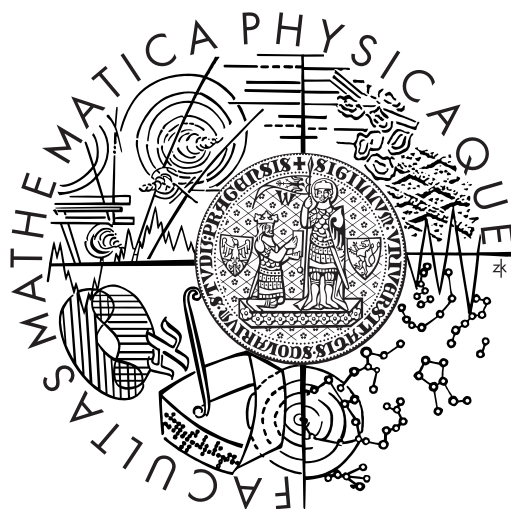


Univerzita Karlova v Praze  
Matematicko-fyzikální fakulta

## DIPLOMOVÁ PRÁCE



Hana Šípová

### **Studium interakcí biomolekul metodou resonance povrchových plasmonů**

Fyzikální ústav UK

Vedoucí práce: Prof. RNDr. Josef Štěpánek, CSc.

Studijní program: Fyzika, Biofyzika a chemická fyzika

2008

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucímu své diplomové práce Prof. RNDr. Josefovi Štěpánkovi, CSc. za zájem, připomínky a čas, který věnoval mé práci. Ráda bych také poděkovala Ing. Jiřímu Homolovi, PhD. a Hance Vaisocherové, PhD. za cenné rady při řešení komplikovanějších problémů, Mgr. Tomášovi Špringerovi za odbornou spolupráci při realizaci této diplomové práce. Děkuji také všem blízkým za velkou podporu.

Prohlašuji, že jsem svou diplomovou práci napsala samostatně a výhradně s použitím citovaných pramenů. Souhlasím se zapůjčováním práce.

V Praze dne 8. května 2008

Hana Šípová

# Obsah

<b>1 Úvod</b> .....	<b>3</b>
1.1 Senzory s povrchovými plasmony .....	3
1.2 Imobilizační metody .....	5
1.3 Kinetická analýza biomolekulárních interakcí .....	7
1.3.1 Transportní jevy .....	8
1.3.2 Úplný model .....	9
1.4 Interakce nukleových kyselin .....	9
1.4.1 Hybridizace nukleových kyselin .....	12
1.5 Antisensní terapie .....	12
1.5.1 Ribonukleasa H .....	14
<b>2 Cíle</b> .....	<b>16</b>
<b>3 Experimentální část</b> .....	<b>17</b>
3.1 Chemikálie .....	17
3.2 Čtyřkanálový SPR senzor .....	18
3.3 Funkcionalizace SPR čipů .....	20
3.4 Protokol měření hybridizace nukleových kyselin .....	21
3.4.1 Určení úspěšnosti hybridizace .....	21
3.4.2 Korekce na množství navázaného streptavidinu .....	22
3.4.3 Asociační a disociační rychlostní konstanty .....	23
<b>4 Výsledky a diskuze</b> .....	<b>24</b>
4.1 Studium hybridizace nukleových kyselin .....	24
4.1.1 Vliv koncentrace iontů na imobilizaci biotinylovaného ON .....	24
4.1.2 Vliv koncentrace iontů na hybridizaci plně komplementárních duplexů .....	26
4.1.3 Vliv koncentrace iontů na kinetiku hybridizace .....	29
4.1.4 Vliv typu pufru na hybridizaci plně komplementárních duplexů .....	30
4.1.5 Vliv koncentrace iontů na hybridizaci částečně komplementárních duplexů .....	33
4.1.6 Vliv koncentrace iontů na kinetiku hybridizace částečně kompl. duplexů .....	37
4.1.7 Vliv koncentrace iontů na úspěšnost hybridizace triplexů .....	39
4.1.8 Vliv povrchu na hybridizaci imobilizovaných oligonukleotidů .....	40
4.2 Studium Ribonukleasy H .....	42
<b>5 Závěr</b> .....	<b>49</b>
<b>Literatura</b> .....	<b>51</b>

Název práce: *Studium interakcí biomolekul metodou resonance povrchových plasmonů*

Autor: *Hana Šípová*

Katedra (ústav): *Fyzikální ústav UK*

Vedoucí diplomové práce: *Prof. RNDr. Josef Štěpánek, CSc.*

e-mail vedoucího: *stepjos@karlov.mff.cuni.cz*

*Abstrakt: V rámci diplomové práce byly studovány biomolekulární interakce významné z hlediska potenciálního testování oligonukleotidů pro antisensní terapii. K tomuto účelu byla použita metoda rezonance povrchových plasmonů (SPR), která umožňuje studium těchto interakcí v reálném čase. Byl sledován vliv koncentrace kationtů na hybridizační vlastnosti plně komplementárních i neúplně komplementárních sekvencí přirozených nukleových kyselin a o sledování aktivity RNasy H. Z výsledků práce vyplývá, že sodné a hořečnaté ionty podporují hybridizaci pomocí odlišných interakčních schémat. Hořečnaté ionty jsou v porovnání se sodnými ionty v podporování hybridizace mnohem efektivnější. Společný vliv obou iontů je ovlivněn jejich vzájemnou kompeticí. Diplomová práce poskytuje experimentální data pro budoucí vytvoření termodynamického a statistického modelu rozdílného působení sodných a hořečnatých iontů na hybridizaci nukleových kyselin. Dále bylo zjištěno, že fyzikálně-chemické podmínky na povrchu senzoru se významně liší od situace ve volném roztoku, což je způsobeno zvýšenou objemovou koncentrací oligonukleotidů v tenké vrstvě na povrchu senzoru. V rámci diplomové práce byla rovněž vyvinuta bezznačková metoda pro studium interakcí potenciálních antisensních oligonukleotidů s RNasou H v reálném čase, která umožňuje i studium kinetik hydrolýzy RNasy H. Diplomová práce probíhala v rámci spolupráce mezi Oddělením fyziky biomolekul Fyzikálního ústavu Univerzity Karlovy a Oddělení optických senzorů v Ústavu fotoniky a elektroniky Akademie věd České Republiky.*

*Klíčová slova: hybridizace, vliv kationtů, RNasa H, senzory s povrchovými plasmony.*

*Title: Study of biomolecular interactions by the method of surface plasmon resonance*

*Author: Hana Šípová*

*Department: Institute of Physics, Charles University*

*Supervisor: Prof. RNDr. Josef Štěpánek, CSc.*

*Supervisor's e-mail address: stepjos@karlov.mff.cuni.cz*

*Abstract: A detailed understanding of oligonucleotide interactions is crucial for effective development of new synthetic modified oligonucleotides as candidates for the "anti-sense" therapy. In this work, a surface plasmon resonance method was used to study these important interactions in real-time. In particular, we focused on investigating the effect of cation type and concentration present in hybridization solution on hybridization of fully complementary and partially mismatched complexes of native nucleic acids. The experiments revealed that magnesium ions are more efficient in supporting the hybridization compared to sodium cations. When both of these ion types were present in hybridization solution, their various effects on hybridization were observed suggesting the competition in their binding. The diploma thesis gave a base for further creating of thermodynamical and statistical models of dissimilar incidence of sodium and magnesium ions on nucleic acid hybridization. It was found that hybridization on sensor surface is different from the situation when carried out in liquid. A strong effect of electrostatic repulsion due to increased density of oligonucleotides immobilized on the sensor surface was observed on both the hybridization and immobilized oligonucleotides. Within this work, assay for studying interactions of antisense oligonucleotides and RNase H in real time was developed as well. The assay allows the real-time monitoring of the RNase H activity with investigating also the kinetics of oligonucleotide hydrolysis. This work was performed within collaboration of Division of Biomolecular Physics, Institute of Physics, Charles University and Institute of Photonics and Electronics, Academy of Sciences, Czech Republic.*

*Keywords: Hybridization, Cation effect, Rnase H, Surface Plasmon Resonance.*

# Kapitola 1

## Úvod

### 1.1 Senzory s povrchovými plasmony

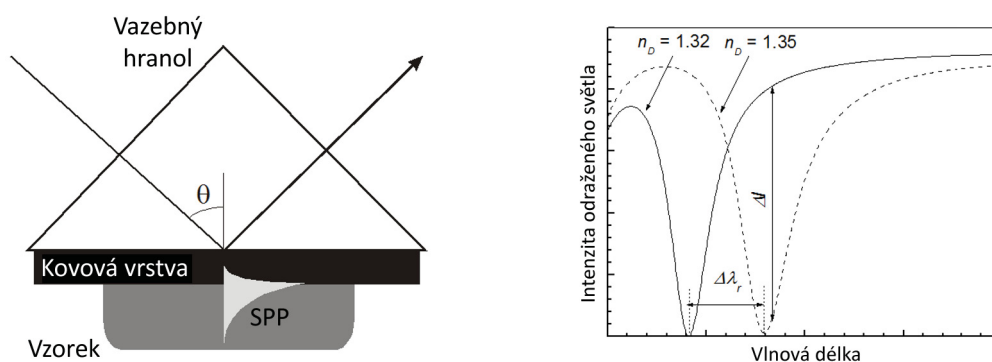
Optické senzory založené na excitaci povrchových plasmonů (Surface Plasmon Resonance – SPR) patří do skupiny refraktometrických senzorů, která měří změny indexu lomu v poli evanescentní elektromagnetické vlny. SPR senzory umožňují studovat biomolekulární interakce v reálném čase s vysokou citlivostí a přitom bez nutnosti studované molekuly značit a tudíž nabízejí široké využití v mnoha biochemických a biofyzikálních oblastech (Buckle et al. 1996; Cooper 2002; Heller 2002). Na rozdíl od jiných druhů senzorů, které pracují na principu elektrochemických (Mikkelsen 1995), nebo piezoelektrických jevů (Babacan et al. 2000), se optické biosenzory vyznačují vysokou citlivostí a odolností vůči vnějšímu elektrickému a magnetickému poli.

Senzory s povrchovými plasmony od svého vzniku zaznamenaly významný rozvoj v rozlišení, citlivosti, fluidice, imobilizačních metodách i analýze dat (Nenninger et al. 2002; Homola and Piliarik 2006). V současné době tak představují nejpoužívanější bezznačkové biosenzory. Jsou komerčně dostupné a nabízí širokou paletu provedení – od maticových SPR senzorů po přenosné SPR senzory připravené pro použití v terénu a optimalizované pro konkrétní aplikaci. Díky tomu jsou SPR biosenzory ideálními kandidáty pro studium interakcí nukleových kyselin, jako je studium hybridizace oligonukleotidů (Knoll et al. 1997) a interakcí oligonukleotid-protein.

Senzory s povrchovými plasmony jsou založené na měření změn vlastností optické vlny, která je excitována na rozhraní kovu a dielektrika. Tato vlna reprezentuje speciální mód oscilací vodivostních elektronů a elektromagnetického pole – povrchový plasmon-polariton (surface plasmon polariton – SPP), který je veden podél povrchu tenké vrstvy kovu. V případě SPR senzorů je nejčastěji používaným kovem zlato. Intenzita elektromagnetického pole SPP klesá exponenciálně od povrchu kovu do přiléhajícího média. Vazba analytu na biomolekulární rozpoznávací elementy na povrchu způsobí změnu indexu lomu média a tím i změnu konstanty šíření SPP. Podle konkrétního parametru, který monitoruje změnu konstanty šíření, jsou SPR senzory klasifikovány jako senzory s modulací úhlu, intenzity, vlnové délky nebo polarizace (Homola and Piliarik 2006).

Jedna z úspěšných strategií excitace povrchového plasmonu je založena na utlumeném úplném odrazu (Attenuated Total Reflection – ATR) ve vazebném hranolu (obr. 1). V SPR senzorech

s modulací vlnové délky vstupuje svazek polychromatického světla pod fixním úhlem na kovový film a zde excituje povrchový plasmon. Konstantu šíření povrchového plasmonu je pak možné určit z měření intenzity odraženého světla na různých vlnových délkách a nalezení vlnové délky světla, které se nejvíce navazuje do povrchového plasmonu (mód, ve kterém dochází k největšímu zeslabení úplného odrazu).

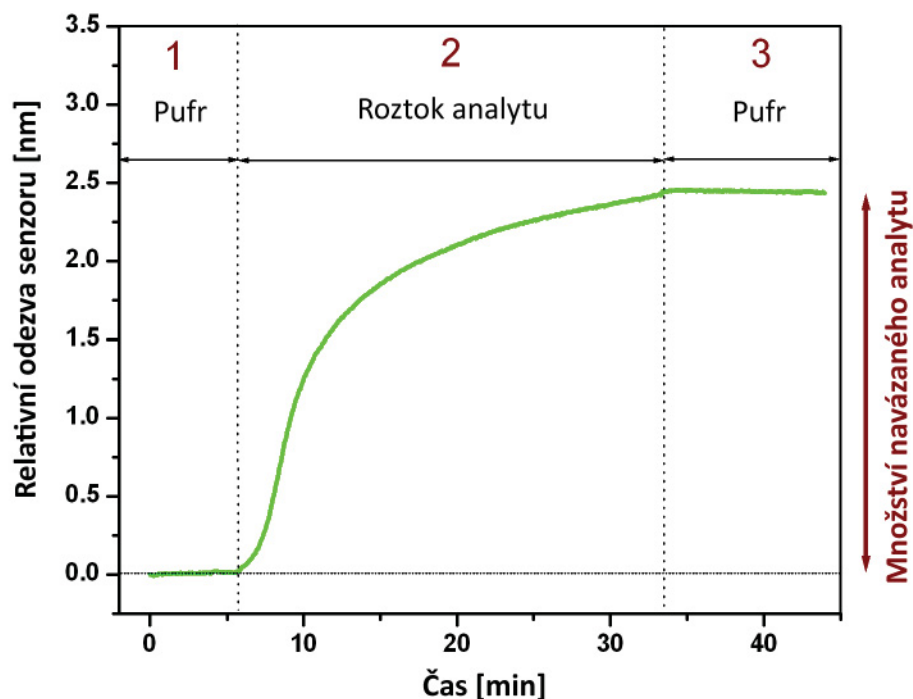


**Obr. 1:** Excitace povrchového plasmonu pomocí optického hranolu. Světlo na vrstvu kovu dopadá pod úhlem  $\theta$ , který je větší než mezní úhel [vlevo].

Intenzita odraženého světla jako funkce vlnové délky pro světelnou vlnu vstupující pod fixním úhlem (křivky pro dva různé vzorky s různými indexy lomu) [vpravo].

Posun rezonanční vlnové délky je úměrný změně indexu lomu na povrchu senzoru. Typická odezva SPR senzoru na vazbu analytu, který zobrazuje závislost posunu rezonanční vlnové délky v anometrech na čase. Měření se typicky skládá z tří fází: **(1)** inkubace povrchu senzoru v pufru, dokud není dosaženo stabilní odezvy (obr. 2, fáze 1), **(2)** povrch senzoru je v kontaktu s roztokem analytu – je možné pozorovat tvorbu komplexu mezi analytem a imobilizovaným biomolekulárním receptorem (obr. 2, fáze 2), **(3)** inkubace povrchu senzoru ve stejném pufru, jako před vpuštěním analytu (obr. 2, fáze 3). Pokud dochází k disociaci komplexů, projeví se to ve 3. fázi poklesem odezvy. Množství navázaného analytu se obvykle určuje jako rozdíl v odezvě senzoru ve třetí fázi a úrovně před vpuštěním analytu, kdy je povrch v kontaktu se stejným pufrům.

Pro experimenty uvedené v této diplomové práci byl používán čtyřkanálový SPR senzor založený na modulaci vlnové délky (Koubova et al. 2001). Tento senzor byl vyvinut na Oddělení optických senzorů na Ústavu fotoniky a elektroniky Akademie věd České republiky.



**Obr. 2:** Typická odezva senzoru na vazbu analytu na funkcionalizovaný povrch senzoru v reálném čase. V první fázi je povrch senzoru v kontaktu s pufr (1), pak je vpuštěn roztok analytu a je pozorována tvorba molekulárního komplexu (2). Ve třetí fázi (3) je povrch inkubován ve stejném pufru jako ve fázi 1. Potenciálně může být pozorována disociace a po jejím skončení je možné určit množství pevně navázaného analytu.

