tych ponadto wyselekcjonowano podzbiory 20 przypadków z próbek superskręconych i 50 z próbek zlinearyzowanych, w których obecny był pełny cykl rozciągania i relaksacji, umożliwiającą obserwację histerezy. Poprzez analizę porównawczą danych z obu rodzajów próbek dokonamy próby identyfikacji krzywych przedstawiających deformację struktury superhelikalnej w superskręconym plazmidzie.



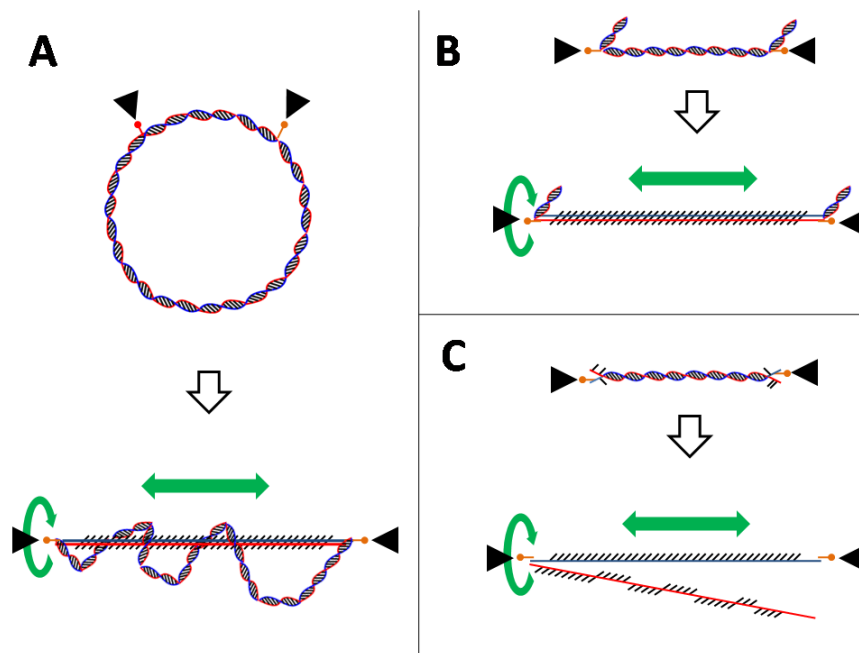
Rysunek 6.4. Przykłady krzywych zarejestrowanych na próbkach plazmidowych, które nie zostały włączone do analizy. Były to krzywe, które nie wykazywały cech charakterystycznych dla DNA (A), krzywe w których nie było zakończenia przejścia OS (B), krzywe wykazujące obecność więcej niż jednego przejścia OS (C) oraz takie, w których po odzepieniu rozciąganej molekuly wciąż pozostawał zaczepiony obiekt (D).

O ile oparcie eksperymentu o wiązanie niespecyficzne umożliwia podczepianie molekul kolistych, to stanowiło jednocześnie największą jego trudność ze względu na brak stałych i określonych punktów podczepienia. Nawet

w przypadku DNA liniowego uzyskać można krzywe siłowe o różnym charakterze w zależności od tego, czy podczepione ono jest za jedną czy dwie nici lub też powstałe w wyniku rozciągania wielu molekuł. W przypadku plazmidów znaczenie ma również miejsce podczepienia na jego obwodzie. Aby uzyskać krzywą odzwierciedlającą rozciąganie dwóch skręconych ze sobą molekuł DNA konieczne jest uchwycenie plazmidu dokładnie w połowie, za końce pętli. Łatwo jednak zauważyć, że możliwe są również inne sytuacje. Jeśli punkty podczepienia dzielić będą plazmid na nierówne części, to sytuacja przypominać będzie rozciąganie dwóch molekuł różnej długości, a w efekcie krzywa siłowa powinna ukazywać dwa przejścia OS. Jednak jeśli rozciągany fragment stanowi mniej niż 40% całego obwodu plazmidu pUC18, czyli 360 nm, to wówczas nawet gdy rozciągany fragment ulegnie przejściu OS, to wciąż będzie krótszy niż pozostały, nie podlegający naprężeniu fragment (Rys. 6.5). Fragment ten nie będzie miał wpływu na krzywą siłową, a tym samym zaobserwować powinniśmy tylko jedno plateau. Ponadto, jeśli nawet punkty podczepienia dzielić będą plazmid na dwie równe części, ale nie będą znajdować się w pętlach plektonemicznych lecz w obszarze skręcenia, to wówczas podczas jego rozciągania superhelisa ulegnie rozwinięciu i sytuacja przypominać będzie równoległe rozciąganie dwóch molekuł.

Największą część danych, zarówno pochodzących z próbek plazmidowych jak i zlinearyzowanych stanowią krzywe, które zgodnie z wcześniejszymi badaniami wykonanymi dla molekuł liniowych można zidentyfikować jako pochodzące z sytuacji, gdy rozciągana molekula nie ma ograniczonej topologii, czyli z plateau na poziomie ok. 65 pN i ostrym początkiem przejścia OS (Rys. 6.6). Z pozoru sytuacja taka nie powinna się zdarzyć w przypadku nieuszkodzonego plazmidu, który z założenia ma ograniczoną topologię i uzyskać powinniśmy wyłącznie krzywe z przejściem OC na poziomie 110 pN. Jednak w trakcie rozciągania fragmentu plazmidu uchwyconego za jeden nukleotyd rozciągany fragment może podlegać rozwijaniu poprzez rotację wiązania pary zasadowej, a zmiana jego  $T_w$  kompensowana będzie przez zwijanie pozostałej części molekuly (Rys. 6.5). Aby mogło dojść do podwyższenia siły przejścia OS topologia musi bowiem być ograniczona w rozciągającym fragmencie, który jednak w opisywanej sytuacji nie stanowi całej molekuly. Ponieważ jednak w takiej konfiguracji pełne rozdzielenie nici jest utrudnione, to można spodziewać się, że krzywa posiadać będzie plateau na poziomie ok. 65 pN, jednak wykazywać będzie ograniczoną histerezę, podobnie jak miało to miejsce podczas rozciągania konstruktu DNA zastosowanego w eksperymencie [95]. Wśród pięciu krzywych, w których można zaobserwować relaksację,

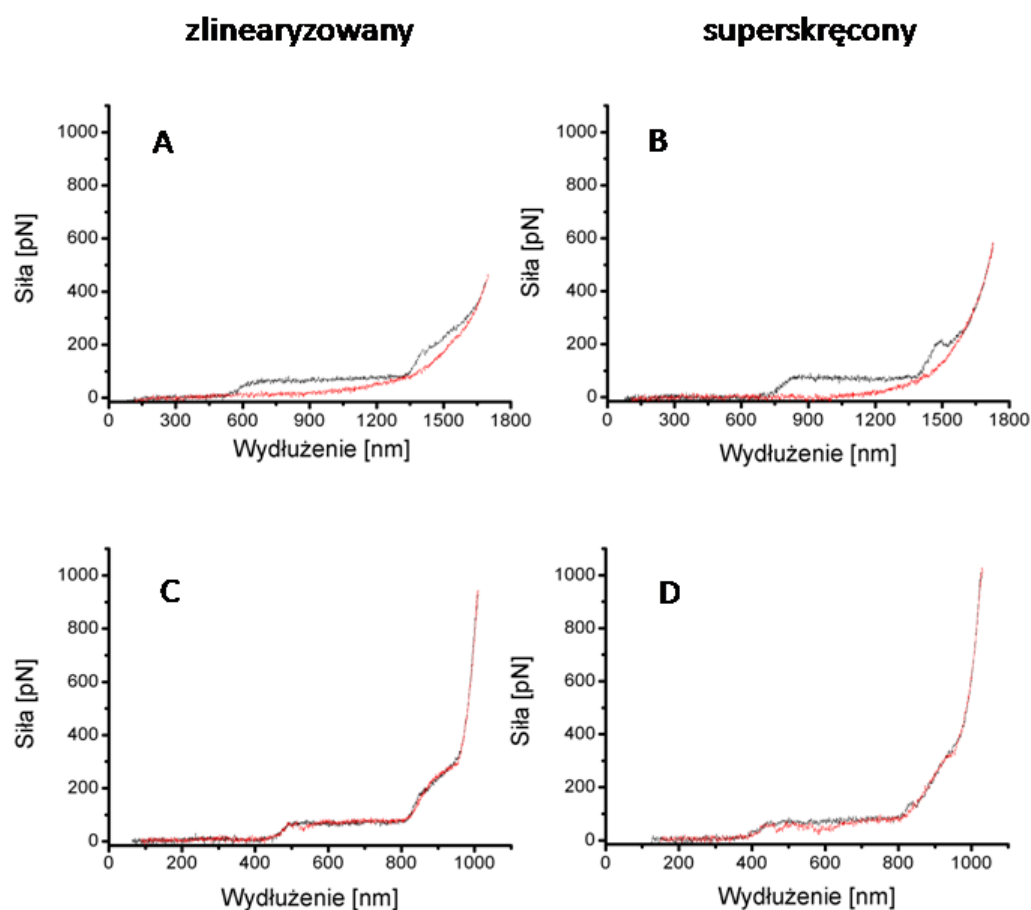




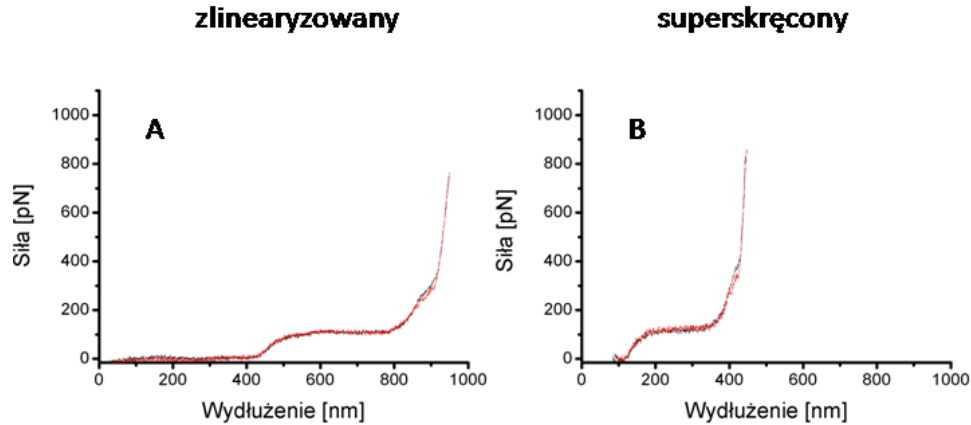
Rysunek 6.5. Rozciąganie fragmentu kolistego DNA. Jeśli rozciągany fragment stanowi mniej niż 40% obwodu całego plazmidu to nawet po zwiększeniu długości o 70% w wyniku przejścia OS dłuższy fragment nie będzie miał wpływu na krzywą siłową. Jeśli istnieje możliwość rotacji wiązania w punkcie podłączenia, to możliwe będzie rozwijanie rozciąganego fragmentu a skręceniu ulegnie dłuższy fragment (A). Również w DNA liniowym miejsce podłączenia molekuly może zdecydować, czy ulegnie ono jedynie rozwinięciu (B), czy też dojdzie także do rozdzielenia nici (C).

pochodzących z próbek plazmidowych i posiadających plateau na poziomie ok 65 pN jedynie jedna posiada znaczącą histerezę, z przejściem do formy jednoniciowej po denaturacji. Ponieważ długość rozciąganego DNA w tym przypadku przekraczała 450 nm, czyli długość plazmidu pUC18 w formie superskręconej, musimy przyjąć, że krzywa ta jest wynikiem rozciągania formy zlinearyzowanej. Możliwą przyczyną linearyzacji było uszkodzenie powstałe podczas procesu oczyszczania plazmidu lub też rozcięcie dokonane przez igłę AFM. Przycinanie molekuł DNA za pomocą AFM obserwowane było w badaniach Paula Hansmy [122]. Krzywe z przejściem OS na poziomie ok. 65 pN i nie wykazujące znaczącej histerezy obecne były również w próbkach DNA zlinearyzowanego. Krzywe te mogły pochodzić z rozciągania DNA, zaczepionego w ten sposób, że pozostały fragment nie podlegający rozciąganiu nie rozplata się i jest w stanie utrzymać obie nici mimo rozwinięcia.