## 1.2 Imobilizační metody

V SPR biosenzorech je jedna interagující molekula (biomolekulární rozpoznávací element) imobilizována na pevný povrch a druhá je přítomna v kapalném vzorku, který je v přímém kontaktu s povrchem senzoru. Jako biomolekulární rozpoznávací elementy – receptory – se používají různé typy biomolekul: protilátky (Hock 1997), peptidy (Wegner et al. 2002), oligonukleotidy (Jayasena 1999) nebo polymery (Ansell et al. 1996). Receptory jsou vedle optického převodníku hlavní částí SPR biosenzoru. Jejich imobilizace je základním krokem pro přípravu konkrétního biosenzoru, protože významně ovlivňuje jeho konečnou citlivost. Na imobilizační metodu jsou proto kladeny značné nároky: musí zajišťovat dostatečnou hustotu receptorů, zachovat jejich biologickou aktivitu a zároveň zamezit nespecifickým vazbám molekul na povrch senzoru.

První SPR senzory pro (bio)analytické účely používaly hlavně jednoduchou fyzikální adsorpci proteinů na kovové SPR povrchy (Liedberg et al. 1995). Mnoho proteinů a jiných molekul má ale tendenci se na zlatý povrch spontánně vázat, proto byla potřeba vyvinout sofistikovanější imobilizační techniky s lépe definovanými vlastnostmi. Dnešní imobilizační metody obecně využívají



fyzikálně-chemické interakce, jako jsou chemisorpce (Nuzzo and Allara 1983), kovalentní vazba (Johnsson et al. 1991; Oshannessy et al. 1992), hydrofobní a elektrostatické interakce (Koubova et al. 2001) a vysokoafinitní biomolekulární interakce (např. vazba streptavidin - biotin (Busse et al. 2002; Tombelli et al. 2002), proteiny A a G (Anderson et al. 1997), nebo komplementární oligonukleotidy (Ladd et al. 2004).

Receptory je možné navázat na povrchu senzoru v ploše, nebo do trojdimenzionální sítě. Ta nabízí větší množství vazebných míst a lépe zachovává vlastnosti imobilizovaných molekul při dlouhodobém skladování. Nejčastěji používanou metodou tohoto typu je imobilizace na karboxymethylovou dextranovou síť (Lofas et al. 1995). Pro dvojdimenzionální imobilizaci se často používá imobilizace na samouspořádanou monovrstvu (Self-assembled monolayer – SAM) alkanthiolů (Knoll et al. 1997). Pro dosažení požadované hustoty receptorů a zároveň snížení množství nespecifických vazeb se používají směsi alkanthiolů s dlouhým řetězcem ( $n = 12$  a více) zakončených funkční skupinou pro navázání biomolekulárního rozpoznávacího elementu a kratších alkanthiolů zakončených několika skupinami ethylenglycolu, které zvyšují specifitu povrchu (Jung et al. 2000; Nelson et al. 2001).

Nejčastěji používanými receptory jsou proteiny a metody jejich imobilizace byly shrnuty v několika publikacích (Homola 2008). Pro imobilizaci oligonukleotidů (ON) na zlatý povrch senzoru existuje několik způsobů: **(1)** vytvoření uspořádané vrstvy thiolem zakončených ON (Bamdad 1998; Peterson et al. 2001) nebo **(2)** navázání biotinylovaných ON na streptavidinovou vrstvu pomocí nekovalentní vysokoafinitní vazby (Niemeyer et al. 1998; Nelson et al. 2001). Nevýhoda prvního přístupu je náročná modifikace oligonukleotidu, která limituje jeho délku (Bamdad 1998). Další porovnání imobilizačních metod uvádí např. Tombelli (Tombelli et al. 2002).

V této práci byla použita metoda imobilizace oligonukleotidů přes streptavidinovou mezi-vrstvu upevněnou na alkanthiolovou monovrstvu. V komerčních a nejrozšířenějších SPR senzorech současnosti (BIAcore) je streptavidinový povrch připravován pomocí imobilizačního postupu založeného na jeho kovalentním přichycení na karboxymethyl dextranovou síť (Oshannessy et al. 1992; Lofas et al. 1995). Tato metoda je ale velmi pracná, pokud se začíná od úpravy čistého zlata, a mimo jiné je také méně vhodná pro kinetické studie, neboť je nutné započítávat difúzi studované molekuly hydrogelovou sítí (Goldstein et al. 1999; Witz 1999; Sikavitsas et al. 2002).



### 1.3 Kinetická analýza biomolekulárních interakcí

Znalost termodynamických parametrů biomolekulárních interakcí je důležitá pro mnoho výzkumných a průmyslových odvětví – např. pro vývoj léků, funkční proteinovou analýzu a obecně všude, kde je prováděna syntéza a purifikace biomolekul. Jednou ze základních charakteristik těchto interakcí je kinetika asociačních a disociačních procesů, která umožňuje získat významné informace o interagujících molekulách. SPR biosenzory jsou unikátní technologií, která umožňuje tyto reakční kinetiky sledovat v reálném čase.

SPR senzory měří časový průběh relativní změny hmoty v těsné blízkosti povrchu senzoru. Pro kvantitativní analýzu naměřených dat je ale často potřeba kromě reakčního modelu bimolekulární interakce také uvažovat a popsat adekvátním matematickým modelem i konkrétní hydrodynamické podmínky experimentu.

V typické reakci na SPR senzoru je studována interakce mezi molekulou navázanou na povrch senzoru (receptorem) a zkoumanou molekulou v roztoku (analytem). Interakce analytu a receptoru ( $A$  a  $R$ ) může být vyjádřena interakčním schématem:



kde  $k_a$  resp.  $k_d$  je asociační resp. disociační konstanta, která charakterizuje danou reakci a je nezávislá na čase a koncentraci analytu.

Rovnice (1) znázorňuje dva zároveň probíhající procesy: asociaci, kdy  $A$  a  $R$  vytvoří imobilizovaný komplex  $AR$ , a disociaci, kdy se komplex  $AR$  rozdělí na dvě samostatné části  $A$  a  $R$ . Pro asociaci je nezbytné, aby vzdálenost mezi  $A$  a  $R$  byla menší, než je kritický poloměr. Předpokládá se také, že pravděpodobnost vytvoření komplexu je pro všechny molekuly stejná. Tím se zanedbává vliv orientace molekul a rychlosti jejich translace a rotace.

Základem matematického modelu je kinetická rovnice, která popisuje, jak závisí koncentrace vytvořených/disociovaných komplexů na momentální koncentraci volného analytu a volných/vázaných receptorů. Za předpokladu, že je koncentrace analytu udržována na konstantní úrovni (neustalým doplňováním pomocí konstantního průtoku, nebo použitím dostatečně velké koncentrace analytu), popisuje reakci kinetická rovnice pseudo-prvního řádu, která vychází z Langmuirova modelu pro reakci 1. řádu probíhající volně v roztoku:

$$\frac{d\gamma}{dt} = k_a \alpha_0 (\beta - \gamma) - k_d \gamma \quad (2)$$

kde  $\gamma$  je povrchová koncentrace vytvořených komplexů vytvořená za jednotku času,  $\alpha_0$  je koncentrace analytu a  $\beta$  je povrchová koncentrace receptorů.  $\beta - \gamma$  je tak množství volných, nenávázaných receptorů.  $\beta$  i  $\gamma$  jsou shodně vyjádřeny v lokální hustotě.

Kinetika pseudo-prvního řádu je typická pro SPR senzory, které používají průtočné komory. Koncentrace analytu tak může být na začátku skokově zvýšena na koncentraci  $\alpha_0$  a v zápětí skokově snížena na nulu (Ward and Winzor 2000). Po skokovém zvýšení koncentrace analytu dojde po dostatečně dlouhé době k praktickému vyrovnání asociačního a disociačního procesu – k vytvoření dynamické rovnováhy. Může být tak určena rovnovážná konstanta (Oshannessy et al. 1993):

$$K = \frac{k_a}{k_d} = \frac{\gamma_{eq}}{\alpha_0(\beta - \gamma_{eq})} \quad (3)$$

Výhodou rovnovážných měření je to, že na rozdíl od ostatních částí odezvy senzoru nezávisí na transportních jevech (viz níže).

V reálných molekulárních systémech mohou být procesy probíhající v aktivní molekulové vrstvě mnohem komplikovanější. Odezva senzoru je potom superpozicí několika paralelních nebo následných reakcí. Pro dosažení dostatečné přesnosti kinetických rychlostních konstant je pak nezbytné použít odpovídající (a často mnohem složitější) kinetický model.

### 1.3.1 Transportní jevy

Přestože odpovídající kinetický model je v ideálním případě dostačující pro úplný popis odezvy SPR biosenzoru, v reálném případě je nutné započítat i aktuální hydrodynamické podmínky. V biosenzorech s průtočnou komorou je transport volného analytu z roztoku k povrchu senzoru vždy ovlivněn a omezen difúzí. Pomalý transport analytu způsobuje během asociace pokles jeho povrchové koncentrace (volný analyt je spotřebováván na tvorbu komplexu s receptorem), a nárůst jeho koncentrace během disociace, kdy je naopak produkován rozpadem komplexů. V obou případech vyústí ve zpomalení reakce.

Vzhledem k typickým rozměrům průtočné komůrky a rychlosti průtoku je možné proudění uvnitř komory považovat za laminární. Za předpokladu, že se aktivní plocha senzoru nachází v dostatečné vzdálenosti od vstupu a výstupu, je možné předpokládat, že profil laminárního proudění je dostatečně vyvinutý a konstantní podél celé aktivní zóny senzoru. Je vhodné si uvnitř průtočné komůrky zavést souřadný systém, kdy osa  $x$  je rovnoběžná se směrem průtoku,  $y$  se směrem výšky a  $z$  leží ve směru šířky komory. Získáme pak parciální diferenciální rovnici, jejímž

řešením můžeme určit rozložení koncentrace analytu v průtočné komůrce. V centrální části vertikálního profilu poměrně rychle dochází k dosažení vstupní koncentrace analytu  $\alpha_0$ , v blízkém okolí stěn komůrky ale koncentrace zůstává nulová. Transport analytu jen pomocí laminárního proudění je tak velmi neefektivní.

V blízkosti povrchu proto hraje významnou roli translační difúze analytu. Úměrnost mezi koncentračním gradientem a velikostí difúze je popsána Fickovým zákonem. Konstanta úměrnosti  $D$  se nazývá difuzní koeficient, který zároveň určuje míru chaotického pohybu molekul v roztoku. Pokud je započítáno proudění i translační difúze, získáme transportní rovnici:

$$\frac{\partial \alpha(x, y, t)}{\partial t} = D \left( \frac{\partial^2 \alpha(x, y, t)}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 \alpha(x, y, t)}{\partial y^2} \right) - 4v_{\max} \frac{y}{h} \left( 1 - \frac{y}{h} \right) \frac{\partial \alpha(x, y, t)}{\partial x} \quad (4)$$

kde  $h$  je výška komory a  $v_{\max}$  je maximální rychlost ve středu průtočné komory.

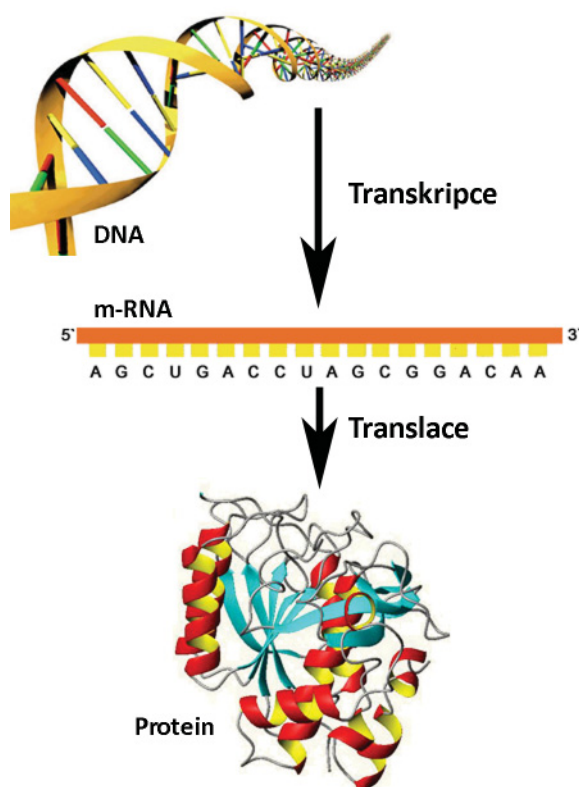
### 1.3.2 Úplný model

Úplný model kinetik reakcí probíhajících na povrchu senzoru se započtením transportních jevů vyžaduje řešení parciální diferenciální rovnice (4) spojené s vhodnými kinetickými rovnicemi. Rovnice (4) může být vyřešena jen numericky. Enormní časová náročnost těchto výpočtů znemožňuje použití úplného modelu k rutinnímu fitování experimentálních dat. Mnohem častěji se proto používá pro ověřování správnosti reakčních konstant v porovnání s experimentálními daty a platnosti jednodušších modelů. Jednodušší modely transportu hmoty bývají také součástí komerčně dostupných programů pro analýzu dat (Edwards et al. 1999).

## 1.4 Interakce nukleových kyselin

Genetická informace, která je nezbytná pro reprodukci a vývoj organismu, je uložena v sekvenci bazí deoxyribonukleových kyselin (DNA). Do dalších buněčných generací je přenášena procesem replikace. Při expresi genetické informace dochází v prvním kroku k transkripci úseků DNA do ribonukleové kyseliny (RNA), která je dále upravována a následně přepisována do proteinů (obr. 3).

Polymery nukleových kyselin jsou tvořeny cukr-fosfátovou kostrou a heterocyklickými bázemi, které jsou navázány na cukernou část (ribóza resp. 2'-deoxyribóza pro RNA resp. DNA) pomocí N-glykosidické vazby. V DNA jsou přítomny převážně 4 druhy bazí: Adenin (A), Thimin (T), Guanin (G) a Cytosin (C). Pro uchování a přenos genetické informace je velmi důležité



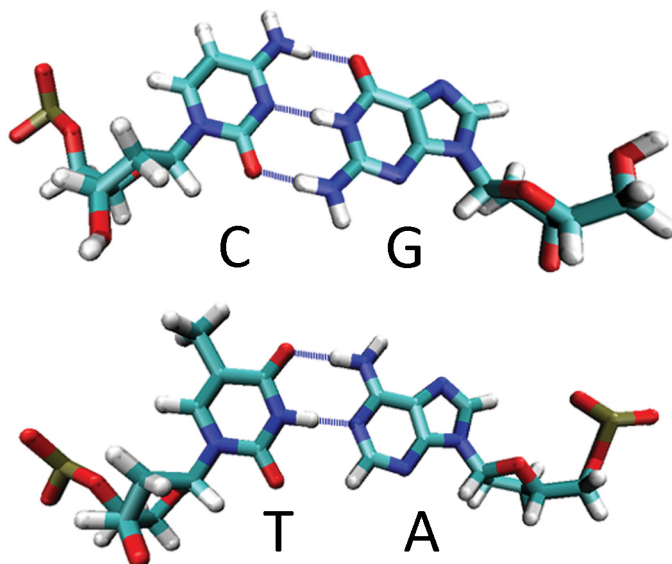
**Obr. 3:** Schéma procesu exprese genů v živé buňce.

specifické párování bazí. V roce 1953 James Watson a Francis Crick (Watson and Crick 1953) objevili, že adenin vytváří pár pouze s thyminem (pomocí dvou vodíkových vazeb) a guanin se pomocí tří vodíkových vazeb páruje pouze s cytosinem (obr. 4). K tvorbě duplexů mezi řetězci nukleových kyselin s komplementárními sekvencemi bazí dochází i samovolně v roztoku bez působení příslušných enzymů. Tento proces se nazývá hybridizace.

Kromě Watsonova-Crickova párování, které najdeme v duplexech nukleových kyselin, se ve vícevláknových komplexech vyskytují i jiné typy mezibázových interakcí. Příkladem je Hoogsteenovo párování, které se vyskytuje v triplexech nukleových kyselin. Předpokládá se, že triplexy mají regulační funkci při transkripci genů. Tvoří se téměř výhradně mezi homopurinovými a homopyrimidinovými vlákny a mohou mít paralelní, nebo antiparalelní strukturu v závislosti na složení a orientaci třetího vlákna (Praseuth et al. 1999). Tvorba triplexů závisí na teplotě, pH, koncentraci kationtů a dalších faktorech (Mills et al. 1999; James et al. 2003).

Kromě stabilních kanonických Watson-Crickových bázových párů (A·T a G·C) existuje dalších osm možných dvojic těchto 4 bazí, které tvoří komplexy různé stability a struktury: A·A, A·C, C·C, C·T, G·G, G·A, G·T, T·T, tzv. nekomplementární páry neboli mismatche. V DNA párování mohou vzniknout chybou při replikaci, při tvorbě heteroduplexu při homologní rekombinaci, spontánní deaminací, nebo působením mutagenních chemikálií a ionizujícího záření. Také se

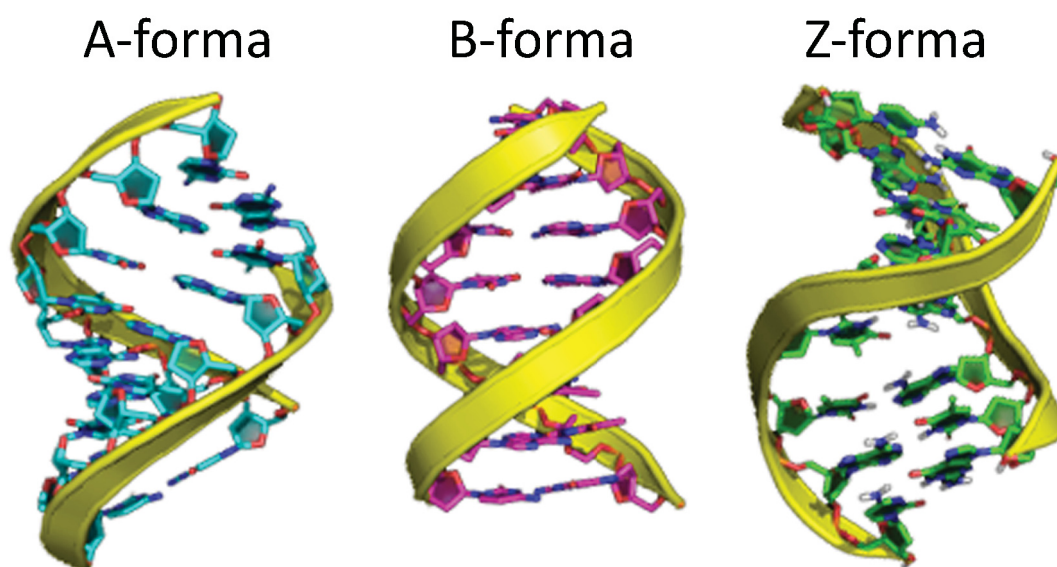
objevují v sekundárních strukturách u jednovláknových DNA virů. Pro mnoho biomolekulárních technik, jako je PCR, genová diagnostika a vývoj antisensních léků, je nezbytná schopnost rozlišit hybridizaci plně komplementárních ON a ON s mismatchi.



Obr. 4: Kanonické Watson-Crick párování bází.

Vodíkové vazby mezi bázemi hrají pro funkci nukleových kyselin (NA) významnou roli, nejsou ale hlavním stabilizujícím faktorem jejich trojdimenzionální struktury. Struktura komplexů NA je stabilizována hlavně pomocí „stacking“ interakce a pomocí iontových a hydrofobních interakcí s okolním vodným prostředím. Geometrie NA v roztoku tak není rigidní, ale bývá ovlivňována mnoha faktory, jako je bázové složení, koncentrace NA, délka vlákna, teplota, iontová síla prostředí atd. Obecně rozlišujeme několik základních kanonických forem duplexů nukleových kyselin: nejčastější je pravotočivá B-forma pro DNA a A-forma pro RNA (obr. 5).

Za určitých podmínek organizovaná struktura úplně vymizí a dochází k denaturaci nukleových kyselin. Komplexy NA mohou být rozrušeny například rostoucí teplotou až k úplnému osamostatnění jednotlivých vláken. Tento proces vykazuje prvky fázového přechodu, proto se často označuje jako „tání“ komplexů NA. Teplota tání ( $T_m$ ) komplexů je definovaná jako teplota, při které byla rozrušena polovina komplexů a je používána jako jednoduchý parametr pro charakterizaci stability NA.



**Obr. 5:** Základní kanonické formy duplexu nukleových kyselin.

### 1.4.1 Hybridizace nukleových kyselin

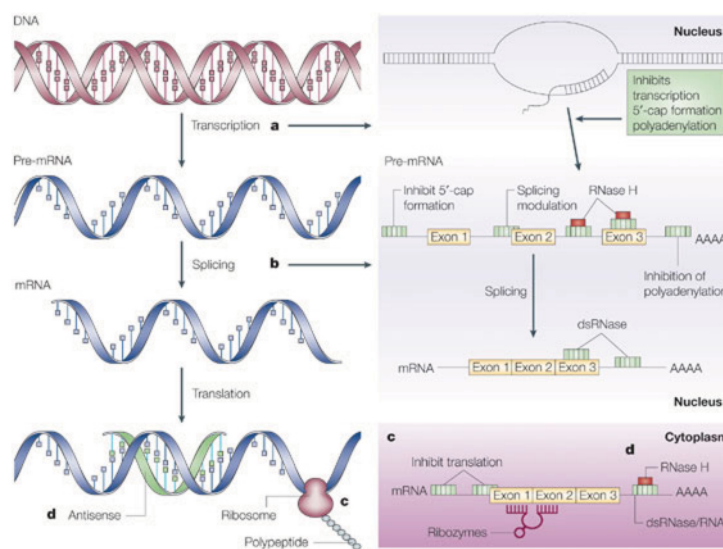
Hybridizace NA se v současné době rutinně používá v mnoha technologiích molekulární biologie, jako je například polymerázová řetězová reakce (PCR) nebo blotovací techniky. Tyto metody silně závisí na citlivé a specifické detekci hybridizace mezi krátkými syntetickými oligonukleotidy (ON) a cílovými sekvencemi. Pomocí běžných přístrojů, které tyto techniky využívají, se dá detekovat jen konečný produkt, není ale možné pomocí nich sledovat samotný proces hybridizace. Většina těchto technik navíc kromě čtecího systému vyžaduje fluorescenční, nebo radioaktivní značky, což zvyšuje časové i cenové nároky těchto metod. Některé značky mohou navíc ovlivňovat vlastnosti zkoumané látky a tím vést k méně správným, nebo úplně špatným výsledkům. Pro další vývoj je detailní znalost mechanismu hybridizace nezbytná, stále se proto hledají citlivé metody detekce v reálném čase, které by umožňovaly sledování hybridizace bez nutnosti studované molekuly jakkoliv značit.

## 1.5 Antisensní terapie

Většina dnes používaných léků je založena na narušení funkce konkrétního proteinu. Vývoj takového léku je zpravidla velmi časově i ekonomicky náročný, protože vyžaduje proskenování široké palety potencionálních terapeutik. Narozdíl od běžných léků nabízejí antisensní oligonukleotidy cestu, jak velmi rychle, účinně a předvídatelně ovlivňovat genovou expresi. Představují tak slib-



nou technologii pro léčbu rakoviny, virových onemocnění, kardiovaskulárních, hematologických a dědičných chorob (Agrawal et al. 1997; Crooke 1999; Yuen and Sikic 2000).



**Obr. 6:** Mechanismus působení antisensních oligonukleotidů (zeleně). Mezi ně patří: inhibice transkripce **(a)**, inhibice sestřihání, syntézy čepičky nebo polyadenylace **(b)**, inhibice translace **(c)**. Duplex antisensní oligonukleotid-RNA pak slouží jako substrát pro enzym RNasu (červená barva, **(b)**, **(d)**), která hydrolyzuje DNA-RNA, resp. RNA-RNA vlákno a snižuje koncentraci mRNA cílového genu. Převzato z (Gleave and Monia 2005).

Antisensní oligonukleotidy jsou krátká vlákna DNA, RNA nebo jejich analogů, která hybridizují s cílovou mRNA sekvencí pomocí Watsonova-Crickova párování. Mohou tak zamezit transportu mRNA, posttranskripčním úpravám (sestřihání), nebo translaci mRNA do proteinu (viz obr. 6). Specificita této metody vychází z faktu, že se určitá sekvence, která je delší než 13 (RNA), resp. 17 (DNA) nukleotidů, v lidském genomu vyskytuje v průměru pouze jednou.

Díky intenzivnímu výzkumu v posledních letech se podařilo definovat nutné vlastnosti, které musí splňovat účinný antisensní ON. Tyto vlastnosti zahrnují stabilitu proti nukleasám, vysokou prostupnost do buněk, velkou afinitu a specificitu k mRNA a schopnost aktivovat RNasu H (Zamaratski et al. 2001).

Přírodní fosfodiesterové ON jsou v buňce velmi rychle hydrolyzovány nukleasami, proto je nezbytně nutné strukturu ON modifikovat. Z velkého množství možností se právě modifikace nukleotidové spojky ukázaly jako nejvíce účinné (Uhlmann and Peyman 1990). První generace antisensních oligonukleotidů – fosforothioátové oligomery (Freier and Altmann 1997; Furrer et al. 1999) – úspěšně prošla klinickými testy a prakticky se už používá (Galderisi et al. 1999).



V porovnání s přírodními ON ale vykazuje nižší specifitu (Stein and Cheng 1993; Stein 1996). V současné době probíhají klinické testy modifikovaných ON druhé a třetí generace, které se skládají z 2'-O-methyl a fosforothioátové modifikace (Agrawal et al. 1997).

Vývoj, který chemie a molekulární biologie v posledních letech zaznamenala, umožnil položit základy vývoje antisensních léků a zlepšit jejich vlastnosti z hlediska stability, selektivity a specifity působení v organismu. Stále se ale hledají nové antisensní oligonukleotidy, které by byly optimální pro široké klinické využití.

### 1.5.1 Ribonukleasa H

Některé modifikace ON vykazovaly vysokou odolnost vůči nukleasám, ale nedokázaly aktivovat ribonukleasu H. Schopnost mobilizovat RNasu H se zdá být pro správnou funkci modifikovaného ON klíčová.

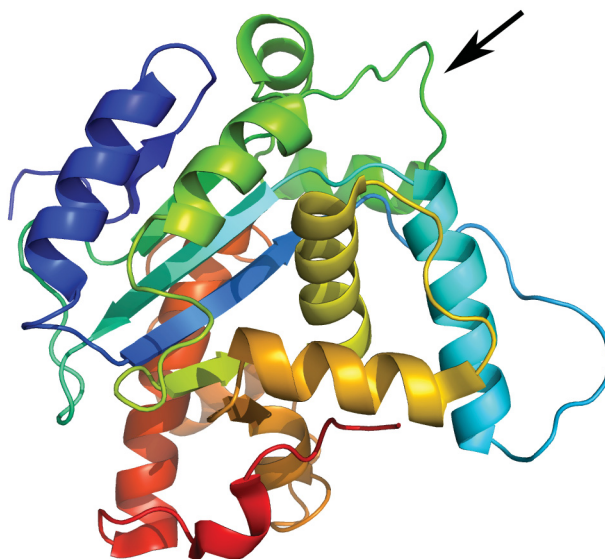
RNasa H je enzym přítomný v mnoha organismech i u některých virů (kde je součástí reverzní transkriptasy), který hydrolyzuje RNA vlákno v hybridním duplexu RNA/DNA. Vytváří krátké oligonukleotidy se skupinou na 5'-konci a hydroxidovou na 3'-konci. Výsledný produkt postrádá polyadenylaci na 3'-konci a čepičku na 5'-konci a je proto degradován buněčnými 3' a 5' exonukleasami.

Nezbytnými kofaktory jsou pro RNasu H dvojmocné ionty ( $Mg^{2+}$ , resp.  $Mn^{2+}$ ), které se váží na substrát a koordinují záporně nabitě aktivní místo proteinu (Krakowiak et al. 2002). Model principu katalýzy RNasy H zahrnuje vazbu 2 kovových iontů (Steitz and Steitz 1993), jejichž přítomnost a přesné umístění je pro funkci RNasy nezbytné (Nowotny et al. 2005). Ve velkých koncentracích  $Mg^{2+}$  může dojít k navázání třetího iontu do aktivního místa a tím k utlumení aktivity RNasy H (Oda et al. 1993).

Hybridní DNA/RNA duplex se podle krystalografických studií (Kopka et al. 2003) podobně jako dsRNA vyskytuje v A formě. V komplexu s RNasou je ale DNA vlákno duplexu v B formě s 2'-endo a 1'-exo konformací ribózy. RNA vlákno zaujímá A formu a jeho cukry jsou v 3'-endo konformaci. RNasy pravděpodobně vyhledávají hybrid RNA/DNA, který stabilizují ve smíšené A/B formě. Tím jej rozlišují od ve výhradně A formě se vyskytující dsRNA (Nowotny et al. 2005).

Nejvíce prozkoumaný enzym z této rodiny je RNasa H1 z *Escherichia Coli* (Katayanagi et al. 1990). Rentgenová strukturní analýza ukázala (Nowotny et al. 2005), že má podobnou strukturní topologii, jako doména HIV-1 reversní transkriptázy (Davies et al. 1991). Vyjímkou je jednoduchý výčnělek zajišťující vazbu substrátu, který se nachází jen u *E. Coli* (Haruki et al. 1997).

U reverzní transkriptázy jeho funkci pravděpodobně zastupuje RNA/DNA vázající doména – RDHD (RNA/DNA Hybrid binding Domain).



**Obr. 7:** Struktura RNasy H *Escherichia Coli*. Šipkou je označen výčnělek zajišťující vazbu hybridního RNA-DNA duplexu.

V současnosti používané testy pro studium aktivity RNasy H vyžadují značené substráty. Mezi nejčastější značení patří RNA s  $H^3$  značkou (Kanaya et al. 1991), které jsou připravovány transkripční *in vitro*. Jiné formáty jsou založené na syntetických RNA ON označených  $^{32}P$  (Kanaya 2001), dioxigeninem (Rychetsky et al. 1996), nebo fluorescenčním barvivem (Anderson et al. 1997; Rizzo et al. 2002; Parniak et al. 2003). Většina z výše popsaných metod navíc neumožňuje sledovat interakci RNasy H v reálném čase. SPR senzory proto představují ideální techniku pro studium RNasy H (Haruki et al. 1997).

# Kapitola 2

## Cíle

Téma diplomové práce je úzce spojeno s intenzivní spoluprací mezi Oddělením fyziky biomolekul Fyzikálního ústavu Univerzity Karlovy a Oddělení optických senzorů v Ústavu fotoniky a elektroniky Akademie věd České Republiky. Cílem práce bylo vyvinout, případně optimalizovat postupy studia významných bimolekulárních interakcí oligonukleotid-oligonukleotid a oligonukleotid-protein pomocí biosenzorů na bázi rezonance povrchových plasmonů, které byly vyvinuté a jsou provozované v Ústavu fotoniky a elektroniky.

Práce byla konkrétně zaměřena na typy interakcí, které jsou klíčové pro využívání SPR biosenzorů pro testování vhodnosti nových modifikovaných oligonukleotidů z hlediska jejich možné aplikace v antisensní terapii, tedy na hybridizaci s plně i částečně komplementární sekvencí nukleové kyseliny a na interakci s RNAsou H.

Pokud jde o hybridizační experimenty, byla v době zadání diplomové práce již k dispozici ověřená assay pro sledování hybridizace s plně komplementární sekvencí. Cílem práce v této oblasti bylo proto především podrobné zmapování vlivu prostředí použitého roztoku oligonukleotidů, především vlivu pufru a kombinace různých koncentrací sodných a hořečnatých iontů. Dalším úkolem byl návrh sekvence pro sledování specifity párování pomocí rozdílů v hybridizaci vůči plně a částečně komplementárním sekvencím a zjištění možností optimalizace specifity vazby na komplementární sekvenci volbou vhodné kombinace koncentrací sodných a hořečnatých kationtů.

V oblasti interakce oligonukleotidu (hybridního duplexu) s RNAsou H byly před zahájením diplomové práce provedeny jen první testovací měření, při kterých však nebylo možné sledovat štěpící účinek RNasy H v reálném čase. Cílem proto bylo pokusit se vyvinout a optimalizovat reakční assay, která by umožnila sledovat účinky RNasy H v reálném čase.

Zároveň měl být při práci sledován i další metodický cíl, a to nalezení a ověření vhodného postupu umožňujícího získávat z tvaru SPR senzogramu odhady velikostí kinetických konstant, které by nebyly zatížené chybou způsobenou omezeným transportem analytu v blízkosti povrchu senzoru.

# Kapitola 3

## Experimentální část

### 3.1 Chemikálie

Pro funkcionalizaci SPR čipů, imobilizaci potřebných typů oligonukleotidů a realizaci měření interakcí byly použity následující látky: Alkanthiloly s delším uhlovodíkovým řetězcem ( $C_{16}$ -mercaptohexadecanoic acid) a Streptavidin ze *Streptomyces Avidinii* byly pořízeny od firmy Sigma Aldrich, USA. Alkanthiloly s kratším uhlovodíkovým řetězcem zakončené di(ethylen glycol)ovou skupinou pocházejí z Prochimia, Polsko. N,N,N',N'-Tetramethyl-O-(N-succinimidyl)uronium tetrafluoroborát (TSTU) (čistý,  $\geq 98\%$ ) byl pořízen od Sigma Aldrich, USA. Absolutní ethanol je z firmy MERCK, Česká Republika. Bezvodé N, N-dimethylformamide (DMF) ( $\geq 98\%$ ), N-hydroxysuccinimide (NHS) a N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) pochází od firmy Sigma Aldrich, USA.