Krzywe, które odpowiadały sytuacji w której topologia rozciąganego fragmentu jest ograniczona poprzez obuniciowe podłączenie, z przejściem OS na poziomie 110 pN i jedynie niewielką histerezą również występowały w obu rodzajach próbek (Rys. 6.7). Podobnie jak w poprzednim przypadku,



Rysunek 6.6. Najliczniej reprezentowane krzywe siłowe zarejestrowane dla pUC18 superskręconego i zlinearyzowanej próbki kontrolnej. Przejście OS na poziomie 65 pN świadczy, że w przypadkach tych topologia nie była ograniczona w rozciągającym fragmencie. Przypadki, gdy histereza rozciągania i relaksacji jest znaczna i dochodziło do pełnej denaturacji zaobserwowano w próbkach zlinearyzowanych (A), natomiast w próbkach superhelikalnych zaobserwowano jedynie jeden taki przypadek (B). W przypadkach tych molekula posiadała zapewne uszkodzenia. Krzywe wykazujące jedynie minimalną histerezę i sugerujące rozciąganie bez ograniczenia topologii i możliwości pełnej denaturacji pojawiały się w obu próbkach (C i D).

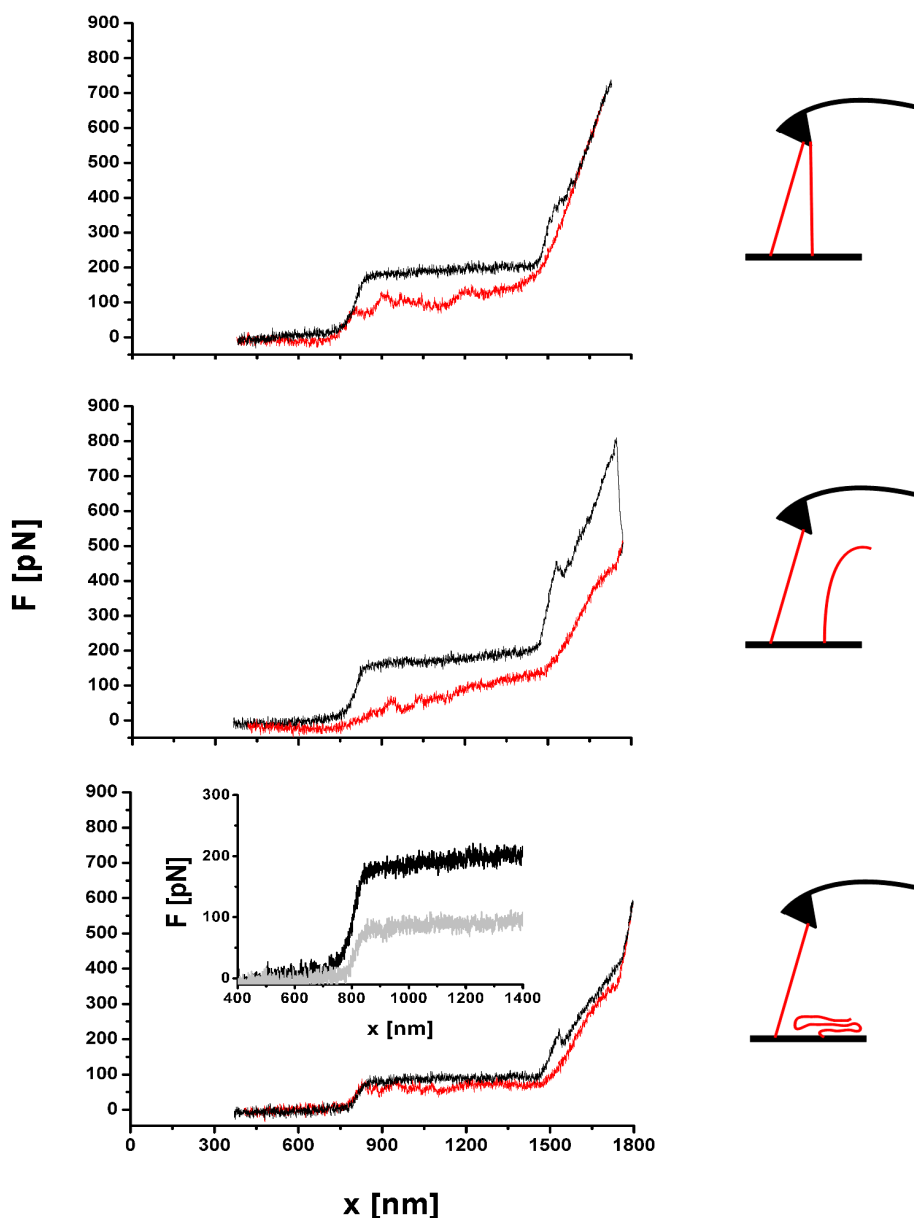


Rysunek 6.7. Krzywe siłowe posiadające przejście OS na poziomie 110 pN i nie wykazujące histerezy, zidentyfikowane jako pochodzące z molekuł o ograniczonej topologii.

krzywe takie można uzyskać podczas rozciągania plazmidu, gdy rozciągany fragment jest na tyle krótki, by pozostała jego część nie miała wpływu na krzywą siłową.

Pomimo że opisane przypadki stanowiły dominującą część zgromadzonych danych, to jednak zaobserwowano też wiele krzywych, gdzie siła przejścia OS przekraczała, niekiedy nawet wielokrotnie, siły uzyskiwane podczas rozciągania molekuł o ograniczonej topologii. Jakkolwiek trudno znaleźć ich jednoznaczną interpretację (Rys. 6.9), to przyjąć można, że jest to wynik sytuacji, w których dojdzie do uchwycenia dwóch lub więcej molekuł DNA. Dochodzi wówczas do zwielokrotnienia siły koniecznej do przejścia OS, co zaobserwowano w pierwszych badaniach z wykorzystaniem sond światłowodowych w postaci krzywej posiadającej dwa przejścia OS [87]. Pierwsze z tych przejść jest na poziomie 65 pN, natomiast drugie zachodzi dla sił dwukrotnie większych -  $65\text{pN} + 65\text{pN} = 130\text{pN}$ . W opisanej sytuacji rozciągane molekuły miały różną długość co prowadziło do wyraźnego rozdzielania przejść OS dla każdej molekuły. Można się jednak spodziewać, że sytuacja taka byłaby trudniejsza do zidentyfikowania, gdyby molekuły miały zbliżoną długość. W moim eksperymencie udało się zaobserwować taką sytuację (Rys. 6.8). W sekwencji krzywych początkowo obserwowano krzywą o przejściu OS na poziomie 160 pN, o częściowej histerezie. Po kilkukrotnym rozciągnięciu nastąpiło odziespienie, jednak krzywa powrotna wskazywała, że nie było ono całkowite. Kolejne krzywe cechowało plateau na poziomie 80 pN i nieznaczna histereza. W czasie kolejnych cykli doszło do ostatecznego odziespienia i utraty molekuły. Na podstawie tej sekwencji ustalić można, że plateau OS w pierwszej krzywej jest, podobnie jak w przypadku dwóch podziespionych w ten sam

sposób molekuł, efektem sumowania sił  $80\text{pN} + 80\text{pN} = 160\text{ pN}$ . Na podstawie kształtu krzywych można przyjąć, że rozciągane były molekuly bez ograniczenia topologii, a obserwowana wyższa wartość siły (80 pN zamiast 65 pN) wynika z niepewności kalibracji mikrobilki. Długość plateau przejścia OS w trakcie całej sekwencji odpowiadała ok. 70% długości początkowej, zatem wpływ efektu kąta może zostać wykluczony.



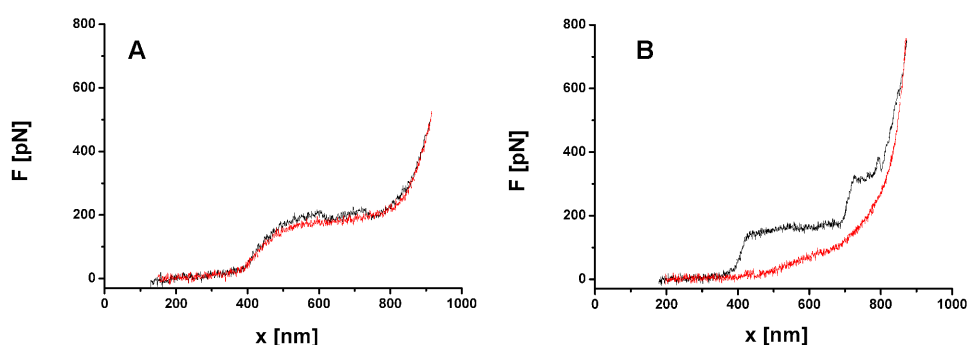
Rysunek 6.8. Sekwencja krzywych uzyskanych dla próbki pUC18 zlinearyzowanego, ukazująca równoległe rozciąganie dwóch molekuł zbliżonej długości, odczepienie jednej z nich i następnie rozciąganie jednej pozostałej molekuly. Na wykresie wewnętrznym zestawiono przejścia OS. Poziom siły przejścia OS dla dwóch rozciąganych molekuł jest dwukrotnie większy niż w przypadku jednej.

Z sekwencji tej wywnioskować można, że w przypadku gdy rozciągane

równoległe molekuly mają zbliżoną długość, to uzyskana krzywa siłowa będzie trudna do jednoznacznej identyfikacji. Przypominać bowiem będzie typową krzywą uzyskiwaną przy rozciąganiu DNA, jednak mierzone będą nietypowe wartości siły przejścia OS. Przyjąć można, że analogiczna sytuacja będzie mieć miejsce również w przypadku równoległego rozciągania molekuł o ograniczonej topologii. Tym samym można spodziewać się krzywych, które w wyniku sumowania sił przejść OS będą miały plateau na poziomie:

- $65+65=130$  pN
- $65+110=175$  pN
- $110+110=220$  pN

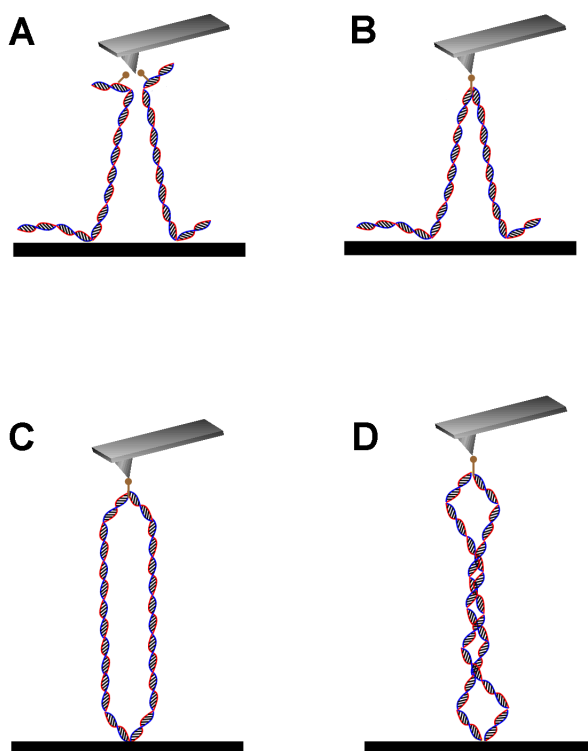
Można zatem uznać, że krzywe, których plateau przekracza znacznie poziom 110 pN to efekt równoległego rozciągania przynajmniej dwóch molekuł, które miały zbliżoną długość i odczepiły się w tej samej chwili z punktu widzenia skali czasowej eksperymentu. Dokładną interpretację poszczególnych przypadków utrudnić mogą niepewności kalibracji stałej sprężystości i efekt kąta, jak również możliwość uszkodzenia badanych molekuł przez proces przygotowania próbki lub ostrze mikrobilki AFM. Tym też można wyjaśnić znaczne rozbieżności w siłach przejścia OS i histerezie w zarejestrowanych krzywych.



Rysunek 6.9. Przykłady krzywych pochodzących z próbek superskręconego plazmidu, w przypadku których nie można znaleźć jednoznacznej interpretacji i o sile przejścia plateau z zakresu 110 - 220 pN. Wśród krzywych tych nie można znaleźć typowych cech charakterystycznych i pochodzą prawdopodobnie z rozciągania kilku molekuł.

Można również wysunąć hipotezę, że aby uzyskać opisaną powyżej sytuację nie jest konieczne uchwycenie dwóch oddzielnych molekuł. Pojedyncza liniowa molekula może zostać uchwycona i rozciągnięta w postaci pętli, gdy jest to kolisty plazmid, lub też gdy wolne końce przyłączone są do podłoża. Ponieważ rozciągane fragmenty będą zbliżonej długości i podlegać będą jednakowym naprężeniom, to rozciągane helisy nie będą mogły się obracać. Zatem sytuacja ta odpowiadać będzie rozciąganiu dwóch topologicznie ograniczonych molekuł, prowadząc do plateau na poziomie 220 pN. Ponie-

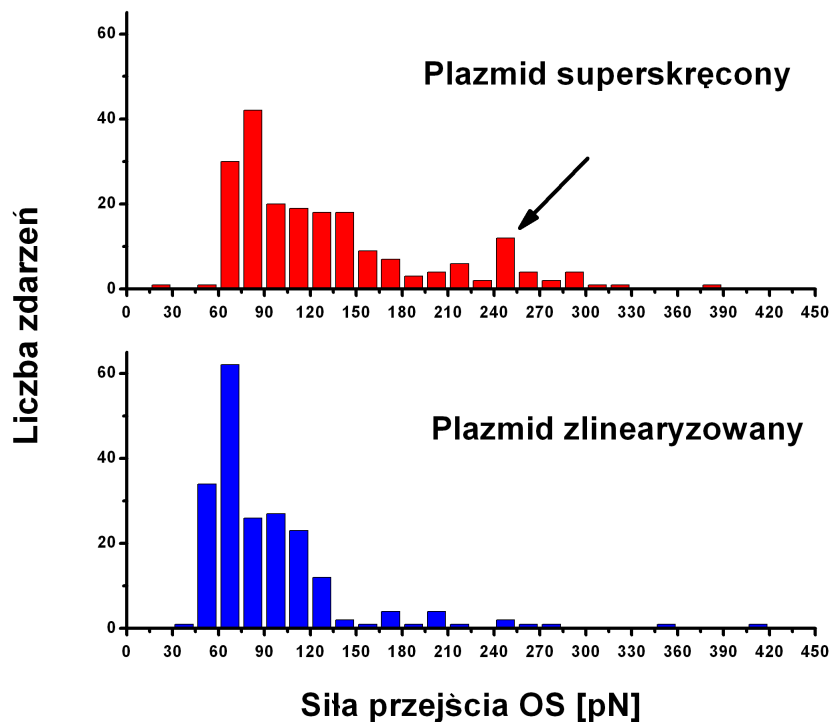
waż pętla zaczepiona jest tylko za jedno wiązanie wolnej pary zasadowej, jego zerwanie oznaczałoby całkowitą utratę molekuly, zamiast stopniowego odzepiania poszczególnych molekuł jak miało to miejsce w przypadku sekwencji z rysunku 6.8. W szczególnym przypadku za końce pętli plektonemu może zostać rozciągnięty kolisty plazmid, co również wiązać się będzie z topologicznym ograniczeniem obu rozciąganych fragmentów i przejściem OS zachodzącym dla siły nie mniejszej niż 220 pN (Rys. 6.10).



Rysunek 6.10. Sytuacje, w których podczas rozciągania DNA liniowego (A,B) i kolistego (C,D) dochodzić może do powstania krzywych o plateau przejścia OS występującym dla sił przekraczających 110 pN.

Celem ilościowego porównania różnic w mechanice molekuł kolistych superskręconych i zlinearyzowanych oraz zidentyfikowania krzywych pochodzących z rozciągania struktury superhelikalnej w plazmidzie zmierzono średnie siły plateau przejścia OS dla wszystkich 206 krzywych (Rys. 6.11). Następnie zestawiono ich wartości w histogramach. Można zauważyć, że w przypadku próbek zlinearyzowanych zarejestrowano jedynie niewielką liczbę krzywych z przejściem OS zachodzącym dla sił przekraczających 130 pN. W próbkach superhelikalnych mamy do czynienia z przeciwną sytuacją - dla znacznej części krzywych przejście to znajduje się w zakresie 130-330 pN. W szczególności histogram uzyskany dla próbek superskręconych wykazuje obecność pików dla sił z zakresu 240-250 pN, który jest zupełnie nieobecny

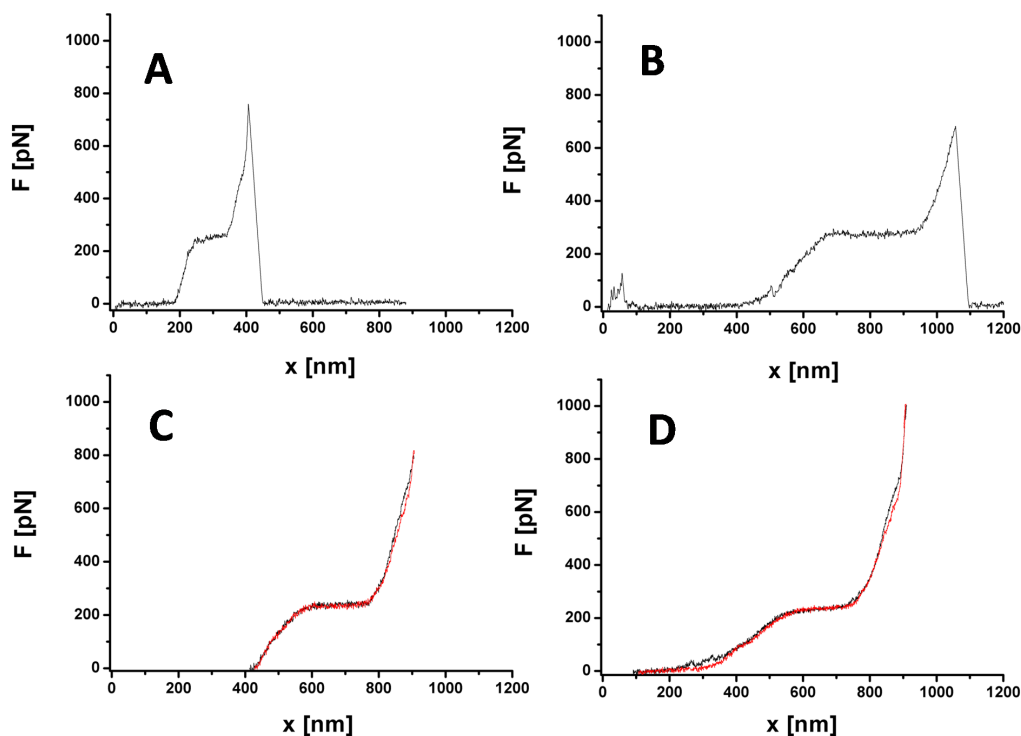
w próbkach zlinearyzowanych. Krzywe (26 przypadków) odpowiedzialne za powstanie tego piku obserwowane były poza jednym przypadkiem wyłącznie w próbkach plazmidów superskręconych i na potrzeby następującej analizy nazwiemy ją grupą S.



Rysunek 6.11. Histogramy sił przejścia OS w krzywych zarejestrowanych dla próbek plazmidu superskręconego i zlinearyzowanego. Można zauważyć, że dla próbek superskręconych występuje przesunięcie ku wyższym siłom. Strzałka wskazuje obecność piku, którego brak w przypadku próbek zlinearyzowanych. Jego obecność sugeruje, że w doświadczeniach dla próbek superskręconych rozciągane były struktury DNA wykazujące znacznie większy opór niż spotykane w próbkach z DNA liniowym.

Krzywe z grupy S (Rys. 6.12) posiadają przejście OS zachodzące dla bardzo wysokich sił (średnia wartość przejścia OS - 250 pN przy odchyleniu standardowym średniej 6 pN). W przypadkach, gdy udało się pomyślnie zaobserwować ich relaksację, obecna jest jedynie minimalna histereza. Krzywych takich nie obserwowano w żadnym z poprzednich badań DNA liniowego przy użyciu spektroskopii mechanicznej. Brak takich krzywych w próbkach plazmidów, które zostały zlinearyzowane sugeruje, że to superskręcenie jest cechą kluczową do ich zaobserwowania. Gdyby krzywe te były wyłącznie rezultatem rozciągania kilku molekuł, to wówczas obserwowane byłyby w obydwu rodzajach próbek. Należy też zwrócić uwagę na fakt, że zakres sił przejścia OS w tych krzywych znacznie przekracza wartość 220 pN, stanowiącą proste podwojenie siły mierzonej przy rozciąganiu dwóch molekuł z

ograniczoną topologią. Sugeruje to, że krzywe te powstały w wyniku rozciągania konfiguracji molekuł DNA, w której odkształceniu ulegają nie tylko podwójne helisy DNA, ale pojawia się również dodatkowy opór, którego przezwyciężenie wymaga siły ok. 30 pN.



Rysunek 6.12. Krzywe występujące wyłącznie w próbkach superskręconych, charakteryzujące się przejściem OS zachodzącym dla sił w zakresie 240-260pN.

### 6.3. Analiza danych

Ilościowo sztywność rozciąganych polimerów można oszacować poprzez dopasowanie do krzywej siłowej (Rys. 6.13A,B) modelu sprężystości makromolekuł (Podrozdz.1.4). Dla piętnastu wyselekcjonowanych krzywych z grupy S jak również typowych krzywych pochodzących z rozciągania DNA liniowego wykonano zatem dopasowanie modelu eWLC (wzór 1.21). Uzyskane wartości długości persystentnej  $l_p$  i moduły sprężystości polimeru na jednostkę jego długości  $\Phi$  zebrano w tabeli 6.1. Dopasowanie to, z racji znacznego w naszej metodzie szumu termicznego obarczone było znacznym rozrzutem wyników, zwłaszcza w przypadku próbek superhelikalnych. Jednak można zauważyć, że krzywe z grupy S posiadały znacznie mniejszą długość persystentną (8.88 nm) od krzywych DNA liniowego (50.13 nm).