Biotinované oligonukleotidy (23mery, čištěné HPLC) o sekvenci biotin-(TEG)<sub>2</sub>-5'-d(CAG TGT GGA AAA TCT CTA GCA GT)-3' (označení BdO<sub>23</sub>), biotin-(TEG)-5'-(dA<sub>23</sub>)-3' (označení BdA<sub>23</sub>), komplementární oligonukleotid k BdO<sub>23</sub> 5'-d(ACT GCT AGA GAT TTT CCA CAC TG)-3' (označení CdO<sub>23</sub>) i částečně nekomplementární oligonukleotidy k BdO<sub>23</sub> (báze nekomplementární k BdO<sub>23</sub> jsou zvýrazněny podtržením), 5'-d(ACT GCT GGA GAT TTT CTA CAC TG)-3' (označení Mism2), 5'-d(ACT GCC AGA GAT CTT CCA TAC TG)-3' (označení Mism3), 5'-d(ACT GCC AGA AAT TCT CCA TAC TG)-3' (označení Mism4) a komplement k BdA<sub>23</sub> 5'-(dT<sub>23</sub>)-3' (označení dT<sub>23</sub>) byly získány z LMFR Masarykovy University v Brně, Česká republika. Všechny byly čištěné HPLC.

Biotinované oligonukleotidy pro studium RNasy H (30mery, čištěné HPLC) se sekvencí biotin-(TEG)<sub>2</sub>-5'-dC<sub>7</sub>-rA<sub>16</sub>-dC<sub>7</sub>-3' (označení BdCrA<sub>30</sub>), biotin-(TEG)<sub>2</sub>-5'-dC<sub>7</sub>-dA<sub>16</sub>-dC<sub>7</sub>-3' (označení BdCdA<sub>30</sub>) a komplementární 15mery (čištěné HPLC): 5'-(dT<sub>15</sub>)-3' (označení dT<sub>15</sub>) a 5'-(rU<sub>15</sub>)-3' (označení rU<sub>15</sub>) byly získány z Thermo Fisher Scientific, Inc., USA.

Ribonukleasa H *E. Coli* byla získána z firmy Invitrogen, USA.

Pufry používané pro vazbu streptavidinu a oligonukleotidů a studium RNasy H byly následujícího složení: **SA** (10 mM octan sodný, pH 5,0 při 20°C); **PBNa** (1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O, 0,75 M NaCl, 2,7 mM KCl, pH 7,4 při 20°C); **Tris** (10 mM Tris-HCl, pH 7,4 při 20°C, s různým množstvím přidávaných solí: 0-15 mM MgCl<sub>2</sub>, 0-1000 mM NaCl); **Caco** (10 mM

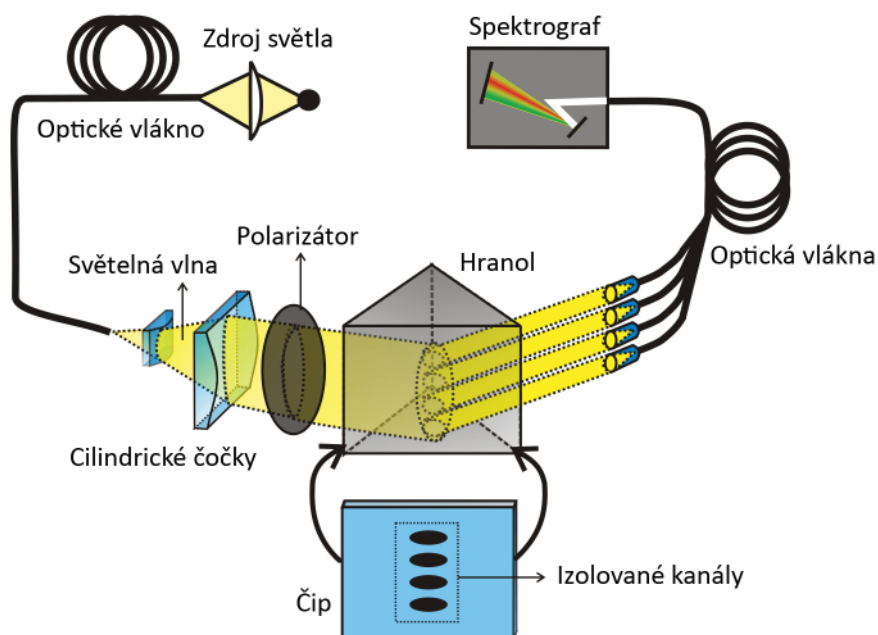
Cacodylát sodný, pH 7,4 při 20° C); **Hepes** (10 mM, pH 7,4 při 20° C); **PB** (1,4 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 8 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 2,7 mM KCl, pH 7,4 při 20° C); **RNS** (75 mM KCl, 50 mM Tris-HCl, 3 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM dithiothreitol, pH 8,3 při 25° C).

### 3.2 Čtyřkanálový SPR senzor

Aktivní plochu SPR senzoru tvořil skleněný čip (sklo SF14, rozměry: 32 mm × 18 mm × 1,5 mm; Schott, USA), na kterém byla nanášena adhezní titanová vrstva o tloušťce 2 nm a pomocí napařování elektronovým svazkem zlatý film (tloušťka 55 nm). Po napaření byly čipy opláchnuty absolutním ethanolem a vodou, poté 15 minut umístěny v ozon-cleaneru, znovu umyty vodou a vysušeny čistým dusíkem. Pro uchování čistoty čipů byla většina operací s nimi prováděna ve flow-boxech (Schoeller-Pharma, Česká Republika).

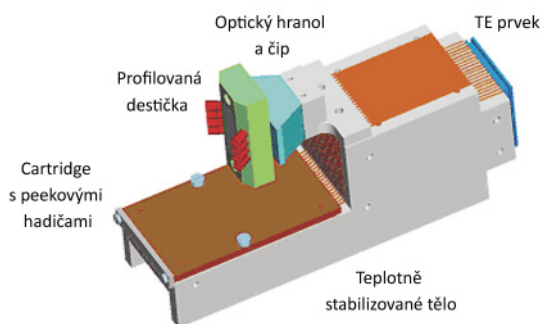
Čip byl pomocí imersní kapaliny přiveden do optického kontaktu s optickým hranolem a přes něj pak osvětlen širokospektrálním světlem halogenové lampy, které bylo předtím zkolimováno a polarizováno (viz obr. 8). Úhel dopadu byl přibližně 66°. Na zlatém povrchu byl tak excitován povrchový plasmon (excitační vlnová délka byla okolo 750 nm). Díky tomu vznikl ve spektru zářez odpovídající excitační vlnové délce plasmonu. Odražené světlo ze čtyř míst, kde byly vytvořeny průtočné komůrky (viz níže), bylo navázáno do čtyř optických vláken a jeho spektrum změřeno čtyřkanálovým spektrografem (S2000, Ocean Optics, USA). Spektra byla v reálném čase analyzována softwarem umožňujícím určit rezonanční vlnovou délku pro každý kanál (Nenninger et al. 2002). Na čip byla přiložena profilovaná destička se čtyřmi izolovanými průtočnými komůrkami, která zaručovala dopravu vzorku v průběhu experimentu. Poloha průtočných komor byla přesně nastavena na místa, kde byly excitovány povrchové plasmony. Hloubka komor byla přibližně 50 μm a objem byl přibližně 1–3 μL v závislosti na nastavení přítlačné síly držáku proslouvané destičky. Pro dopravování vzorků a udržování stabilního průtoku byla použita peristaltická pumpa (Reglo, Ismatech, Švýcarsko).

Během měření bylo možné kontrolovat teplotu, při které byly molekulární interakce monitorovány. Teplota byla stabilizována pomocí Peltierova termoelektrického elementu instalovaného do tepelně stabilizovaného tělesa držáku senzoru (obr. 9) a termoregulační jednotky (ILX Lightwave, USA). Teplotně stabilizovaným tělesem procházely i tenkostěnné peakové hadičky, kterými protékal vzorek. Před vstupem do průtočné komůrky se tak stabilizoval na požadovanou teplotu. Přesnost nastavení teploty byla ±0,2 °C (omezená přesností kalibrace termistoru). Během experimentů byly používány teploty v rozsahu 20–40 °C.



**Obr. 8:** Schematické znázornění 4kanálového SPR senzoru.

Odezva senzoru může být kalibrována na povrchovou koncentraci navázaných molekul. Kalibrační koeficient, který spojuje odezvu senzoru a koncentraci analytu, je úměrný molární hmotnosti dané molekuly (Liedberg et al. 1993) a závisí na rezonanční vlnové délce. Z teoretického modelu bylo odhadnuto, že při rezonanční vlnové délce 750 nm odpovídá posun rezonanční délky o 1 nm změně povrchové koncentrace streptavidinu přibližně o  $1,8 \cdot 10^{11}$  molekul/cm<sup>2</sup>. Kalibrace odezvy senzoru dosti dobře platí pro většinu proteinů a jednovláknové i dvouvláknové oligonukleotidy (Su et al. 2005). Pokud se uvaží rozdílná molekulová hmotnost, poměr navázaných oligonukleotidů na jeden streptavidin a úspěšnost hybridizace mohou být spočítány z poměru odezvy senzoru. Aby mohla být naměřená data porovnávána a kvantifikována, byla odezva senzoru kalibrována na rezonanční vlnovou délku 750 nm.



**Obr. 9:** Schéma teplotní stabilizace na 4kanálovém SPR senzoru.



### 3.3 Funkcionalizace SPR čipů

Imobilizace oligonukleotidů na zlatý povrch byla založena na nekovalentní, vysoce afinitní a stabilní vazbě biotinylovaných jednovláknových (ss) ON na vrstvu streptavidinu. Streptavidin je tetramerní proteinový komplex, každá z jeho čtyř ekvivalentních subjednotek obsahuje jedno vazebné místo pro biotin (Hendrickson et al. 1989). Streptavidin byl pomocí amidové vazby navázán na samouspořádanou vrstvu alkanthiolů (self-assembled monolayer, SAM) (Jung et al. 1999). Funkcionalizační procedura probíhala způsobem popsáným níže.

Zlaté čipy byly očištěny v ozon-cleaneru, několikrát opláchnuty etanolem a vodou a osušeny dusíkem. Poté byly ponořeny do odvzdušněného 1 mM roztoku thiolů v absolutním ethanolu, ve kterém byly v poměru 7:3 smíchány kratší a delší alkanthioly. Čipy ponořené v tomto roztoku byly krátce zahřáty na 40 °C a přes noc ponechány při pokojové teplotě na tmavém místě. Během této doby se na povrchu čipu vytvořila uspořádaná vrstva alkanthiolů. Thioly C<sub>16</sub> zakončené karboxylovou skupinou zajišťovaly následnou vazbu streptavidinu pomocí amidové vazby. Kratší thioly zakončené diethylenglykolovou skupinou sloužily k zablokování zbylých možných vazebných míst na zlatém povrchu a zabraňovaly tak nespecifickým vazbám. Následná aktivace karboxylových skupin probíhala při jemném třepání v roztoku TSTU v DMF (1 mg/mL) a probubláním argonem (≥99,999 %). Aktivací byly karboxylové skupiny nahrazeny reaktivními N-hydroxysuccinimidyl-estery. Alternativně byla použita aktivace pomocí NHS a EDC, kterou bylo možné provádět přímo *in situ* na čipu zabudovaném v senzoru (viz dále).

Čip byl pak vyjmut z aktivačního roztoku resp. z roztoku thiolů, opláchnut ethanolem a vodou a téměř okamžitě umístěn do SPR senzoru. Při aktivaci roztokem NHS a EDC byl čip *in situ* omýván deionizovanou vodou, poté 5 minut inkubován v roztoku NHS a EDC v deionizované vodě (NHS: 5,76 mg/mL, EDC: 38,3 mg/mL) a opět omýván deionizovanou vodou. Navázání streptavidinu bylo prováděno při teplotě 25 °C a průtoku 30 μL/min. Napřed byl povrch v kontaktu s SA pufrém, dokud nebylo dosaženo stabilní odezvy. Poté byl povrch 20 minut inkubován v SA pufru se streptavidinem o koncentraci 50 μg/mL. Následoval opět pufr SA a potom PBNa, což je pufr s velkou iontovou silou, který měl za úkol odstranit z povrchu nekovalentně navázané molekuly streptavidinu. Povrch senzoru byl nakonec ještě jednou omýván SA pufrém. Při měřeních s RNasou H byl povrch poté ještě 5 minut inkubován v 1 mM ethanolaminu, aby byly deaktivovány zbylé karboxylové skupiny a nedocházelo k vazbě RNasy H na povrch.



### 3.4 Protokol měření hybridizace nukleových kyselin

Studium hybridizace krátkých syntetických oligonukleotidů probíhalo za teploty 25 °C a při průtoku 30 μL/min. Na obr. 10 je zachycena typická odezva senzoru na imobilizaci streptavidinu, biotinylovaného oligonukleotidu a následnou hybridizaci. Streptavidinem pokrytý čip byl inkubován ve studovaném pufru s přidavkem solí, dokud nebyla dosažena stabilní odezva. Přes povrch poté 15 min. protékal 100 nM roztok biotinylovaných oligonukleotidů. Během této doby bylo dosaženo rovnováhy a ustálení odezvy. Poté byl k povrchu opět přiveden pufr. Množství navázaných oligonukleotidů bylo určeno z porovnání odezvy senzoru v pufru před a po inkubaci povrchu v roztoku oligonukleotidu.

Poté byl povrch 15 minut inkubován ve 100 nM roztoku komplementárních, nebo částečně komplementárních oligonukleotidů a byla pozorována tvorba jeho komplexu s imobilizovaným oligonukleotidem. Následně byl k povrchu opět přiveden pufr. Množství navázaných oligonukleotidů bylo určeno jako rozdíl odezvy senzoru v pufru před inkubací ON a těsně po ní (tedy co nejdříve po započítání disociace).

#### 3.4.1 Určení úspěšnosti hybridizace

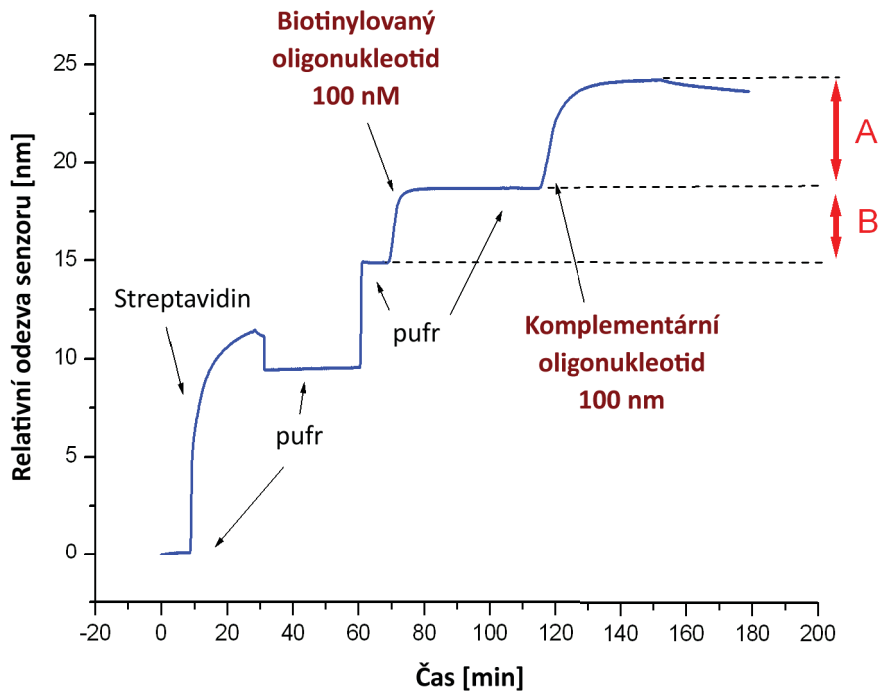
Důležitým parametrem pro kvantifikaci hybridizace je úspěšnost hybridizace, která vyjadřuje relativní množství ssON, které utvořilo komplex s imobilizovaným ON na povrch senzoru. Je rovna jedné, pokud 100 % vláken biotinylovaných ON vytvořilo duplex, pokud k vytvoření duplexů nedošlo, je rovna 0. Úspěšnost hybridizace byla vypočítána podle následujícího vztahu (viz obr. 10):

$$HE = \frac{A}{B} \cdot \kappa \quad (5)$$

kde  $A$  je saturační úroveň navázaného komplementárního ON a  $B$  je saturační úroveň biotinylovaného ON.  $\kappa$  je faktor odrážející rozdílné molekulární váhy biotinylovaného ON ( $M_r$  BdO<sub>23</sub> je 7,6 kDa) a ON s ním vytvářející duplex ( $M_r$  CdO<sub>23</sub> je 7,0 kDa).