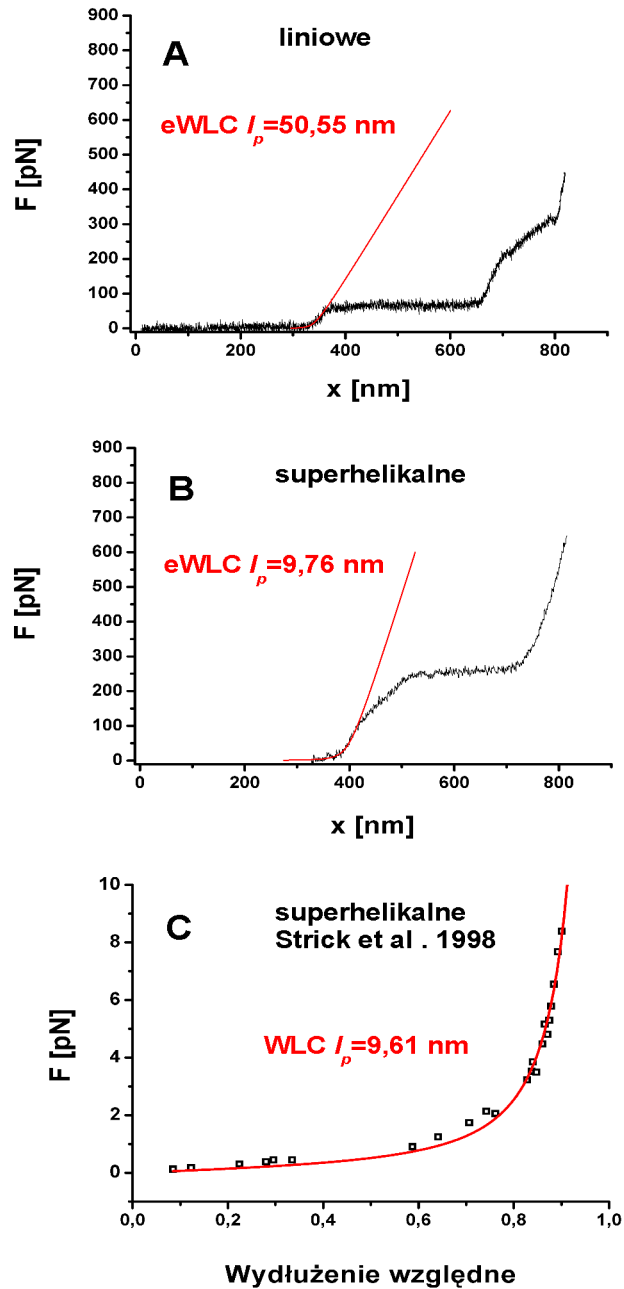


We wcześniejszej pracy [11] dane pochodzące z rozciągania superhelikalnego DNA również wskazywały na mniejszą długość persystentną niż w przypadku zarówno jednej jak i dwóch molekuł (Rys. 4.12) jednak nie wyznaczono jej wartości dla tego przypadku. Celem porównania dokonano ekstrakcji danych programem PlotDigitizer (<http://plotdigitizer.sourceforge.net/>) i wykonano dopasowanie modelu WLC (wzór 1.18). Uzyskany wynik długości persystentnej 9.61 nm jest w bardzo dobrej zgodności z wynikami uzyskanymi dla krzywych z grupy S. Potwierdza to naszą hipotezę, że krzywe z grupy S powstały w wyniku rozciągania pojedynczych molekuł DNA w postaci zamkniętych plazmidów, uchwyconych za pętle plektonemu, w wyniku czego deformacji ulega struktura superhelikalna. Analiza tych krzywych pozwoli zatem na zbadanie właściwości mechanicznych struktury superhelikalnej DNA, co stanowi temat tej pracy doktorskiej.

Lp.	Superskręcone		Zlinearyzowane	
	$l_p$ [nm]	$\Phi$ [pN]	$l_p$ [nm]	$\Phi$ [pN]
1	4,43	687,4	49,89	441,5
2	3,55	731,7	49,67	860,9
3	3,55	731,7	49,67	485,7
4	9,76	1707,3	49,67	397,4
5	16,41	798,2	50,55	750,6
6	12,42	886,9	50,55	772,6
7	13,3	1263,9	53,42	794,7
8	13,3	776,1	49,89	501,1
9	14,3	777,1	50,11	490,1
10	8,87	1330,4	49,67	468
11	9,53	1042,1	50,11	309,1
12	2,65	1986,8	49,67	264,9
13	8,61	3973,5	49,67	375,3
14	8,61	3973,5	49,67	618,1
15	3,97	3311,3	49,67	353,2
Wart. średnia	8,88	1598,53	50,13	525,55
Odchylenie st.	3,58	927,97	0,55	155,89

Tablica 6.1. Wartości długości persystentnej  $l_p$  i moduły sprężystości polimeru na jednostkę jego długości  $\Phi$  uzyskane z dopasowania modelu eWLC do krzywych siłowych rozciągania superskręconych i zlinearyzowanych plazmidów.

Dopasowanie modelu eWLC dostarcza także informacji o właściwościach mechanicznych struktury superhelikalnej w zakresie entalpicznym. W porównaniu z krzywymi powstałymi w wyniku rozciągania DNA liniowego rozciągana struktura superhelikalna wykazuje ok. trzykrotnie większą sztywność (Tabela 6.1). Ponieważ przy jej rozciąganiu konieczna jest również wyższa



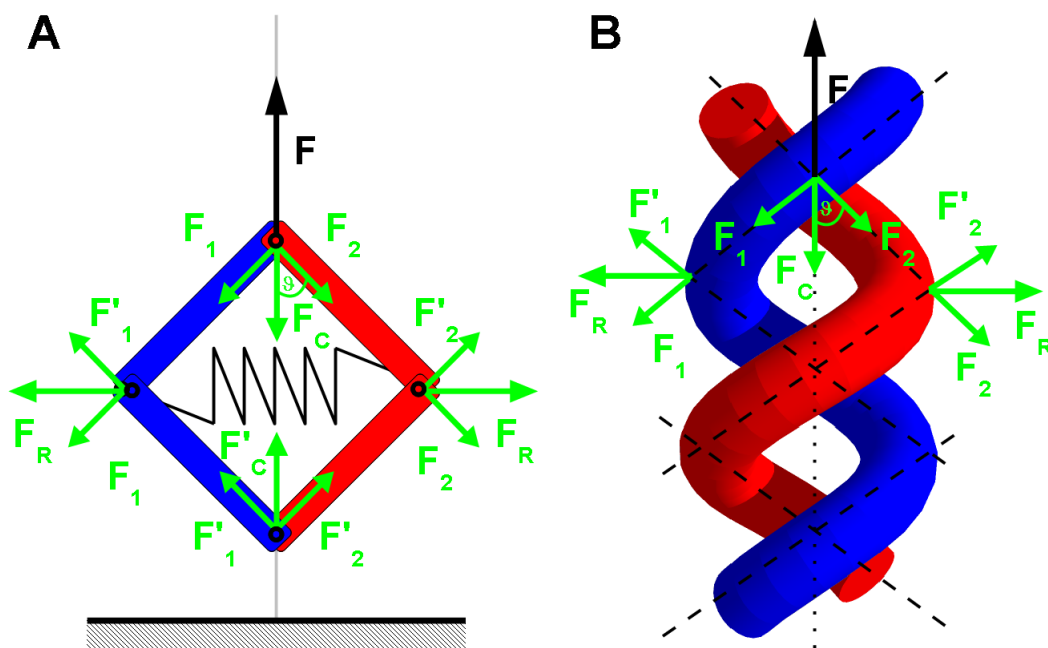
Rysunek 6.13. Przykłady dopasowania modelu eWLC do krzywej pochodzącej z rozciągania DNA liniowego (A) i superskręconego (B) oraz porównawcze dopasowanie za pomocą modelu WLC (C), wykonane dla krzywej siłowej struktury superhelikalnej uzyskanej za pomocą pułapki magnetycznej [11].

siła aby wymusić przejście OS, można tym samym wnioskować, że struktura superhelikalna zwiększa odporność DNA na odkształcenia.

Można postawić hipotezę, że u podłoża zwiększonej odporności na odkształcenie stoi zaciskanie się helisy podczas jej rozciągania. Obserwacja ta stanowi podstawę konstrukcji nici i lin. Skręcenie pozwala bowiem nie tylko na wysnuwanie nici o nieograniczonej długości przy wykorzystaniu krótkich fragmentów przędzy, ale również zwiększa jej wytrzymałość w porównaniu z równoległe rozciąganymi włóknami. W wyniku zaciskania rozciąganej helisy, znacząca część siły rozciągającej rozpraszana jest poprzez zgniatanie włókien i tarcie między nimi. Mimo, że sytuacja ta znana jest z obiektów makroskopowych, to pewną analogię do tej sytuacji można zauważyć również w przypadku rozciągania pojedynczej molekuly superhelikalnego plazmidu. Rozciągana w mikroskopie sił atomowych superhelisa, po wyjściu z zakresu sił entropowych i wyprostowaniu, będzie się zaciskać, a fragmenty DNA będą do siebie zbliżane. Zatem odkształcane będą nie tylko obydwie fragmenty molekuly, ale deformacjom podlegać będzie również struktura superhelikalna. Ponieważ jednak łańcuch fosforanowo - cukrowy posiada niezwykle silny ładunek (Podrozdział 1.3), to zbliżane do siebie fragmenty będą się odpychać. Dokonując uproszczenia i traktując superhelisę jako konstrukcję złożoną z czterech przegubowo połączonych prętów, której deformacja powoduje ściśkanie sprężyny można przeprowadzić analizę wektorową tej sytuacji (Rys. 6.14). Kąt  $\vartheta$  o wierzchołku pomiędzy prętami stanowi tutaj odpowiednik kąta oplecenia (*braiding angle*), którego wartość uzależniona jest od liczby opleceń w superhelisie [11, 12]. Siła odpychania  $F_C$  poprzez projekcję na kierunek pręta/polimeru w kierunku siły rozciągającej  $F$  ma wartość

$$F_C = F_R \operatorname{ctg}(\vartheta) \quad (6.1)$$

i ma względem niej przeciwny kierunek. Zatem wytworzeniu naprężenia DNA koniecznego do wymuszenia przejścia OS przeciwstawiać się będzie wzajemne odpychanie helis. W efekcie mierzona siła przejścia OS w rozciąganim superhelikalnym DNA powinna być większa niż w przypadku równoległego rozciągania dwóch molekuł, czyli 220 pN. Jest to zgodne z wynikami doświadczalnymi, ponieważ średnia siła tego przejścia dla krzywych specyficznych dla próbek superhelikalnych wynosi 250 pN zamiast spodziewanych 220 pN.



Rysunek 6.14. Uproszczona analiza rozkładu sił w skręconych i rozciąganych molekułach DNA. Zaciskanie superhelisy (dla uproszczenia przedstawionej jako helisa), której elementy odpychają się może być przybliżone jako konstrukcja przegubowo połączonych prętów, zaciskająca się pod wpływem siły rozciągającej  $F$ .