Z úspěšnosti hybridizace je možné modifikací vztahu (3) určit rovnovážnou konstantu tvorby duplexů:

$$K = \frac{k_a}{k_d} = \frac{HE\%}{\alpha_0(1 - HE\%)} \quad (6)$$



**Obr. 10:** Typická odezva senzoru na funkcionalizaci SPR čipu, imobilizaci biotinylovaného oligonukleotidu a následnou hybridizaci.

### 3.4.2 Korekce na množství navázaného streptavidinu

Z opakovaných měření se ukázalo, že množství navázaného streptavidinu ovlivňuje výslednou úspěšnost hybridizace. Při vyšší povrchové koncentraci streptavidinu jsou některé oligonukleotidy imobilizovány ve stéricky méně výhodných polohách, proto klesá úspěšnost hybridizace. Data byla proto korigována podle empirického vztahu:

$$HE(S) = HE_{kor} \frac{3 - f(S)}{3}, \quad f(S) = \frac{dS^2}{1 + dSS_0 - \frac{2S}{S_0} + \frac{S^2}{S_0^2}} \quad (7)$$

kde  $S$  je odezva senzoru na množství navázaného streptavidinu,  $HE(S)$  je naměřená úspěšnost hybridizace a  $HE_{kor}$  je extrapolovaná úspěšnost hybridizace při nulovém pokrytí streptavidinu.  $S_0$  a  $d$  jsou parametry, které byly získány fitováním sady 21 měření hybridizace v Tris s 15 mM  $MgCl_2$  za různých povrchových koncentrací streptavidinu. Jejich hodnoty jsou:

$$S_0 = (15 \pm 1) \text{ nm}$$

$$d = (0.0011 \pm 0.0006)$$

### 3.4.3 Asociační a disociační rychlostní konstanty

Pokud je člen obsahující disociační konstantu v rovnici (2) velmi malý, je možné ho zanedbat proti druhému členu a získat asociační rychlostní konstantu přímo z odezvy senzoru v průběhu asociační fáze:

$$k_a = \frac{d\xi(t)}{dt} \frac{1}{\alpha_0(\xi_s \kappa - \xi(t))} \quad (8)$$

kde  $\alpha_0$  je koncentrace komplementárního ON,  $\xi(t)$  je odezva senzoru,  $\xi_s$  je množství navázaných biotinylovaných oligonukleotidů a  $\kappa$  je faktor, který udává převrácený poměr molekulové váhy biotinylovaného ON a ON s ním vytvářejícího duplex.

Při omývání povrchu pufrům bez přítomnosti komplementárních ON dochází při dostatečně rychlém transportu (nulová koncentrace volného ON) pouze k disociaci vytvořených duplexů. Přímo z odezvy senzoru je pak možné určit rychlostní disociační konstantu:

$$k_d = - \frac{d\zeta(t)}{dt} \frac{1}{\zeta_{SD} - \zeta(t)} \quad (9)$$

kde  $\zeta_{SD}$  je množství vytvořených duplexů a  $\zeta(t)$  je absolutní úbytek během disociace. Hodnota  $\zeta_{SD} - \zeta(t)$  udává množství zbývajících duplexů na povrchu v čase  $t$ .

Data byla pro studium kinetik vyhlazena filtrem Savitzky-Golay 2. stupně. (Savitzky and Golay 1964). Velikost filtru musela být zvolena tak, aby došlo k dostatečnému vyhlazení šumu a zmenšení kolísání derivace. Za optimální byl zvolen symetrický filtr velikosti 10. Vyhlazení pomocí filtrů nižších velikostí nenabízela dostatečné zmenšení kolísání derivace. Filtry větších velikostí vykazovaly jen malé zlepšení za cenu značně větší výpočetní náročnosti.

# Kapitola 4

## Výsledky a diskuze

### 4.1 Studium hybridizace nukleových kyselin

Předmětem studia byl vliv vnějšího prostředí na úspěšnost hybridizace krátkých oligonukleotidů na povrchu SPR senzoru. Přednostně byl sledován vliv kombinací koncentrací sodných a hořečnatých solí a vliv typu použitého pufru.

Testovacím systémem byly krátké syntetické DNA 23mery. Pro studium tvorby duplexů byl používán  $BdO_{23}$  a k němu plně komplementární  $CdO_{23}$ , nebo k  $BdO_{23}$  částečně komplementární Mism2, Mism3 a Mism4 se 2, 3 a 4 mismatchi (sekvence viz experimentální část). Tvorba triplexů byla studována na 23meru  $BdA_{23}$  a k němu komplementárním  $dT_{23}$ .

Bylo vybráno 5 koncentrací sodných iontů (0, 50, 150, 500 a 1000 mM), a 4 koncentrace hořečnatých iontů (0, 1,5, 5 a 15 mM). Oba typy kationtů byly do pufru přidávány ve formě chloridových solí. Experimenty byly prováděny při teplotě 25 °C podle postupu uvedeného v experimentální části. Typická odezva senzoru na imobilizaci biotinylovaných ON a následnou hybridizaci je ukázána na obr. 10.

Hodnoty HE byly určovány podle vztahu (5). HE duplexů byly korigovány na povrchovou koncentraci streptavidinu podle vztahu (7).

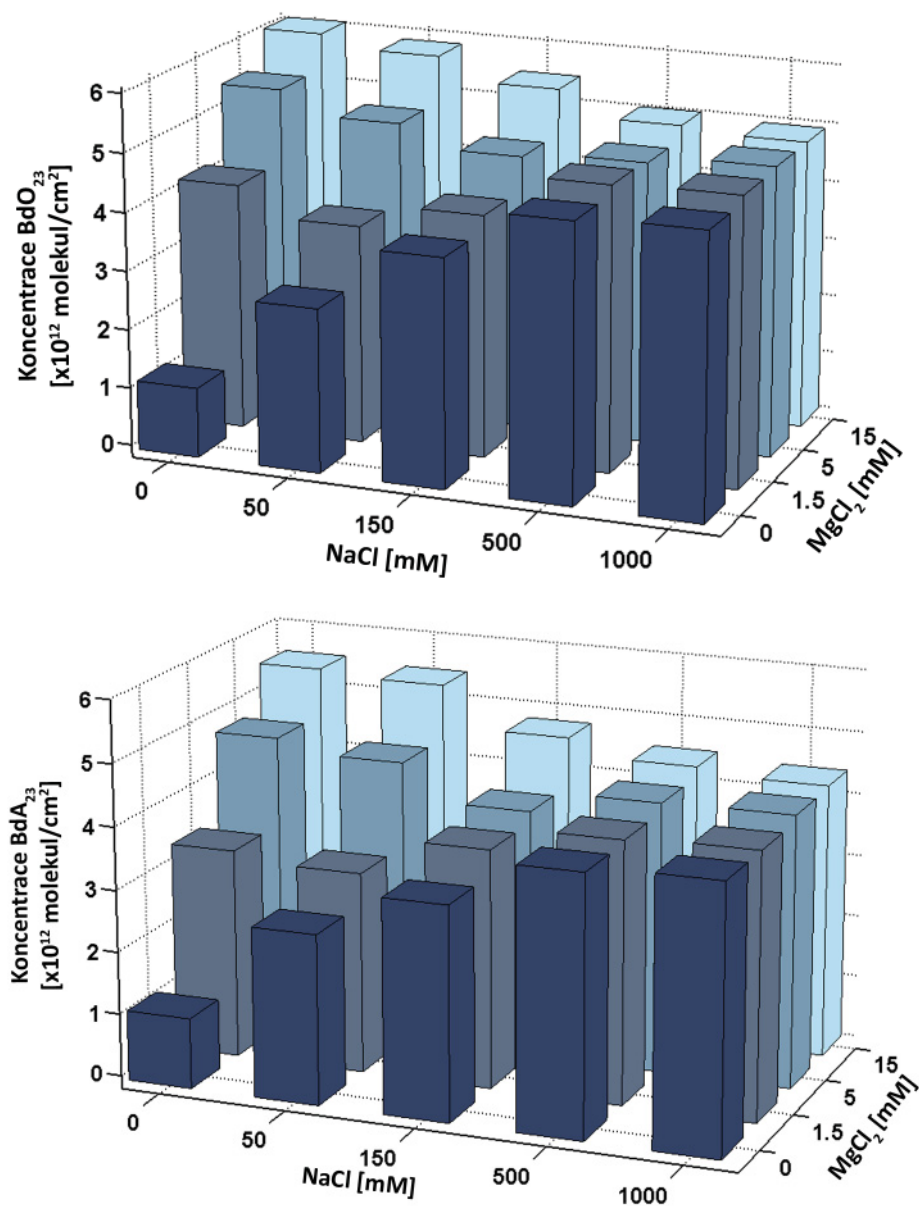
Reprodukovatelnost množství imobilizovaných oligonukleotidů a úspěšnosti hybridizace byla měřena v Trisu s 15 mM  $MgCl_2$ .

#### 4.1.1 Vliv koncentrace iontů na imobilizaci biotinylovaného ON

Na obr. 11 je zobrazena závislost množství imobilizovaného  $BdO_{23}$  a  $BdA_{23}$  na koncentraci NaCl a  $MgCl_2$  v Trisu. Byla zjištěna překvapivě silná závislost výsledné koncentrace imobilizovaných oligonukleotidů na koncentracích  $Na^+$  a  $Mg^{2+}$  iontů. Její tendence je obdobná tendenci závislosti úspěšnosti hybridizace (viz níže). Množství imobilizovaného streptavidinu a tedy vazebných míst pro biotin bylo při každém experimentu přibližně stejné.  $BdA_{23}$  systematicky vykazuje nižší úspěšnost imobilizace, než  $BdO_{23}$ .

Relativní chyba povrchové koncentrace biotinylovaných ON byla určena z 22 měření na 10 čípech v Trisu s 15 mM  $MgCl_2$ . Koncentrace  $BdO_{23}$  byla  $(6,11 \pm 0,06) \cdot 10^{12}$  molekul/cm<sup>2</sup>. Vzhledem k možným odchylkám, způsobeným např. odlišností thiolové vrstvy, stářím a kvalitou syntézy

oligonukleotidů aj. byl odhad relativní chyby určení povrchových koncentrací  $\text{BdO}_{23}$  a  $\text{BdA}_{23}$  zvýšen na 5 %.



**Obr. 11:** Závislost povrchové koncentrace biotinylovaných DNA 23merů na koncentraci solí v imobilizačním pufru. Měřeno v Trisu při 25 °C  
 $\text{BdO}_{23}$  (sekvence bazí viz experimentální část) [nahore].  $\text{BdA}_{23}$  [dole].

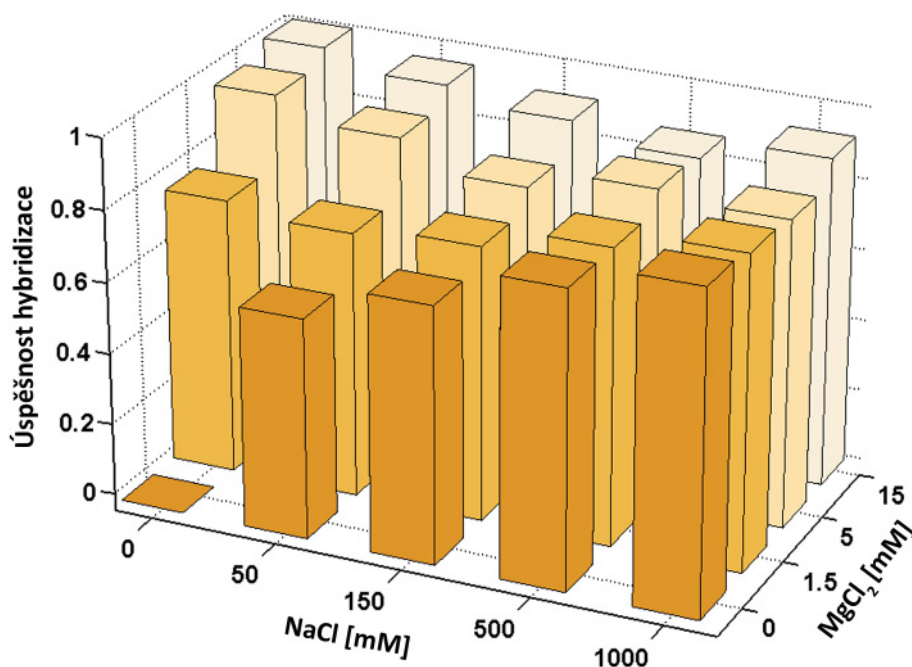
Z obr. 11 je zřejmé, že úspěšnost imobilizace roste se zvyšující se koncentrací  $\text{Na}^+$  nebo  $\text{Mg}^{2+}$  iontů. Přestože úroveň imobilizace v pufru s 1000 mM NaCl ještě není na úrovni pufru s 15 mM  $\text{MgCl}_2$ , je zvýšení úspěšnosti mezi 500 mM a 1000 mM velmi malé. Je tedy zřejmé, že další přidávání sodných iontů nad 1000 mM míru imobilizace již prakticky nezvýší. Podobně i při sledování

vlivu samotného hořčíku vidíme při koncentracích nad 5 mM  $\text{MgCl}_2$  postupné nasycení, ale dosažená úroveň je výrazně vyšší než úroveň dosažená přidáváním samotného sodíku.

Při konstantní koncentraci  $\text{Mg}^{2+}$  iontů vede přidání sodíku nejprve ke snížení úrovně imobilizace. Další zvyšování koncentrace  $\text{Na}^+$  pak postupně přibližuje hodnoty koncentrace imobilizovaných ON ke stejným hodnotám, jako by byly za dané koncentrace  $\text{Na}^+$  bez přítomnosti hořčíkových iontů. Jinými slovy, projevuje se kompetice mezi účinky iontů sodíku a hořčíku a při vysokém přebytku sodíku se účinky hořčíku ruší. Pokud je úroveň imobilizace při dané koncentraci hořčíkových kationtů zřetelně vyšší než hodnota pro vysoké koncentrace sodíkových iontů (15 mM  $\text{MgCl}_2$ ), je pokles účinnosti imobilizace s rostoucí koncentrací  $\text{NaCl}$  monotónní. U nižších koncentrací  $\text{MgCl}_2$  vykazuje však tato závislost lokálním minimum (viz obr. 11, puřry s kombinacemi hořečnatých a sodných iontů 50 mM  $\text{NaCl}$  + 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 150 mM  $\text{NaCl}$  + 5 mM  $\text{MgCl}_2$  a 500 mM  $\text{NaCl}$  + 15 mM  $\text{MgCl}_2$ ). Při konstantní koncentraci sodných iontů a měnící se koncentraci hořečnatých iontů není takové minimum pozorované.

#### 4.1.2 Vliv koncentrace iontů na hybridizaci plně komplementárních duplexů

Obr. 12 zobrazuje závislost úspěšnosti hybridizace plně komplementárních ON ( $\text{BdO}_{23}$  a  $\text{CdO}_{23}$ ) na kombinaci koncentrací sodných a hořečnatých iontů v Trisu. Na rozdíl od imobilizace biotiny-



Obr. 12: Závislost úspěšnosti hybridizace duplexů plně komplementárních DNA 23merů ( $\text{BdO}_{23}$  a  $\text{CdO}_{23}$ ) na povrchu senzoru na koncentraci solí. Měřeno v Trisu při 25 °C.

lovaných ON, při nulových koncentracích NaCl a MgCl<sub>2</sub> v pufru k hybridizaci vůbec nedochází. Přidání kationtů do roztoku je tedy pro hybridizaci zcela nezbytné.

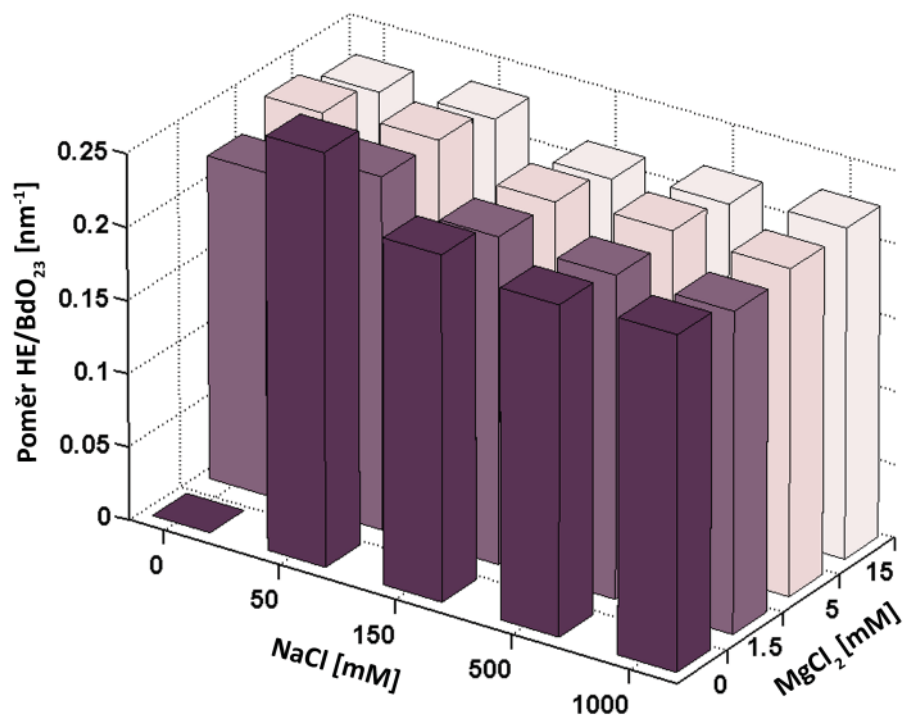
Při nenulovém přidavku kationtů jsou však závislosti HE na zvyšující se koncentrací Na<sup>+</sup> resp. Mg<sup>2+</sup> iontů velmi podobné situaci v případě imobilizace biotinylovaných ON: Přestože úspěšnost hybridizace v pufru s 1000 mM NaCl ještě není stoprocentní, další přidávání sodných iontů zřejmě povede jen k minimálnímu zlepšení (nasycení). Při přidávání pouze hořčíku se HE nad 5 mM MgCl<sub>2</sub> zvyšuje mnohem pomaleji než při nižších koncentracích hořečnatých iontů, ale stabilizující efekt hořčíku na duplexy je mnohem vyšší než stabilizační efekt 1 M sodíku; při 15 mM koncentraci MgCl<sub>2</sub> je úspěšnost hybridizace téměř rovna jedné (0,999), zatímco při 1000 mM NaCl je 0,92. Rovněž při konstantní koncentraci Mg<sup>2+</sup> iontů a měnící se koncentraci sodných iontů vykazují závislosti HE obdobný průběh jako v případě úspěšnosti imobilizace včetně lokálních minim při stejných kombinacích koncentrací sodíku a hořčíku, tj. 50 mM NaCl + 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 150 mM NaCl + 5 mM MgCl<sub>2</sub> a 500 mM NaCl + 15 mM MgCl<sub>2</sub>.

Relativní chyba úspěšnosti hybridizace byla podobně jako chyba povrchové koncentrace určena z 22 měření na 10 čípech v Trisu s 15 mM MgCl<sub>2</sub>. Po korekci na množství streptavidinu byla určena průměrná hodnota úspěšnosti hybridizace: (0,999±0,001). Podobně jako u určení povrchové koncentrace ON byl vzhledem k možným odchylkám v thiolových vrstvách a kvalitě ON byl odhad relativní chyby určení úspěšnosti hybridizace zvýšen na 2 %.

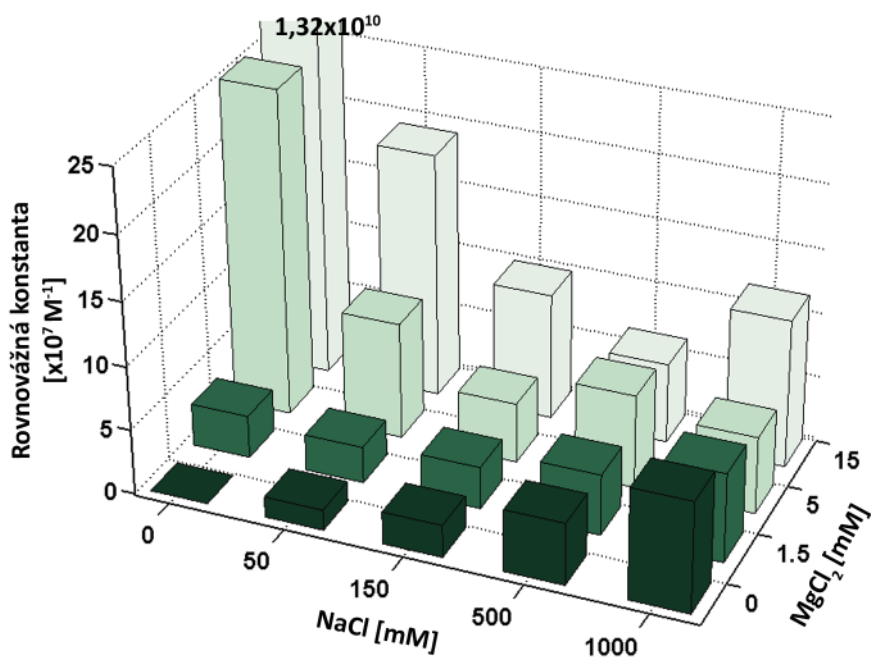
Pro ověření podobnosti závislostí pro úspěšnost imobilizace a hybridizace je na obr. 13 pro každou kombinaci koncentrací vynesena poměr úspěšnosti hybridizace a množství navázaného BdO<sub>23</sub> (v nanometrech). Tento poměr je pro většinu koncentrací solí téměř konstantní s určitou tendencí mírného zvýšení pro nulové koncentraci hořčíku. Toto zvýšení je výraznější při nižších koncentracích Na<sup>+</sup>. Celkovému trendu se samozřejmě vymyká situace při nulovém množství přidaných kationtů, kde nedochází k hybridizaci a tedy i daný poměr má nulovou hodnotu. Pro získání spojitě závislosti od situace bez přidaných kationtů k nejnižším množství přidaných kationtů, která byla použita, by bylo zřejmě nutné zmapovat úspěšnost imobilizace a hybridizace pro řádově nižší množství přidaných kationtů.

Z naměřené úspěšnosti hybridizace je možné podle vztahu (6) spočítat rovnovážnou konstantu tvorby duplexů. Závislost rovnovážné konstanty tvorby duplexů na koncentraci solí při 25 °C v Trisu je znázorněna na obr. 14. Hodnota úspěšnosti hybridizace při 15 mM MgCl<sub>2</sub> se blíží jedné. Díky rozdílu blízkých čísel ve jmenovateli vztahu (6) je možné určit jen spodní odhad rovnovážné konstanty, která je větší, než 1,32·10<sup>10</sup> M<sup>-1</sup>.





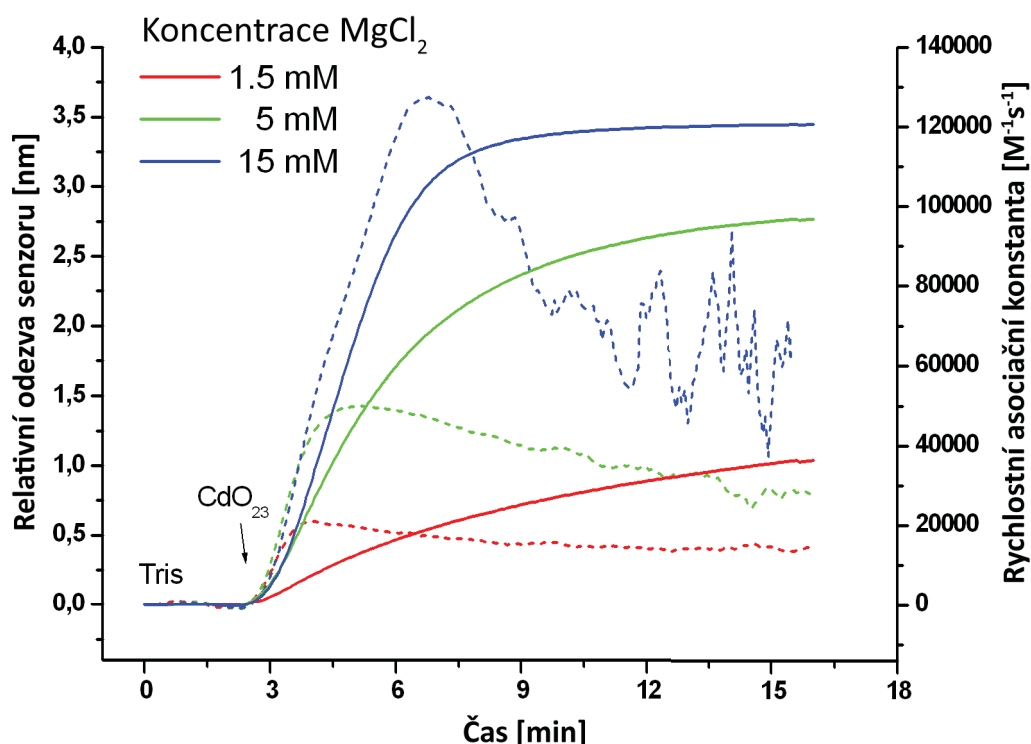
Obr. 13: Poměr úspěšnosti hybridizace tvorby duplexu BdO<sub>23</sub>·CdO<sub>23</sub> (rel. jednotky) a množství imobilizovaného ON (BdO<sub>23</sub>; v nanometrech) na povrchu senzoru v závislosti na koncentraci solí. Měřeno v Trisu při 25 °C.



Obr. 14: Závislost rovnovážné konstanty tvorby duplexů plně komplementárních DNA 23merů (BdO<sub>23</sub> a CdO<sub>23</sub>) na povrchu senzoru na koncentraci solí. Hybridizace byla měřena v Trisu při 25 °C.

### 4.1.3 Vliv koncentrace iontů na kinetiku hybridizace

Vytvořené duplexy disociují jen velice pomalu. Mohly být proto určeny asociační rychlostní konstanty hybridizace podle vztahu (8). Na obr. 15 je zobrazena odezva senzoru na hybridizaci  $\text{CdO}_{23}$  pro několik koncentrací hořčičných iontů. Čárkovaně je vynesena rychlostní asociační konstanta.

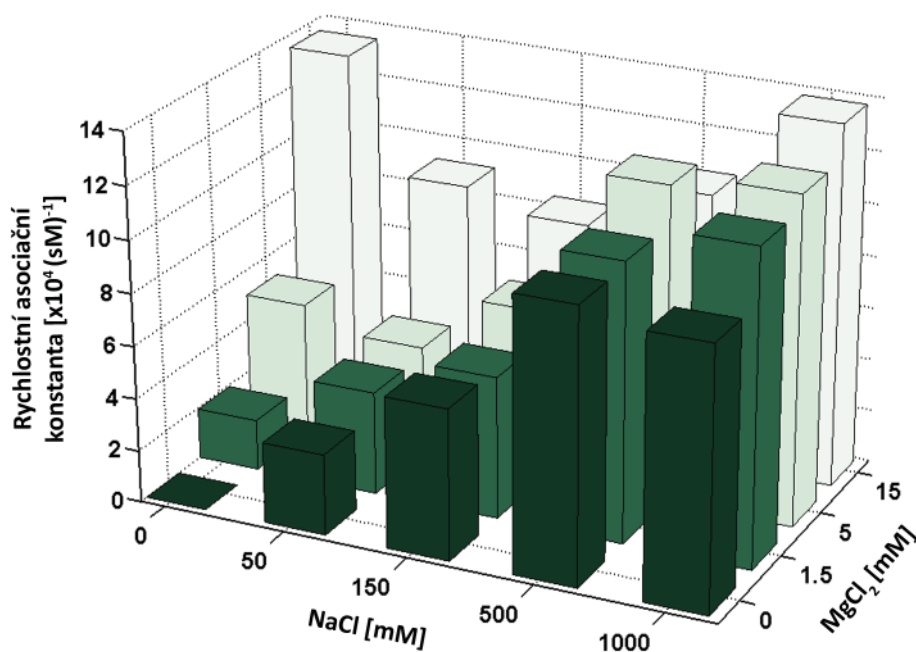


**Obr. 15:** Odezva senzoru na hybridizaci plně komplementárního 23meru ( $\text{CdO}_{23}$ ) s oligonukleotidem imobilizovaným na povrchu senzoru ( $\text{BdO}_{23}$ ) v Trisu s různými koncentracemi  $\text{Mg}^{2+}$  (plná čára). Rychlostní asociační konstanta vypočtená podle postupu uvedeného v experimentální části v každém bodě asociační křivky (čárkovaná čára).

Na začátku hybridizace jsou hodnoty vypočtené asociační konstanty nízké kvůli omezenému transportu ON k povrchu senzoru. Ty rychle rostou až dosáhnou maxima při vyrovnání koncentrace  $\text{CdO}_{23}$  u povrchu senzoru s objemovou koncentrací. Po dosažení maxima  $k_a$  pozvolna klesá. Projevuje se zde vliv zanedbaného disociačního členu, jehož velikost je úměrná koncentraci vytvořených duplexů. S rostoucí koncentrací duplexů roste proto vliv disociačního procesu na kinetiku v asociační fázi. V závěru asociační fáze je již nárůst odezvy senzoru velmi malý, což se projevuje nárůstem nahodilých chyb ve vypočtených asociačních konstantách. Jako reálná

asociační rychlostní konstanta hybridizace je proto brána její hodnota v konstantní části křivky určené podle vztahu (8), neboť je nejméně ovlivněna disociací i transportem.

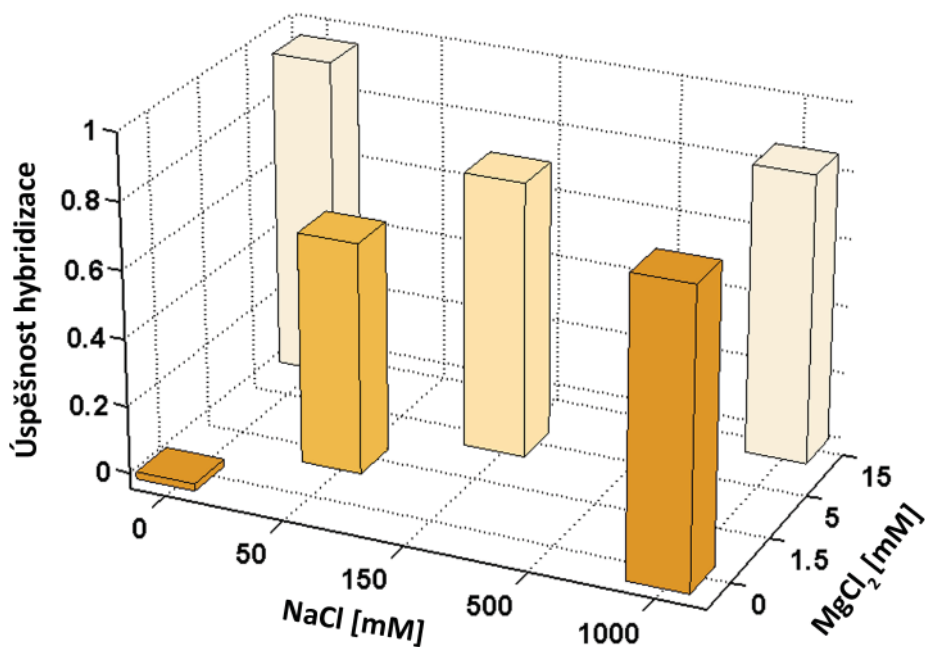
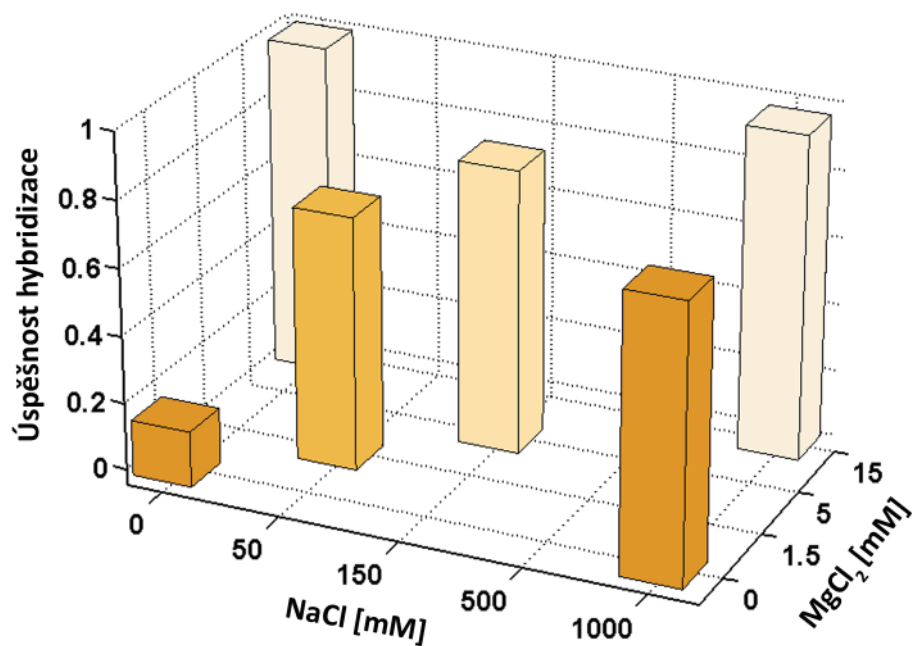
Závislost rychlostní asociační konstanty tvorby plně komplementárních duplexů je zobrazena na obr. 16. Rychlostní asociační konstanta vykazuje silnou závislost na přidaných iontech. Tato závislost je kvalitativně podobná závislosti úspěšnosti hybridizace (obr. 12). Výrazný je kompetiční efekt, kdy přidavek NaCl k roztokům s 5 mM a 15 mM  $MgCl_2$  vede nejprve ke zpomalení reakce a posléze opětovnému zrychlení až na rychlost odpovídající hybridizaci bez přidání hořčíku. Oproti rovnovážné konstantě je však výrazný rozdíl v tom, že vysoká koncentrace hořčíku (15 mM) vede jen ke srovnatelné velikosti asociační konstanty jako u nejvyšších koncentrací sodíku.