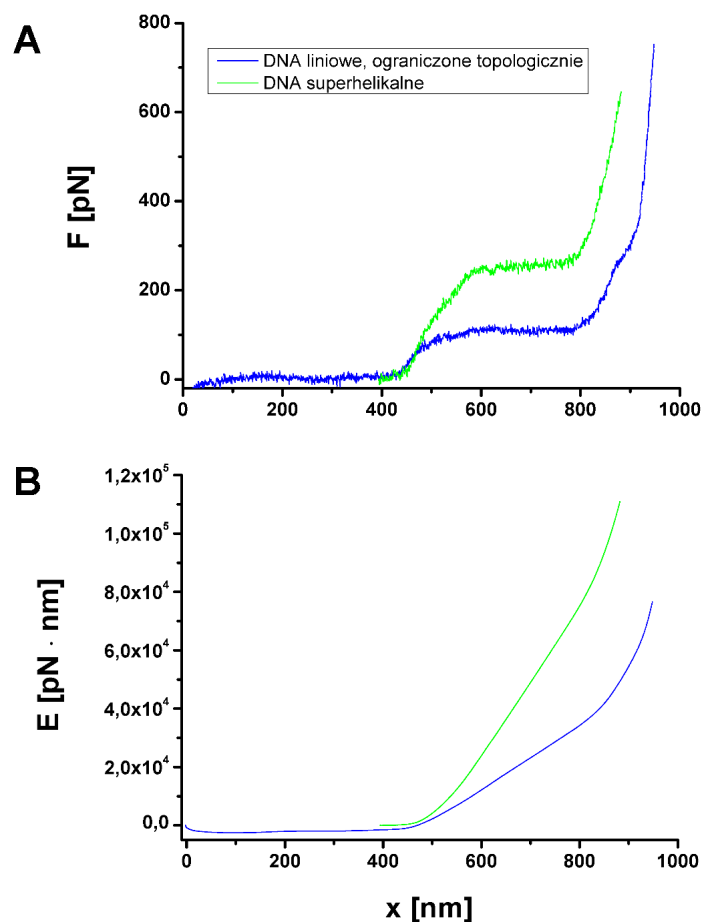
Wykorzystując fakt, że przejście OS zachodzi dla ściśle określonej siły możemy oszacować siłę oddziaływania między molekułami DNA. Będzie to różnica wartości siły przejścia OS dla dwóch ograniczonych topologicznie i rozciąganych równoległe molekuł i średnią wartością siły przejścia OS w zarejestrowanych krzywych. Różnica ta wynosi 30 pN i stanowi miarę oddziaływania między fragmentami DNA, zmierzonego po raz pierwszy w naszym eksperymencie na poziomie pojedynczych molekuł. Ponieważ nie jest możliwe ustalenie, jakie wartości przyjmuje kąt oplecenia  $\alpha$ , przyjmiemy że  $F_C = F_R$ . Zakładając, że oddziałują ze sobą połówki plazmidu, stanowiące fragmenty o długości 450 nm uzyskamy siłę na jednostkę długości DNA 0.07 pN/nm. Można porównać ten rezultat z wynikami uzyskanymi w pomiarach makroskopowych sił oddziaływań DNA-DNA za pomocą metody ciśnienia osmotycznego [41, 37], przedstawionych na Rys. 1.6 (gdzie  $10^{-3}N/m = 1pN/nm$ ). Uzyskany w naszych pomiarach wynik 0.07 pN/nm mieści się w mierzonych zakresach sił. W pomiarach makroskopowych oddziaływanie takie mierzono w molekułach zbliżonych na odległość międzyosiowa ok 6.7 nm. Stanowi to bardzo dobrą zgodność z pomiarami szacującymi efektywną średnicę DNA na 6 nm w buforze 100 mM NaCl (Rys. 1.5), czyli w warunkach bardzo zbliżonych do naszego eksperymentu. Sugeruje to, że rozciągana struktura superhelikalna silnie zaciska się podczas rozciągania w wyniku czego dupleksy

znajdują się w minimalnej dopuszczalnej w danych warunkach odległości. Rezultaty te potwierdzają również wyniki uzyskane podczas skręcania dupleksów DNA za pomocą pułapek magnetycznych i w symulacjach [12]. W wyniku wielokrotnego skręcania dupleksów DNA 6 nm stanowiło minimalną odległość międzyosiową, jaką udało się uzyskać przed uformowaniem plektoneumu. Zastosowana po raz pierwszy metoda pomiaru pozwala zatem uzyskać rzeczywiste wartości sił oddziaływań DNA-DNA w zakresie sił niedostępnym dla innych metod stosowanych w biofizyce pojedynczych molekuł.

## 6.4. Wnioski

Zastosowana w naszych badaniach spektroskopia mechaniczna AFM superskręconych plazmidów może zostać zatem z powodzeniem wykorzystana jako metoda badań mechaniki superskręconego DNA i oddziaływań międzymolekularnych na poziomie pojedynczych molekuł. W dalszych badaniach uzasadnione będzie wykorzystanie topoizomeraz w celu kontroli stopnia skręcania plazmidu jak również wykonanie eksperymentu w różnych roztworach lub też ich modyfikacja w trakcie trwania eksperymentu. Konieczna jest także próba oszacowania kąta oplecenia za pomocą obrazowania AFM. W naszych badaniach wykorzystaliśmy obecność siły przejścia OS jako charakterystycznej wielkości umożliwiającej analizę porównawczą. Analiza w zakresie sił powyżej przejścia OS jest jednak również możliwa dzięki zastosowaniu modeli sprężystości polimerów.

Uzyskane dzięki naszej metodzie wyniki wnoszą również cenne informacje do zrozumienia organizacji materiału genetycznego w komórkach. Struktura superhelikalna stawia większy opór odkształceniom mechanicznym niż DNA liniowe czy nawet dwie równoległe molekuly. W szczególności zaś, większa siła konieczna jest dla wystąpienia przejścia OS. Ostatnie eksperymenty dostarczyły znaczących dowodów, że podczas tego przejścia dochodzi do denaturacji DNA [94]. Jeśli scałkujemy krzywe siłowe rozciągania to możemy uzyskać pracę  $E$  wykonaną na molekułe podczas jej odkształcenia (Rys 6.15). Jak można zauważyć, ograniczenie topologii i skręcenie molekuł znacznie podwyższa energię potrzebną do denaturacji. Dzięki temu materiał genetyczny jest dodatkowo chroniony przed uszkodzeniem w wyniku naprężeń jakie mogą oddziaływać na komórki bakteryjne.



Rysunek 6.15. Zestawienie krzywych siłowych powstałych z rozciągania DNA liniowego ograniczonego topologicznie i DNA superhelikalnego (A) i pracy koniecznej do deformacji obu tych obiektów (B) uzyskanej poprzez scałkowanie krzywych z wykresu (A). Porównywane molekuly posiadały zbliżoną długość.

Ponadto, obecność niewielkiej histerezy we wszystkich zarejestrowanych krzywych siłowych wskazuje, że w stosunkowo niewielkiej skali czasowej naszego eksperymentu (ok. 1 ms) DNA o ograniczonej topologii i skręcone potrafi stosunkowo łatwo i szybko odtworzyć swoją pierwotną strukturę, bez konieczności angażowania enzymów. Obie powyższe obserwacje sugerują, że obecność skręcenia w plazmidach i chromosomach bakteryjnych nie służy wyłącznie organizacji materiału genetycznego w małej objętości, ale jest istotna także dla jego ochrony.

Zwiększona odporność struktury superhelikalnej na odkształcenie może być również wykorzystana w bionanotechnologii. DNA, z racji obecności narzędzi do modyfikacji swojej struktury w postaci enzymów jak również unikalnej cechy jaką jest możliwość zapisu informacji o jego kształcie w nim samym stanowi znakomity materiał konstrukcji nanostruktur takich jak tzw. origami DNA. Wykorzystanie odpychania między helisami DNA poprzez two-

rzenie topologicznych struktur może poprawić ich wytrzymałość. Warto też zauważyć, że sztywność takich elementów można kontrolować poprzez zmiany topologiczne za pomocą topoizomeraz bądź też stężenie jonów w roztworze.

## Podsumowanie

Rezultaty mojej pracy doktorskiej można podsumować następująco:

1. Zbudowano mikroskop sił atomowych wyspecjalizowany do przeprowadzania pomiarów w trybie spektroskopii mechanicznej. Instrument ten z powodzeniem został wykorzystany zarówno w pomiarach opisanych w pracy doktorskiej jak i w badaniach innych biomolekuł.
2. Pozytywnie zweryfikowano możliwość pomiarów mechanicznych struktury superhelikalnej DNA za pomocą AFM dzięki wykorzystaniu superskręconych plazmidów. Ta nowa metoda umożliwia pomiary właściwości mechanicznych takich struktur w zakresie sił niedostępnym dla stosowanych dotychczas metod.
3. Uzyskane wyniki wskazują, że struktura superhelikalna, poprzez wymuszanie oddziaływań między naładowanymi i odpychającymi się fragmentami DNA w czasie jej rozciągania, zwiększa odporność materiału genetycznego na odkształcenie i denaturację.
4. Wykorzystano fakt występowania przejścia OS dla charakterystycznej siły do oszacowania oddziaływania między fragmentami DNA w wyniku zaciskania superhelisy. Uzyskane wartości są zgodne z wynikami uzyskanymi wcześniej za pomocą technik makroskopowych. Metodę tę można wykorzystać zatem do pomiarów oddziaływań DNA- DNA na poziomie pojedynczych molekuł.

Założenia pracy doktorskiej można zatem uznać za zrealizowane.



## Summary

The aim of this PhD thesis is to use the AFM force spectroscopy technique for an experimental evaluation of mechanical properties of braided DNA in a high force regime and measure DNA-DNA interactions at the single molecule level.

DNA mechanics is vital in cellular and viral packing of the genetic material and in all important DNA transitions such as replication, transcription, recombination and repair [1]. Experiments performed with magnetic [49] and optical [90] tweezers, glass microneedles [87] and AFM [100] already answered many questions regarding behavior of DNA in packing of genetic material and its behavior in key cellular processes. When stretched beyond its contour length dsDNA shows a plateau of rapid 70% elongation with only a minute increase in force. While for topologically unconstrained DNA this transition appears at 65 pN, a larger, 110 pN force is required when the rotation is inhibited by double strand attachment [95]. The origin of this plateau is explained either as a transition from B to hypothetical elongated S DNA form [90] or partial melting of strands [96]. If dsDNA is stretched even further, a second, non-equilibrium transition can be observed, which leaves the molecule fully melted [100]. Single strand attached or nicked DNA molecules cannot reanneal after melting and exhibits full hysteresis upon relaxation [95]. Measured forces and lengths can significantly vary, as AFM force spectroscopy of long polymers can exhibit a so called angle effect [82].

With magnetic tweezers [123] and rotating micropipettes [91] it was possible to twist single DNA molecules. Depending on applied force it was possible to cause buckling and develop plectonemes or force a transition to a hypothetical P form of DNA [106]. This research however was performed for linear DNA, which only very rarely appears in living organisms. To be successfully stored in cells, genetic material has to be tightly packed in structures like chromosomes. With the help of histone proteins Eucariota form solenoids, while genetic material in Procariota is twisted and forms plectonemes. Thus, whenever DNA is deformed in living cell, it is always deformed as either a protein-DNA complex or a braided plectoneme, not as a single linear molecule. Only a limited research on force spectroscopy of

braided DNA was done. A theoretical investigation by Marko [105] showed that braiding should significantly increase the free energy of a stretched polymer and that the mutual intermolecular Coulomb repulsion would govern mechanical properties of those structures for large number of braid nodes or very high forces. Force spectroscopy experiments with braided DNA was limited to magnetic tweezers [11, 12]. Two DNA molecules were anchored to magnetic bead and twisted hundreds of times by rotation of magnetic field. Different regimes of braiding and plectoneme forming were observed, as more turns were applied. Force extension experiments [11] show a higher persistence length for braid than for two molecules stretched in parallel.

While magnetic tweezers allow a superb control of a twisted molecule its pulling force is limited to 10 pN . Therefore, the effect of braiding on the overstretching transition cannot be examined using this approach. In this PhD thesis we used an atomic force microscope (AFM), to investigate for the first time, how braiding of two DNA duplexes affects their mechanical properties in a high force regime. For this study we used a naturally existing braided structure found in a supercoiled bacterial plasmid pUC18. Control experiments, necessary to find force curves resulting from stretching of braided DNA involved pulling experiments on linearized plasmid samples. AFM is ideal for these stretching measurements because its tip can easily pick up even closed circular DNA due to simple nonspecific binding of DNA to the tip. In addition, AFM is capable of far higher pulling forces [8] as compared to other single-molecule techniques and nonspecific attachment is known to withstand forces even beyond 500 pN [99]. A detailed description covering a construction of an AFM instrument particularly suited for single molecule pulling experiments is included.