Obr. 16: Závislost rychlostní asociační konstanty tvorby plně komplementárního duplexu 23merů na koncentraci  $Mg^{2+}$  a  $Na^+$  iontů. Měření byla prováděna v Trisu při 25 °C.

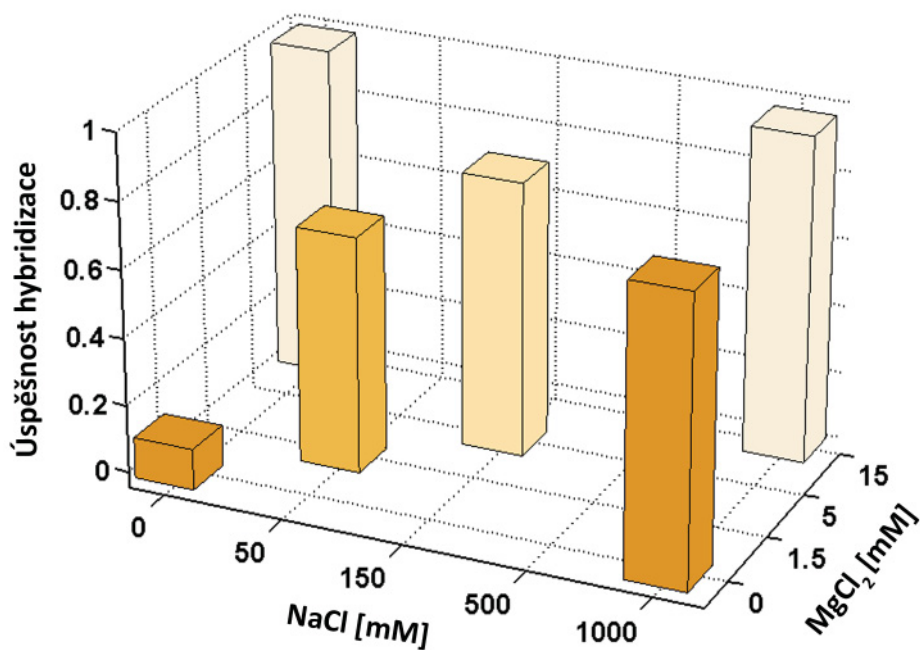
#### 4.1.4 Vliv typu pufru na hybridizaci plně komplementárních duplexů

Pro několik koncentrací ve studovaném rozsahu solí byla proměřena úspěšnost hybridizace plně komplementárních duplexů i ve třech dalších pufrech, a sice HEPES, kakodylátovém (Caco) a fosfátovém (PB) – obr. 17. Byla pozorována obdobná závislost úspěšnosti hybridizace na kombinaci koncentrací sodíku a hořčíku jako při měření v Trisu.



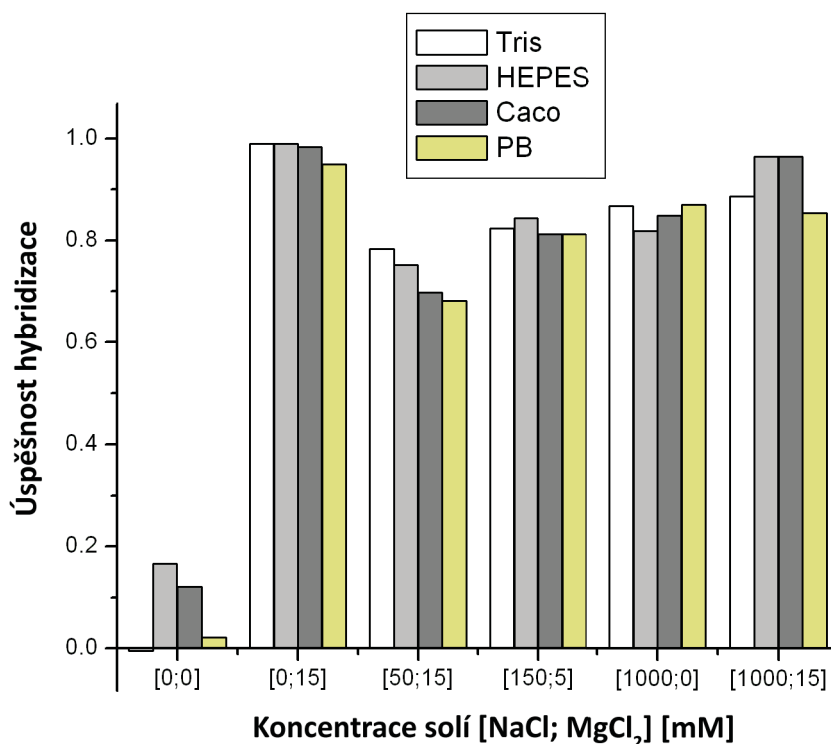
**Obr. 17a,b:** Závislost úspěšnosti hybridizace při tvorbě duplexů plně komplementárních DNA 23merů (BdO<sub>23</sub> a CdO<sub>23</sub>) na povrchu senzoru na koncentraci solí. Měřeno při 25 °C ve fosfátovém pufru (PB) [nahore], kakodylátovém pufru (Caco) [dole].

Výjimkou je hybridizace při nulovém přídavku NaCl a MgCl<sub>2</sub>, která je sice nízká, ale na rozdíl od Trisu je nenulová. To lze vysvětlit tím, že na rozdíl od Trisu u všech tří ostatních pufrů jsou použité sodné soli, takže v roztoku dochází k disociaci sodíku a i bez přídavku NaCl roztok obsahuje určitou koncentraci Na<sup>+</sup> iontů.



Obr. 17c: Závislost úspěšnosti hybridizace při tvorbě duplexů plně komplementárních DNA 23merů (BdO<sub>23</sub> a CdO<sub>23</sub>) na povrchu senzoru na koncentraci solí. Měřeno při 25 °C v pufru HEPES.

Obr. 18 zachycuje porovnání HE u všech čtyř pufrů po korekci na pokrytí streptavidinem. Naměřené rozdíly mezi pufrů nejsou systematické a lze je přinejmenším zčásti připsat na vrub experimentálním chybám. Při dalším studiu byla proto měření prováděna jen s pufrům Tris.



**Obr. 18:** Srovnání úspěšnosti hybridizace plně komplementárních DNA 23merů (BdO<sub>23</sub> a CdO<sub>23</sub>) v pufrch Tris, HEPES, Caco a PB pro několik koncentrací přidávaných Mg<sup>2+</sup> a Na iontů. Hybridizace byla měřena při 25 °C.

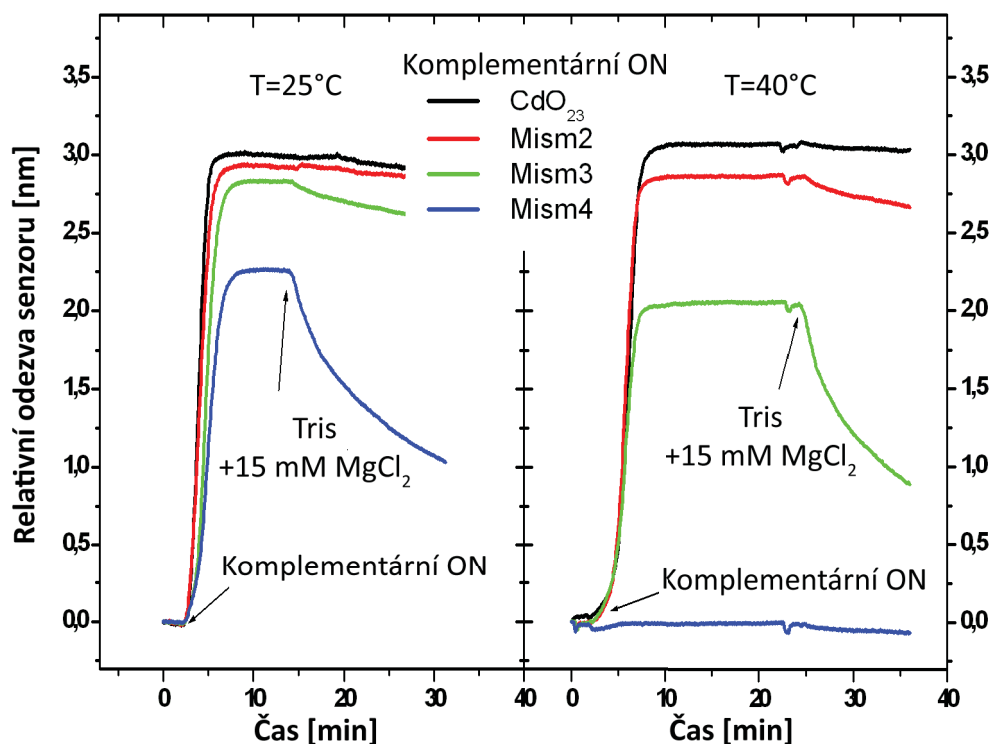
#### 4.1.5 Vliv koncentrace iontů na hybridizaci částečně komplementárních duplexů

Dalším předmětem studia byl vliv kationtů na stabilitu duplexů se 2, 3 a 4 nekomplementárními páry (mismatchi). Imobilizovaným ON byl BdO<sub>23</sub>, se kterým hybridizovaly částečně komplementární ON, které se od CdO<sub>23</sub> lišily ve 2-4 bazích (Mism2, Mism3 a Mism4). Na obr. 19 je zobrazeno porovnání odezvy senzoru na hybridizaci plně komplementárních a částečně nekomplementárních oligonukleotidů s imobilizovaným BdO<sub>23</sub> v Trisu s 15 mM MgCl<sub>2</sub>, měřených při teplotách 25 °C a 40 °C.

Při 25 °C vykazovaly duplexy s Mism2 téměř stejnou úroveň HE jako plně komplementární duplexy. S dalším růstem počtu nekomplementárních bázových párů pak viditelně klesala úspěšnost hybridizace a zrychlovala se disociace.

Při teplotě 40 °C se zvýraznily rozdíly mezi plně komplementárním ON a Mism2, Mism3. V případě Mism4 již tato teplota zřejmě je nad T<sub>m</sub> duplexu, a proto zde hybridizace nebyla téměř pozorována.

Pro studium vlivu koncentrace  $Mg^{2+}$  a  $Na^+$  iontů na stabilitu duplexů s mismatchi byly proto vybrány duplexy se 3 a 4 nekomplementárními páry (Mism3 a Mism4). Měření probíhala při teplotě 25 °C v Trisu podle stejného postupu jako studium hybridizace plně komplementárního  $CdO_{23}$ .

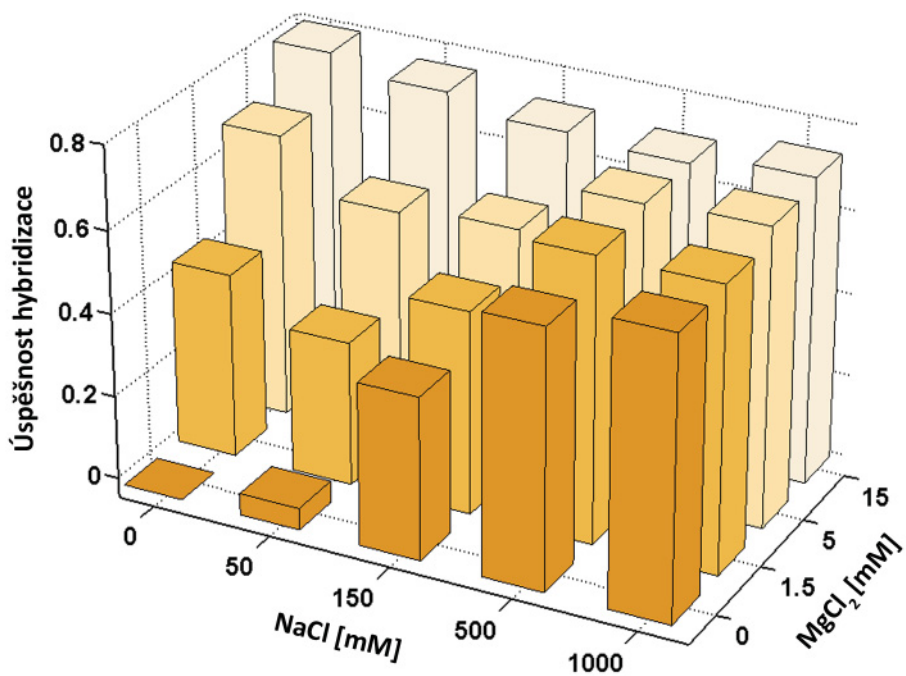
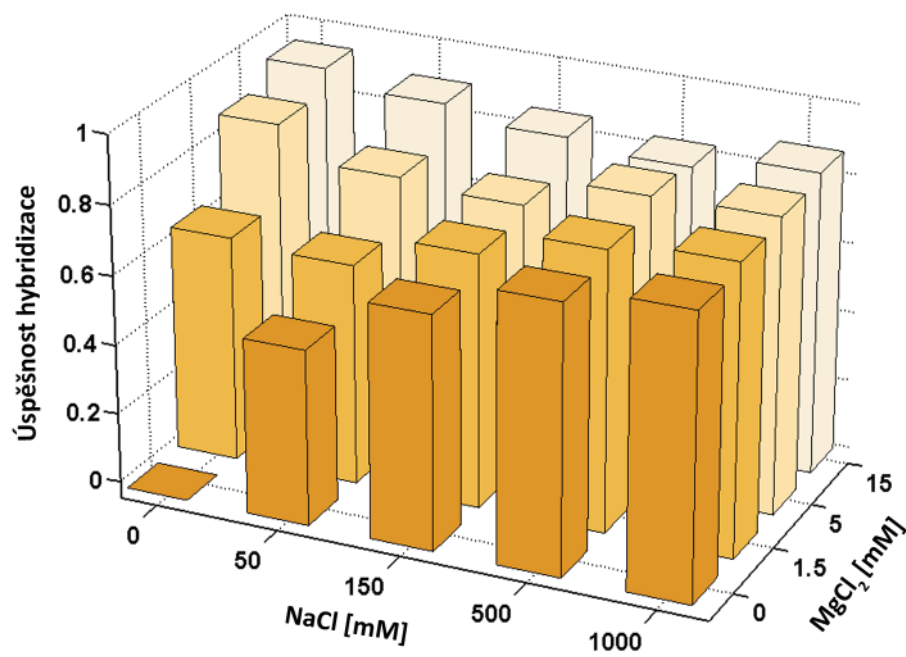


**Obr. 19:** Porovnání hybridizace plně komplementárního duplexu ( $BdO_{23}\cdot CdO_{23}$ ) a duplexu se 2, 3 a 4 mismatchi (komplex  $BdO_{23}$  s Mism2, Mism3 a Mism4) při 25 °C a 40 °C. Hybridizace byla měřena v Trisu s 15 mM  $MgCl_2$ .