When stretched between a gold substrate and an AFM tip, supercoiled plasmids revealed a variety of elasticity profiles. Most of these profiles showing prominent overstretching transitions were similar to the profiles that can be obtained on linearized plasmids. Two linearized plasmids stretched in parallel are expected to produce the overstretching transition no larger than 220 pN. However, a significant number of force-extension curves of the supercoiled plasmids revealed the overstretching transition with a force of approximately 250 pN that was absent in the pool of recordings obtained on the linearized plasmids. Additionally the persistence length obtained from those curves was in excellent agreement with values resulting from braided DNA stretching data obtained with magnetic tweezers. Thus, we conclude that in those cases a braided DNA structure was stretched.

We hypothesize that the increased stiffness and overstretching transition force result from the mutual repulsion of highly charged DNA in a braided structure which is forced into contact during stretching. Thus, the surplus overstretching transition force of 30 pN must be the value of this repulsion. Being the equivalent of 0.07 pN/nm per DNA length, it is in excellent agreement with results of DNA-DNA interactions obtained with the osmotic stress technique [37] and DNA effective diameter measurements [2].

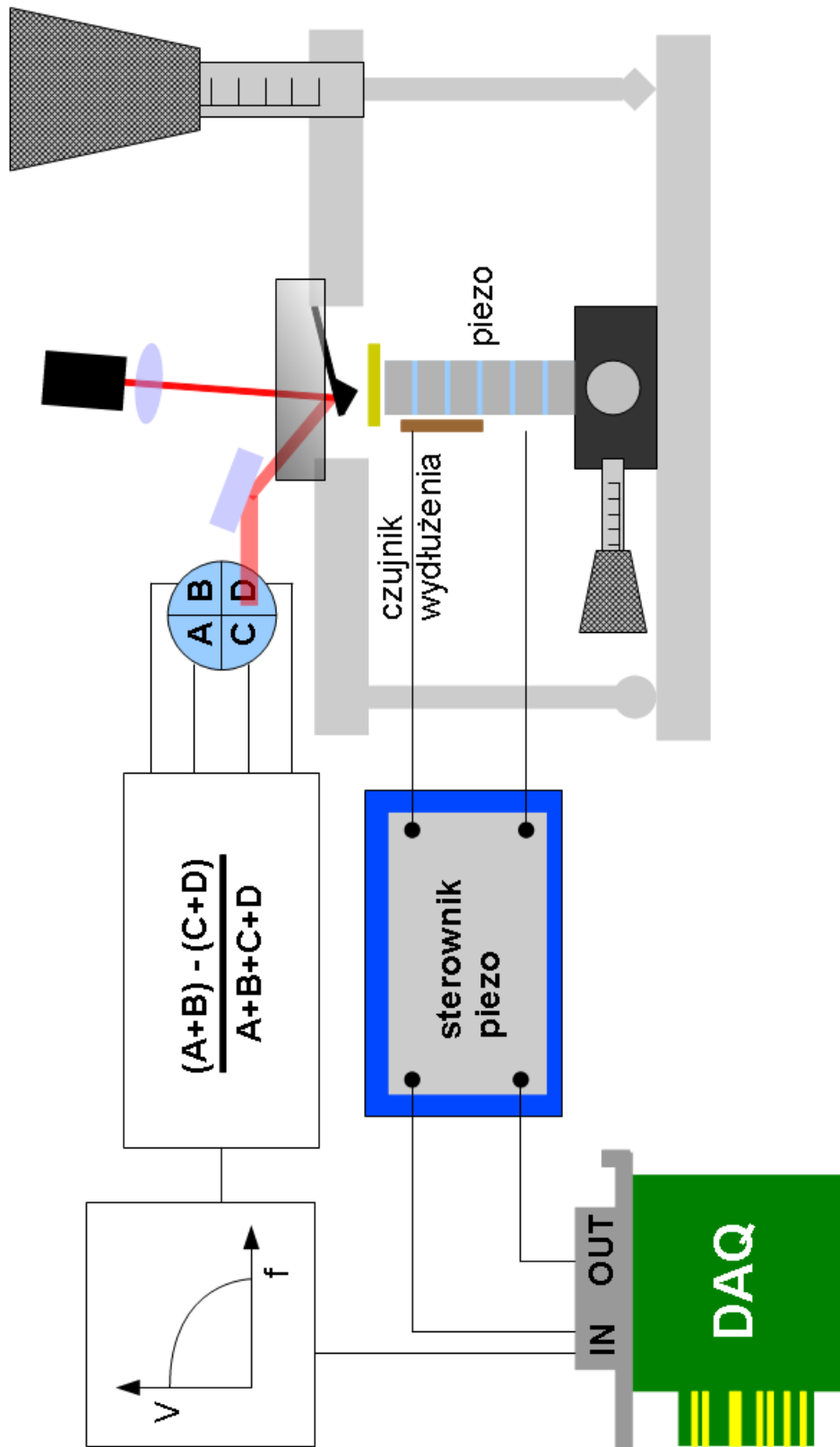
Those results suggest, that topology can significantly influence mechanical properties of material even at the molecular level. The supercoiling induced braiding present in plasmids and bacterial chromosomes, besides enabling efficient packing, seems to protect the genetic material from deformation and denaturation. Additionally, the method of an AFM force spectroscopy proved to be well suited for probing mechanics of molecular structures much more complex than the typically studied linear polymers.

## Dodatki

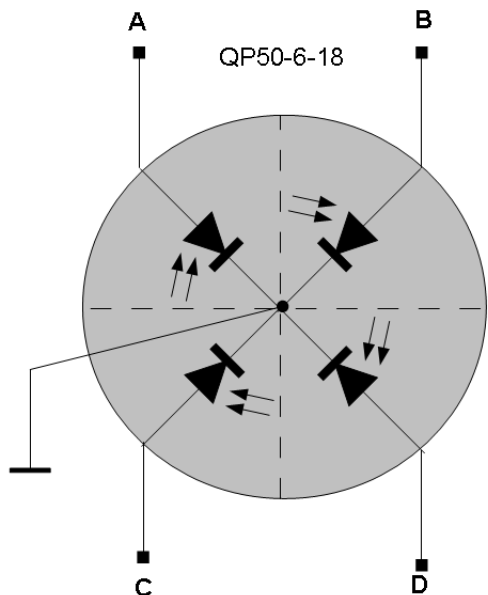
## Dodatek A Metody spektroskopii mechanicznej

	AFM	Pałapki optyczne	Pałapki magnetyczne	Mikroigły	Sondy biomembranowe
Zakres sił (pN)	2.5-10 <sup>4</sup>	0.1-150	0.01-100	0.1	0.5-1000
Zakres ruchu (nm)	0.5-10 <sup>4</sup>	0.1-10 <sup>5</sup>	5-10 <sup>5</sup>	10-10 <sup>4</sup>	10-10 <sup>4</sup>
Rozdzielczość przestrzenna (nm)	0.5-1	0.1-2	5-10	10	10
Rozdzielczość czasowa (s)	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-4</sup> -0.1	>0.1	>0.001
Rozmiar sondy (μm)	100-250	0.25-5	0.5-5	50-500	10
Szttywność sondy (pN/nm)	10-10 <sup>5</sup>	0.005-1	10 <sup>-3</sup> -10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-3</sup> -1000	10 <sup>-2</sup> - 10
Zalety	Szeroki zakres sił, możliwość rozciągania krótkich molekuł	Duża rozdzielczość	Możliwość wprowadzania sił skręcających	Szeroki zakres sił, możliwość wprowadzania sił skręcających	Możliwość zmiany stałej sprężystości w trakcie eksperymentu
Ograniczenia	Niska rozdzielczość siłowa, duża sztywność mikrobeleka, efekt kąta	Ogrzewanie próbki, wymagana wysoka przezroczystość i jednorodność próbki	Niskie siły	Skomplikowane wytwarzanie sond, niedostępne komercyjnie	niedostępne komercyjnie
Zastosowania	Rozwijanie białek, wymuszanie zmian konformacyjnych DNA, polisacharydów, zrywanie wiązań, mapy siłowe	Spektroskopia mechaniczna DNA niskich sił	Topologia DNA, obserwacja działania topoisomeraż	Wymuszanie zmian konformacyjnych DNA przy jednoczesnym skręcaniu i rozciąganiu	Zrywanie wiązań

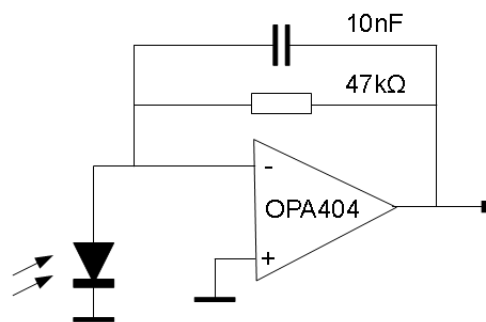
Dodatek B Schemat konstrukcyjny mikroskopu sił atomowych wyspecjalizowanego do pomiarów siłowych



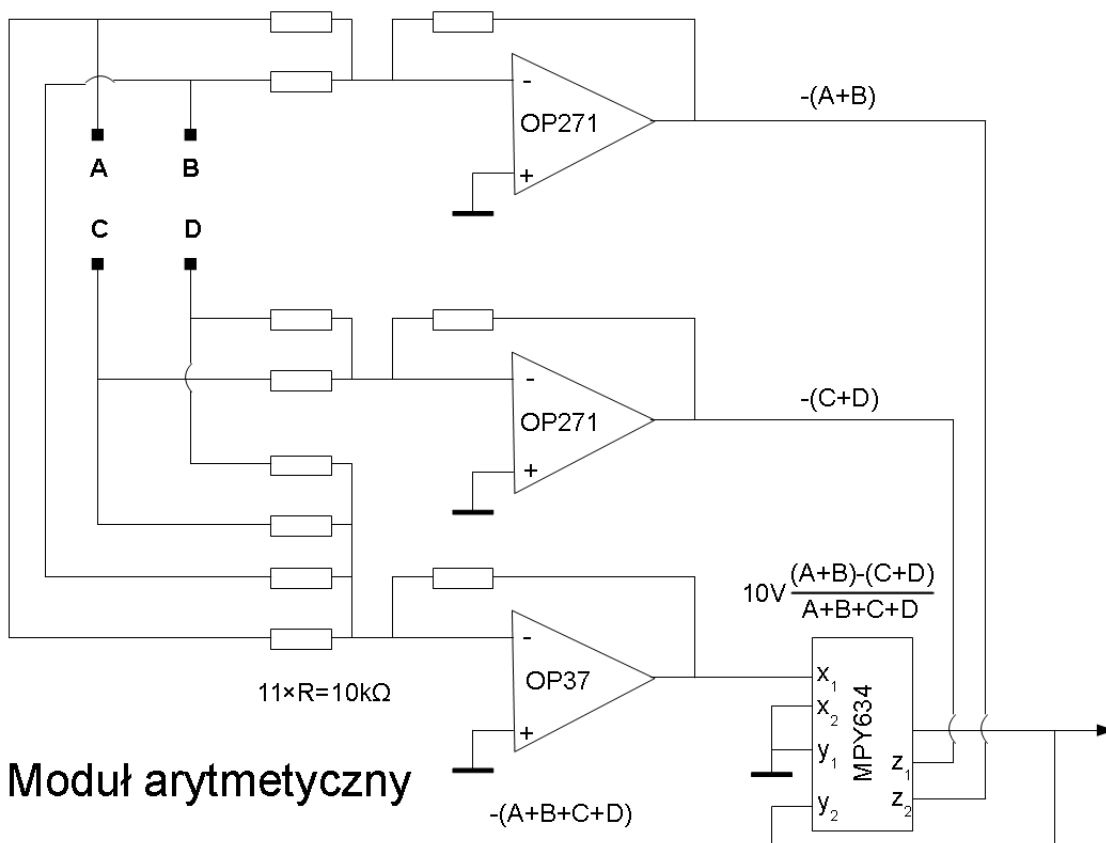
## Dodatek C Schemat elektroniczny modułu arytmetycznego



Fotodioda kwadrantowa



Konwerter I/U



Moduł arytmetyczny

## Bibliografia

- [1] C. Bustamante, Z. Bryant, S. Smith, Ten years of tension: single-molecule DNA mechanics, *Nature* 421 (6921) (2003) 423–427.
- [2] A. Bates, A. Maxwell, DNA topology, Oxford University Press, USA, 2005.
- [3] R. Feynman, There's plenty of room at the bottom, *Engineering and Science* 23 (5) (1960) 22–36.
- [4] X. Li, W. Chang, Y. Chao, R. Wang, M. Chang, Nanoscale structural and mechanical characterization of a natural nanocomposite material: the shell of red abalone, *Nano Letters* 4 (4) (2004) 613–617.
- [5] S. Douglas, H. Dietz, T. Liedl, B. Högberg, F. Graf, W. Shih, Self-assembly of DNA into nanoscale three-dimensional shapes, *Nature* 459 (7245) (2009) 414–418.
- [6] E. Andersen, M. Dong, M. Nielsen, K. Jahn, R. Subramani, W. Mamdouh, M. Golas, B. Sander, H. Stark, C. Oliveira, et al., Self-assembly of a nanoscale DNA box with a controllable lid, *Nature* 459 (7243) (2009) 73–76.
- [7] X. Han, Z. Zhou, F. Yang, Z. Deng, Catch and release: DNA tweezers that can capture, hold, and release an object under control, *Journal of the American Chemical Society* 130 (44) (2008) 14414–14415.
- [8] K. Neuman, A. Nagy, Single-molecule force spectroscopy: optical tweezers, magnetic tweezers and atomic force microscopy, *Nature Methods* 5 (6) (2008) 491–505.
- [9] A. Noy, Handbook of molecular force spectroscopy, Springer Berlin, 2008.
- [10] C. Prévost, M. Takahashi, R. Lavery, Deforming DNA: from physics to biology, *ChemPhysChem* 10 (9-10) (2009) 1399–1404.
- [11] T. Strick, J. Allemand, D. Bensimon, V. Croquette, Behavior of supercoiled DNA, *Biophysical Journal* 74 (4) (1998) 2016–2028.
- [12] G. Charvin, A. Vologodskii, D. Bensimon, V. Croquette, Braiding DNA: Experiments, simulations, and models, *Biophysical Journal* 88 (6) (2005) 4124–4136.
- [13] J. Strzelecki, A. Balter, P. E. Marszalek, AFM force spectroscopy of braided DNA, *European Biophysical Journal* 36 (1) (2007) S62.
- [14] J. Tymoczko, J. Berg, L. Stryer, *Biochemistry: a short course*, WH Freeman & Co, 2009.
- [15] J. Tymoczko, J. Berg, L. Stryer, *Biochemia*, Wydawnictwo Naukowe PWN, 2009.



- [16] D. Goodsell, *The machinery of life*, Copernicus Books, 2009.
- [17] J. Watson, F. Crick, M. Wilkins, A. AR, H. Wilson, R. Franklin, R. Gosling, O. Avery, C. MacLeod, M. McCarty, *A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid*, *Nature* 171 (1953) 737–738.
- [18] C. Calladine, *Understanding DNA: the molecule & how it works*, Academic Press, 2004.
- [19] J. Watson, F. Crick, *Genetical Implications of the Structure of Deoxyribonucleic Acid*, *Nature* 171 (4361) (1953) 964–967.
- [20] D. Clark, N. Pazdernik, *Biotechnology: applying the genetic revolution*, Academic Press, 2009.
- [21] R. Dulbecco, M. Vogt, *Evidence for a ring structure of polyoma virus DNA*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 50 (2) (1963) 236.
- [22] J. Vinograd, J. Lebowitz, R. Radloff, R. Watson, P. Laipis, *The twisted circular form of polyoma viral DNA.*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 53 (5) (1965) 1104.
- [23] A. Kornberg, T. Baker, *DNA Replication*. 2nd, WH Freeman, New York:, 1992.
- [24] F. Fuller, *The writhing number of a space curve*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 68 (4) (1971) 815.
- [25] W. L. M. Bryszewska (Ed.), *Biofizyka kwasów nukleinowych dla biologów*, Wydawnictwo Naukowe PWN, 2000.
- [26] W. Gelbart, R. Bruinsma, P. Pincus, V. Parsegian, *DNA-Inspired Electrostatics*, *Physics Today* 53 (2000) 38.
- [27] A. Kornyshev, D. Lee, S. Leikin, A. Wynveen, *Structure and interactions of biological helices*, *Reviews of Modern Physics* 79 (3) (2007) 943.
- [28] A. Cherstvy, *Electrostatic interactions in biological DNA-related systems*, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 13 (2011) 9942–9968.
- [29] D. Stigter, *Interactions of highly charged colloidal cylinders with applications to double-stranded DNA*, *Biopolymers* 16 (7) (1977) 1435–1448.
- [30] A. Brian, H. Frisch, L. Lerman, *Thermodynamics and equilibrium sedimentation analysis of the close approach of DNA molecules and a molecular ordering transition*, *Biopolymers* 20 (6) (1981) 1305–1328.
- [31] S. Shaw, J. Wang, *Knotted DNA rings: probability of formation and resolution of the two chiral trefoils*, *Science* 260 (1993) 533–536.
- [32] V. Rybenkov, N. Cozzarelli, A. Vologodskii, *Probability of DNA knotting and the effective diameter of the DNA double helix*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (11) (1993) 5307.
- [33] L. Gosule, J. Schellman, *Compact form of DNA induced by spermidine*, *Nature* 259 (1976) 333–335.

- [34] H. Strey, R. Podgornik, D. Rau, V. Parsegian, DNA-DNA interactions, *Current Opinion in Structural Biology* 8 (3) (1998) 309–313.
- [35] J. Schellman, N. Parthasarathy, X-ray diffraction studies on cation-collapsed DNA\* 1, *Journal of Molecular Biology* 175 (3) (1984) 313–329.
- [36] V. Bloomfield, DNA condensation, *Current Opinion in Structural Biology* 6 (3) (1996) 334–341.
- [37] K. Kassapidou, J. Van der Maarel, Melting of columnar hexagonal DNA liquid crystals, *The European Physical Journal B-Condensed Matter and Complex Systems* 3 (4) (1998) 471–476.
- [38] R. Podgornik, H. Strey, D. Rau, V. Parsegian, Watching molecules crowd: DNA double helices under osmotic stress, *Biophysical Chemistry* 57 (1) (1995) 111–121.
- [39] D. Rau, B. Lee, V. Parsegian, Measurement of the repulsive force between polyelectrolyte molecules in ionic solution: hydration forces between parallel DNA double helices, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81 (9) (1984) 2621.
- [40] R. Podgornik, D. Rau, V. Parsegian, The action of interhelical forces on the organization of DNA double helices: fluctuation-enhanced decay of electrostatic double-layer and hydration forces, *Macromolecules* 22 (4) (1989) 1780–1786.
- [41] H. Strey, V. Parsegian, R. Podgornik, Equation of state for DNA liquid crystals: fluctuation enhanced electrostatic double layer repulsion, *Physical Review Letters* 78 (5) (1997) 895–898.
- [42] D. Rau, V. Parsegian, Direct measurement of the intermolecular forces between counterion-condensed DNA double helices. Evidence for long range attractive hydration forces, *Biophysical Journal* 61 (1) (1992) 246–259.
- [43] C. Cantor, P. Schimmel, *Biophysical Chemistry: The conformation of biological macromolecules*, WH Freeman & Co, 1980.
- [44] T. Strick, M. Dessinges, G. Charvin, N. Dekker, J. Allemand, D. Bensimon, V. Croquette, Stretching of macromolecules and proteins, *Reports on Progress in Physics* 66 (2003) 1.
- [45] G. Ślósarek, *Biofizyka molekularna. Zjawiska | Instrumenty | Modelowanie*, Wydawnictwo Naukowe PWN, 2011.
- [46] W. Przygocki, A. Włochowicz, *Fizyka polimerów Wybrane zagadnienia*, PWN, 2000.
- [47] J. Marko, S. Cocco, The micromechanics of DNA, *Phys. World* 16 (2003) 37–41.
- [48] G. Bao, Mechanics of biomolecules, *Journal of the Mechanics and Physics of Solids* 50 (11) (2002) 2237–2274.
- [49] S. Smith, L. Finzi, C. Bustamante, Direct mechanical measurements of

- the elasticity of single DNA molecules by using magnetic beads, *Science* 258 (5085) (1992) 1122.
- [50] M. Doi, S. Edwards, *The theory of polymer dynamics*, Oxford University Press, USA, 1988.
- [51] J. Marko, E. Siggia, Stretching DNA, *Macromolecules* 28 (26) (1995) 8759–8770.
- [52] T. Odijk, Stiff chains and filaments under tension, *Macromolecules* 28 (20) (1995) 7016–7018.
- [53] M. Wang, H. Yin, R. Landick, J. Gelles, S. Block, Stretching DNA with optical tweezers, *Biophysical Journal* 72 (3) (1997) 1335–1346.
- [54] Z. Kam, N. Borochoy, H. Eisenberg, Dependence of laser light scattering of DNA on NaCl concentration, *Biopolymers* 20 (12) (1981) 2671–2690.
- [55] V. Rizzo, J. Schellman, Flow dichroism of T7 DNA as a function of salt concentration, *Biopolymers* 20 (10) (1981) 2143–2163.
- [56] W. Taylor, P. Hagerman, Application of the method of phage T4 DNA ligase-catalyzed ring-closure to the study of DNA structure\* 1:: II. NaCl-dependence of DNA flexibility and helical repeat, *Journal of Molecular Biology* 212 (2) (1990) 363–376.
- [57] J. Elias, D. Eden, Transient electric birefringence study of the persistence length and electrical polarizability of restriction fragments of DNA, *Macromolecules* 14 (1981) 410–419.
- [58] S. Diekmann, W. Hillen, B. Morgeneyer, R. Wells, D. Porschke, Orientation relaxation of DNA restriction fragments and the internal mobility of the double helix, *Biophysical Chemistry* 15 (4) (1982) 263–270.
- [59] C. Rivetti, M. Guthold, C. Bustamante, Scanning force microscopy of DNA deposited onto mica: Equilibration versus kinetic trapping studied by statistical polymer chain analysis, *Journal of Molecular Biology* 264 (5) (1996) 919–932.
- [60] J. Bednar, P. Furrer, V. Katritch, A. Stasiak, J. Dubochet, A. Stasiak, Determination of DNA persistence length by cryo-electron microscopy. Separation of the static and dynamic contributions to the apparent persistence length of DNA, *Journal of Molecular Biology* 254 (4) (1995) 579–594.
- [61] G. Binnig, C. Quate, C. Gerber, Atomic force microscope, *Physical Review Letters* 56 (9) (1986) 930–933.
- [62] 2011 Bruker Catalogue, Probes and Accesories.
- [63] G. Meyer, N. Amer, Novel optical approach to atomic force microscopy, *Applied Physics Letters* 53 (1988) 1045.
- [64] S. Alexander, L. Hellems, O. Marti, J. Schneir, V. Elings, P. Hansma, M. Longmire, J. Gurley, An atomic-resolution atomic-force microscope implemented using an optical lever, *Journal of Applied Physics* 65 (1989) 164.
- [65] C. Putman, B. De Groot, N. Van Hulst, J. Greve, A detailed analysis of

- the optical beam deflection technique for use in atomic force microscopy, *Journal of Applied Physics* 72 (1992) 6.
- [66] R. Erlandsson, G. McClelland, C. Mate, S. Chiang, Atomic force microscopy using optical interferometry, *Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films* 6 (1988) 266.
- [67] U. Stahl, C. Yuan, A. de Lozanne, M. Tortonese, Atomic force microscope using piezoresistive cantilevers and combined with a scanning electron microscope, *Applied Physics Letters* 65 (1994) 2878.
- [68] G. Neubauer, S. Cohen, G. McClelland, D. Horne, C. Mate, Force microscopy with a bidirectional capacitance sensor, *Review of Scientific Instruments* 61 (9) (1990) 2296–2308.
- [69] P. Eaton, P. Eaton, P. West, Atomic force microscopy, Oxford University Press, 2010.
- [70] B. Bhushan, Springer Nanotechnology Handbook (2010).
- [71] C. Bustamante, J. Macosko, G. Wuite, Grabbing the cat by the tail: manipulating molecules one by one, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 1 (2) (2000) 130–136.
- [72] H. Clausen-Schaumann, M. Seitz, R. Krautbauer, H. Gaub, Force spectroscopy with single bio-molecules, *Current Opinion in Chemical Biology* 4 (5) (2000) 524–530.
- [73] B. Samori, G. Zuccheri, P. Baschieri, Protein unfolding and refolding under force: methodologies for nanomechanics, *Chemphyschem* 6 (1) (2005) 29–34.
- [74] A. Oberhauser, P. Hansma, M. Carrion-Vazquez, J. Fernandez, Stepwise unfolding of titin under force-clamp atomic force microscopy, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (2) (2001) 468.
- [75] K. Visscher, M. Schnitzer, S. Block, Single kinesin molecules studied with a molecular force clamp, *Nature* 400 (6740) (1999) 184–189.
- [76] P. Hinterdorfer, A. Van Oijen, Handbook of single-molecule biophysics, Springer Verlag, 2009.
- [77] Y. Duf rene, E. Evans, A. Engel, J. Helenius, H. Gaub, D. M ller, Five challenges to bringing single-molecule force spectroscopy into living cells, *Nature Methods* 8 (2) (2011) 123–127.
- [78] E. Florin, V. Moy, H. Gaub, Adhesion forces between individual ligand-receptor pairs, *Science* 264 (5157) (1994) 415.
- [79] J. Sader, J. Chon, P. Mulvaney, Calibration of rectangular atomic force microscope cantilevers, *Review of Scientific Instruments* 70 (1999) 3967.
- [80] J. Hutter, J. Bechhoefer, Calibration of atomic-force microscope tips, *Review of Scientific Instruments* 64 (7) (1993) 1868–1873.
- [81] S. Cook, T. Sch ffer, K. Chynoweth, M. Wigton, R. Simmonds, K. Lang,

- Practical implementation of dynamic methods for measuring atomic force microscope cantilever spring constants, *Nanotechnology* 17 (2006) 2135.
- [82] C. Ke, Y. Jiang, M. Rivera, R. Clark, P. Marszalek, Pulling geometry-induced errors in single molecule force spectroscopy measurements, *Biophysical Journal* 92 (9) (2007) L76–L78.
- [83] M. Rivera, W. Lee, C. Ke, P. Marszalek, D. Cole, R. Clark, Minimizing pulling geometry errors in atomic force microscope single molecule force spectroscopy, *Biophysical Journal* 95 (8) (2008) 3991–3998.
- [84] R. Simmons, J. Finer, S. Chu, J. Spudich, Quantitative measurements of force and displacement using an optical trap, *Biophysical Journal* 70 (4) (1996) 1813–1822.
- [85] F. Amblard, B. Yurke, A. Pargellis, S. Leibler, A magnetic manipulator for studying local rheology and micromechanical properties of biological systems, *Review of Scientific Instruments* 67 (1996) 818.
- [86] A. Ishijima, T. Doi, K. Sakurada, T. Yanagida, Sub-piconewton force fluctuations of actomyosin in vitro, *Nature* 352 (6333) (1991) 301.
- [87] P. Cluzel, A. Lebrun, C. Heller, R. Lavery, J. Viovy, D. Chatenay, F. Caron, DNA: an extensible molecule, *Science* 271 (5250) (1996) 792.
- [88] E. Evans, K. Ritchie, R. Merkel, Sensitive force technique to probe molecular adhesion and structural linkages at biological interfaces, *Biophysical Journal* 68 (6) (1995) 2580–2587.
- [89] C. Bustamante, J. Marko, E. Siggia, S. Smith, Entropic elasticity of lambda-phage DNA, *Science* 265 (5178) (1994) 1599.
- [90] S. Smith, Y. Cui, C. Bustamante, Overstretching B-DNA: the elastic response of individual double-stranded and single-stranded DNA molecules, *Science* 271 (5250) (1996) 795.
- [91] J. Leger, G. Romano, A. Sarkar, J. Robert, L. Bourdieu, D. Chatenay, J. Marko, Structural transitions of a twisted and stretched DNA molecule, *Physical Review Letters* 83 (5) (1999) 1066–1069.
- [92] P. Marszalek, A. Oberhauser, Y. Pang, J. Fernandez, Polysaccharide elasticity governed by chair–boat transitions of the glucopyranose ring, *Nature* 396 (6712) (1998) 661–664.
- [93] I. Schwaiger, C. Sattler, D. Hostetter, M. Rief, The myosin coiled-coil is a truly elastic protein structure, *Nature Materials* 1 (4) (2002) 232–235.
- [94] J. Van Mameren, P. Gross, G. Farge, P. Hooijman, M. Modesti, M. Falkenberg, G. Wuite, E. Peterman, Unraveling the structure of DNA during overstretching by using multicolor, single-molecule fluorescence imaging, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (43) (2009) 18231.
- [95] D. Paik, T. Perkins, Overstretching DNA at 65 pN Does Not Require Peeling from Free Ends or Nicks, *Journal of the American Chemical Society* (2011) 423.

- [96] M. Williams, J. Wenner, I. Rouzina, V. Bloomfield, Effect of pH on the overstretching transition of double-stranded DNA: evidence of force-induced DNA melting, *Biophysical Journal* 80 (2) (2001) 874–881.
- [97] L. Shokri, M. McCauley, I. Rouzina, M. Williams, DNA overstretching in the presence of glyoxal: structural evidence of force-induced DNA melting, *Biophysical Journal* 95 (3) (2008) 1248–1255.
- [98] C. Murade, V. Subramaniam, C. Otto, M. Bennink, Force spectroscopy and fluorescence microscopy of dsDNA–YOYO-1 complexes: implications for the structure of dsDNA in the overstretching region, *Nucleic Acids Research* 38 (10) (2010) 3423.
- [99] H. Clausen-Schaumann, M. Rief, C. Tolksdorf, H. Gaub, Mechanical stability of single DNA molecules, *Biophysical Journal* 78 (4) (2000) 1997–2007.
- [100] M. Rief, H. Clausen-Schaumann, H. Gaub, Sequence-dependent mechanics of single DNA molecules, *Nature Structural Biology* 6 (1999) 346–350.
- [101] C. Calderon, W. Chen, K. Lin, N. Harris, C. Kiang, Quantifying DNA melting transitions using single-molecule force spectroscopy, *Journal of Physics: Condensed Matter* 21 (2009) 034114.
- [102] C. Ke, M. Humeniuk, H. S-Gracz, P. Marszalek, Direct measurements of base stacking interactions in DNA by single-molecule atomic-force spectroscopy, *Physical Review Letters* 99 (1) (2007) 18302.
- [103] W. Chen, W. Chen, Z. Chen, A. Gooding, K. Lin, C. Kiang, Direct Observation of Multiple Pathways of Single-Stranded DNA Stretching, *Physical Review Letters* 105 (21) (2010) 218104.
- [104] C. Bustamante, S. Smith, J. Liphardt, D. Smith, Single-molecule studies of DNA mechanics, *Current Opinion in Structural Biology* 10 (3) (2000) 279–285.
- [105] J. Marko, Supercoiled and braided DNA under tension, *Physical Review E* 55 (2) (1997) 1758–1772.
- [106] J. Allemand, D. Bensimon, R. Lavery, V. Croquette, Stretched and overwound DNA forms a Pauling-like structure with exposed bases, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (24) (1998) 14152.
- [107] L. Pauling, R. Corey, A proposed structure for the nucleic acids, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 39 (2) (1953) 84.
- [108] Z. Bryant, M. Stone, J. Gore, S. Smith, N. Cozzarelli, C. Bustamante, Structural transitions and elasticity from torque measurements on DNA, *Nature* 424 (6946) (2003) 338–341.
- [109] N. Wang, J. Tytell, D. Ingber, Mechanotransduction at a distance: mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10 (1) (2009) 75–82.

- [110] S. Parker, L. Hansen, H. Abaan, T. Tullius, E. Margulies, Local DNA topography correlates with functional noncoding regions of the human genome, *Science* 324 (5925) (2009) 389.
- [111] F. Chien, J. van Noort, 10 Years of Tension on Chromatin: Results from Single Molecule Force Spectroscopy, *Current Pharmaceutical Biotechnology* 10 (5) (2009) 474–485.
- [112] G. Charvin, D. Bensimon, V. Croquette, Single-molecule study of DNA unlinking by eukaryotic and prokaryotic type-II topoisomerases, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (17) (2003) 9820.
- [113] M. Noom, B. van den Broek, J. van Mameren, G. Wuite, Visualizing single DNA-bound proteins using DNA as a scanning probe, *Nature Methods* 4 (12) (2007) 1031–1036.
- [114] T. Fisher, M. Carrion-Vazquez, A. Oberhauser, H. Li, P. Marszalek, J. Fernandez, Single Molecule Force Spectroscopy Review of Modular Proteins in the Nervous System, *Neuron* 27 (2000) 435–446.
- [115] Veeco, Scanning probe microscopy training notebook, 3rd Edition (2000).
- [116] J. Strzelecki, K. Mikulska, M. Lekka, A. Kulik, A. Balter, W. Nowak, AFM Force Spectroscopy and Steered Molecular Dynamics Simulation of Protein Contactin 4, *Acta Physica Polonica A* (116S) (2009) S156–S159.
- [117] M. Erdmann, R. David, A. Fornof, H. Gaub, Electrically induced bonding of DNA to gold, *Nature Chemistry* 2 (9) (2010) 745–749.
- [118] G. Altan-Bonnet, A. Libchaber, O. Krichevsky, Bubble dynamics in double-stranded DNA, *Physical Review Letters* 90 (13) (2003) 138101.
- [119] T. Kohwi-Shigematsu, Y. Kohwi, Torsional stress stabilizes extended base unpairing in suppressor sites flanking immunoglobulin heavy chain enhancer, *Biochemistry* 29 (41) (1990) 9551–9560.
- [120] Y. Jiang, C. Ke, P. Mieczkowski, P. Marszalek, Detecting ultraviolet damage in single DNA molecules by atomic force microscopy, *Biophysical Journal* 93 (5) (2007) 1758–1767.
- [121] J. Pratt, G. Shaw, D. Smith, Nanomechanical standards based on the intrinsic mechanics of molecules and atoms, *MEMS and Nanotechnology, Volume 2* (2011) 1–7.
- [122] H. Hansma, J. Vesenka, C. Siegerist, G. Kelderman, H. Morrett, R. Sinshaimer, V. Elings, C. Bustamante, P. Hansma, Reproducible imaging and dissection of plasmid DNA under liquid with the atomic force microscope, *Science* 256 (1992) 1180–1184.
- [123] T. Strick, J. Allemand, D. Bensimon, A. Bensimon, V. Croquette, The Elasticity of a Single Supercoiled DNA Molecule, *Science* 271 (5257) (1996) 1835.