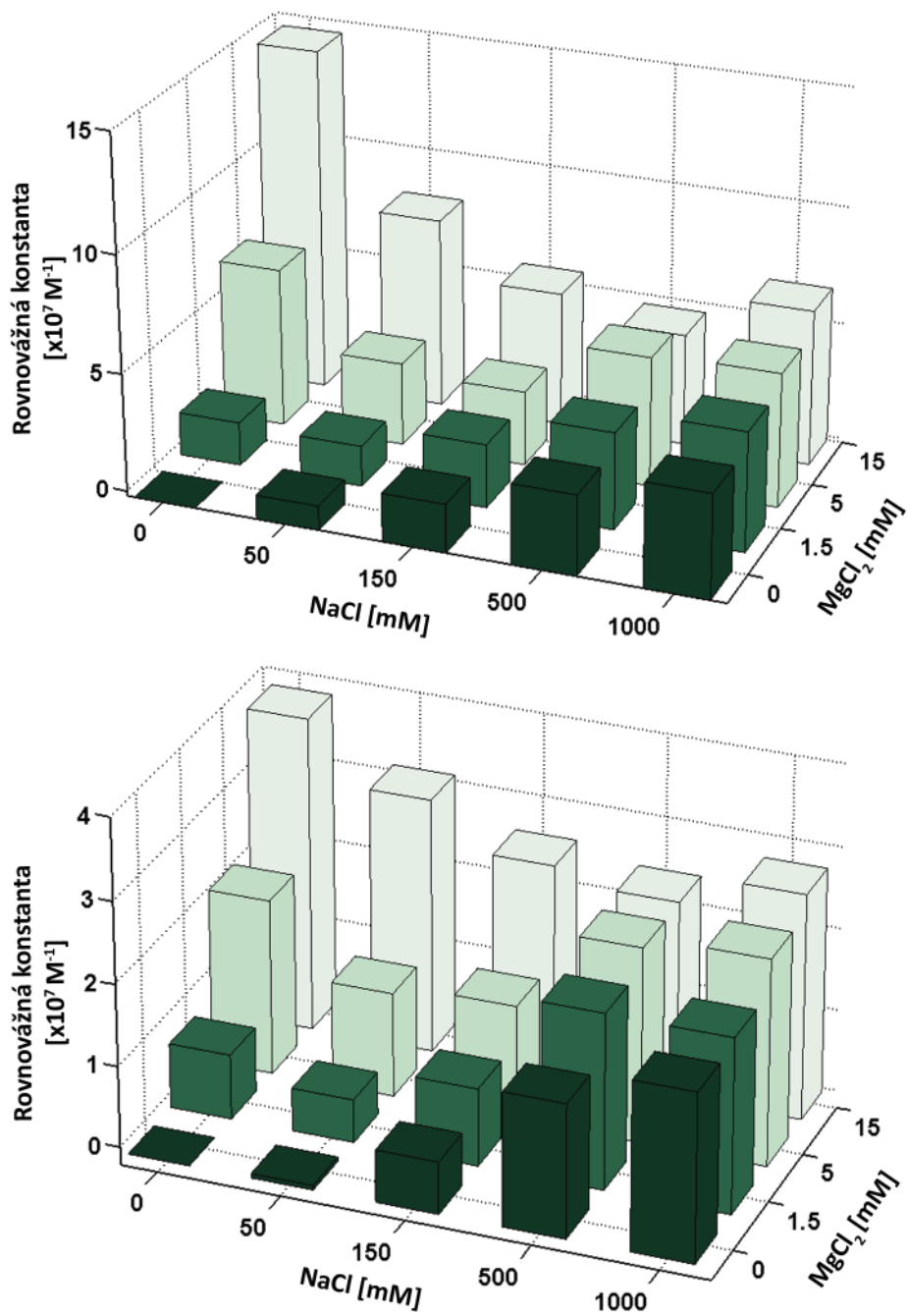
Získané závislosti HE na kombinaci koncentrací sodíku a hořčíku jsou zobrazeny na obr. 20. Je zřejmé, že i když jsou hodnoty HE nižší než v případě plně komplementárních duplexů, jsou tyto závislosti kvalitativně velmi podobné. U duplexu se 4 mismatchi je oproti plně komplementárnímu duplexu ještě zvládně lokální minimum při 1,5 mM  $MgCl_2$  + 50 mM NaCl.

Z úspěšnosti hybridizace je možné podle vztahu (6) vypočítat rovnovážnou konstantu duplexů. Rovnovážné konstanty tvorby duplexů se 3 a 4 mismatchi jsou zobrazeny na obr. 21. Oproti rovnovážným konstantám plně komplementárních duplexů jsou několikrát nižší, ale řádově zůstávají stejné.





**Obr. 20:** Závislost úspěšnosti hybridizace tvorby duplexů částečně komplementárních DNA 23merů imobilizovaných na povrch senzoru na koncentraci solí. Hybridizace duplexu se 3 mismatchi ( $BdO_{23}\cdot Mism3$ ) [nahore]. Hybridizace duplexu se 4 mismatchi ( $BdO_{23}\cdot Mism4$ ). Měřeno v při 25 °C v pufru Tris.



Obr. 21: Závislost rovnovážné konstanty tvorby duplexů částečně komplementárních DNA 23merů na povrchu senzoru na koncentraci solí. Duplex se 3 mismatchi (BdO<sub>23</sub>·Mism3) [nahore]. Duplex se 4 mismatchi (BdO<sub>23</sub>·Mism4) [dole]. Měřeno při 25 °C.

#### 4.1.6 Vliv koncentrace iontů na kinetiku hybridizace částečně komplementárních duplexů

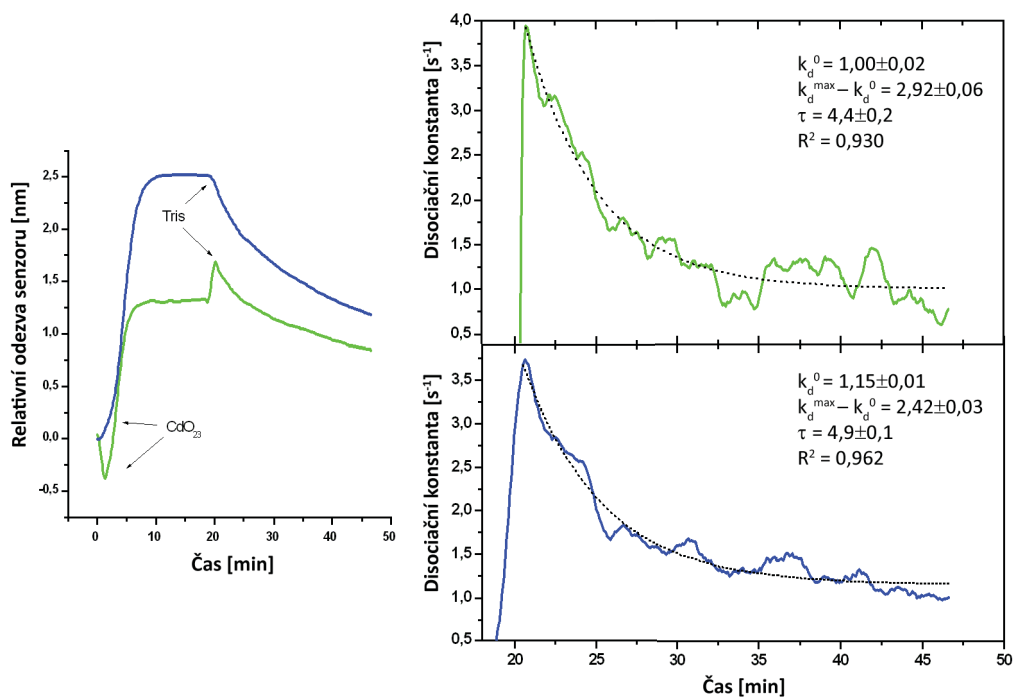
Nižší stabilita duplexů se čtyřmi nekomplementárními bázevými páry při teplotě 25 °C se projevuje zvýšenou disociací komplexů. Byl zkoumán vliv koncentrace iontů na rychlost disociace duplexů  $\text{BdO}_{23} \cdot \text{Mism4}$  v pufru bez přítomnosti komplementárních vláken (Mism4) a podle vztahu (9) určena disociační konstanta. Na obr. 22 vlevo je pro dvě koncentrace solí zobrazena odezva senzoru na hybridizaci částečně nekomplementárního vlákna (Mism4) s imobilizovaným ON ( $\text{BdO}_{23}$ ). Na obr. 22 vpravo je zobrazena disociační konstanta spočtená podle vztahu (9) pro každý bod časové závislosti odezvy senzoru v průběhu disociace duplexů. Pro reakci prvního řádu by měla být disociační rychlostní konstanta  $k_d$  stejná ve všech bodech disociační křivky. Disociační konstanta ale vykazovala u všech naměřených dat na začátku prudký pokles a poté se limitně blížila k hodnotě  $k_d^0$ . Dobře tomu odpovídala závislost:

$$k_d(t) = k_d^0 + (k_d^{\max} - k_d^0) e^{-\frac{t-t_0}{\tau}} \quad (10)$$

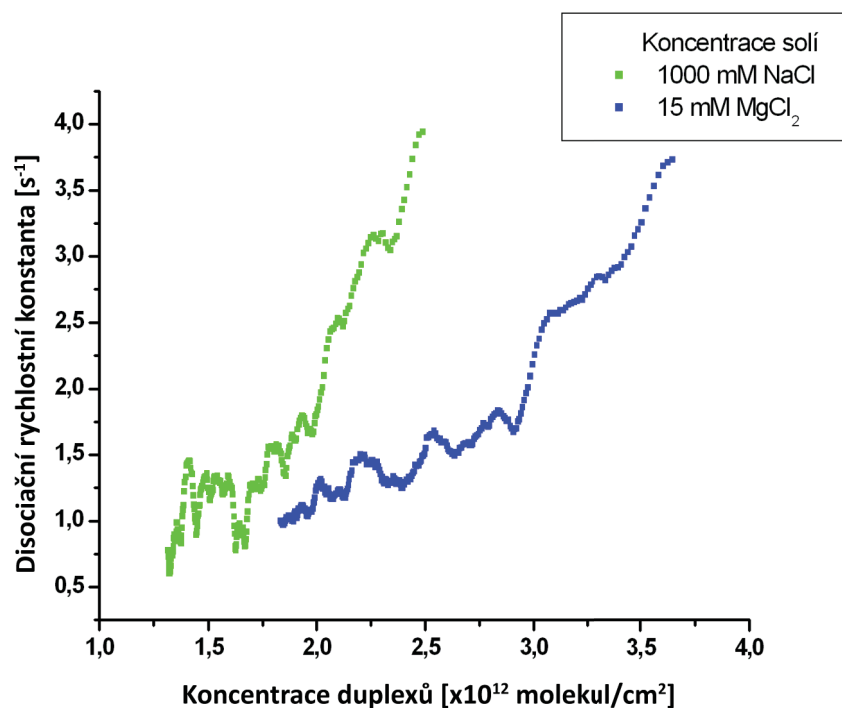
kde  $t_0$  je čas v počátku disociační křivky,  $\tau$ ,  $k_d^{\max}$  a  $k_d^0$  jsou fitované parametry.  $k_d^{\max}$  odpovídá disociační konstantě v saturační hladině asociační křivky, jejímuž převrácenému poměru je podle vztahu (6) úměrná rovnovážná asociační konstanta.  $k_d^0$  odpovídá disociační konstantě oligonukleotidů, ke které se  $k_d(t)$  blíží pro delší časy. Důvod, proč si  $k_d^{\max}$  a  $k_d^0$  nejsou rovny, je diskutován níže v sekci 4.1.8.

Ze závislosti okamžité  $k_d(t)$  na čase vyplývá její závislost na povrchové koncentraci duplexů, která je pro dvě koncentrace solí zobrazena na obr. 23. Pro všechny koncentrace solí byl zaznamenán nárůst  $k_d(t)$  s povrchovou koncentrací duplexů.

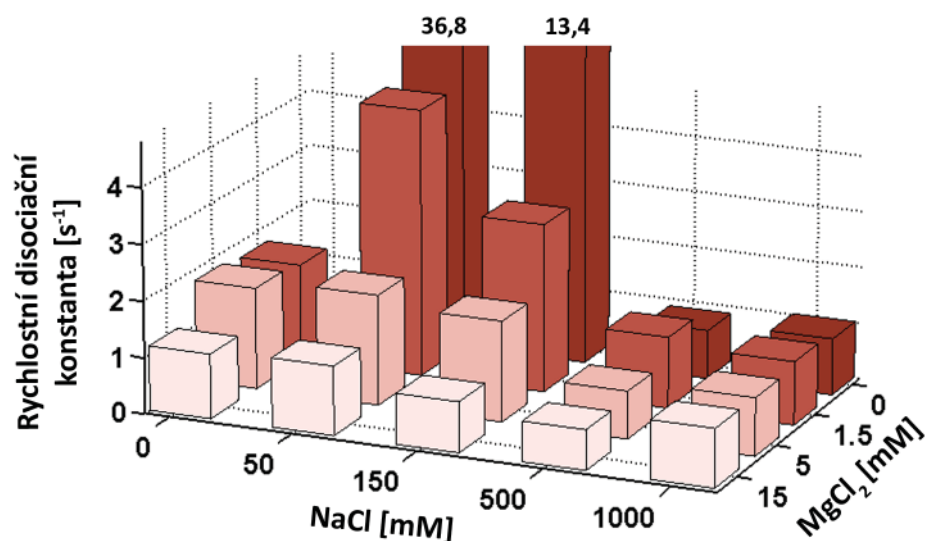
Pro dostatečně dlouhé časy se  $k_d(t)$  blíží ke  $k_d^0$  a vytrácí se její závislost na čase. Na obr. 24 je vynesena závislost  $k_d^0$  duplexu se 4 nekomplementárními bázemi na koncentraci solí. Koncentrace kationtů, kterým odpovídá menší rovnovážná asociační konstanta (viz obr. 21 dole), vykazují vyšší disociační rychlostní konstantu: Ve výrazném lokálním minimu v HE při 1,5 mM  $\text{MgCl}_2 + 50$  mM NaCl vykazují disociační konstanty výrazné lokální maximum. Podobná lokální maxima disociační konstanty se nacházejí při přidání 5 mM  $\text{MgCl}_2 + 50$  mM NaCl nebo 15 mM  $\text{MgCl}_2 + 50$  mM NaCl, která potvrzují kompetici v působení sodných a hořečnatých iontů. Překvapivě je disociační konstanta při 15 mM  $\text{MgCl}_2$  je větší, než disociační konstanta při 1000 mM NaCl, tento rozdíl však může být způsoben experimentální chybou v určení  $k_d^0$ .



**Obr. 22:** Odezva senzoru na hybridizaci částečně nekomplementárního 23meru (Mism4) s ON imobilizovaným na povrchu senzoru (BdO<sub>23</sub>) a následná disociace. Koncentrace solí: 15 mM MgCl<sub>2</sub> (modrá barva); 1000 mM NaCl (zelená barva) [vlevo]. Rychlostní disociační konstanta určena podle vztahu (9). Měřeno v Trisu při 25 °C. Data byla vyhlazena Savitzki-Golay filtrem (řád 2, velikost 10) [vpravo].



**Obr. 23:** Závislost disociační rychlostní konstanty duplexů se 4 nekomplementárními páry (Mism4· BdO<sub>23</sub>) na jejich koncentraci na povrchu senzoru. Rychlostní disociační konstanta byla určena v průběhu disociace v každém bodě odezvy senzoru podle vztahu (9). Měření byla prováděna v Trisu při 25 °C. Data byla vyhlazena Savitzki-Golay filtrem (řád 2, velikost 10).



**Obr. 24:** Závislost limitní hodnoty (pro malé množství vytvořených duplexů) rychlostní disociační konstanty částečně nekomplementárního duplexu 23merů ( $BdO_{23} \cdot Mism4$ ) na koncentraci solí. Osa koncentrací  $MgCl_2$  je invertovaná. Měření hybridizace byla prováděna v Trisu při 25 °C.

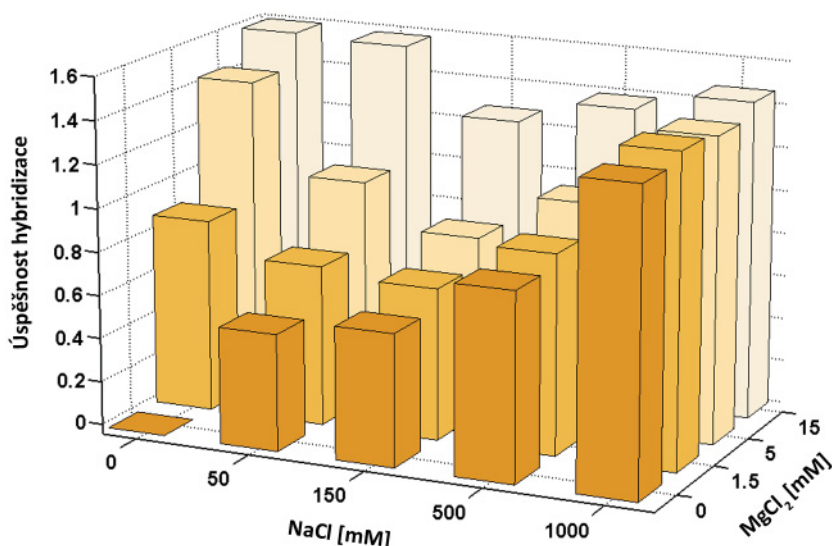
#### 4.1.7 Vliv koncentrace iontů na úspěšnost hybridizace triplexů

Byl studován vliv koncentrace kationtů na stabilitu triplexů. Na povrch senzoru byl imobilizován DNA 23mer polyA ( $BdA_{23}$ ) a s ním hybridizoval komplementární 23mer polyT. Duplexy deoxyribonukleotidů polyA a polyT mohou vytvořit v přítomnosti dalšího polyT vlákna triplex  $dT \cdot dA^* \cdot dT$ . Studium hybridizace probíhalo v Tris při teplotě 25 °C.

Obr. 25 zachycuje závislost úspěšnosti hybridizace  $BdA_{23}$  a  $dT_{23}$  na koncentraci kombinací sodných a hořečnatých kationtů. Hodnota úspěšnosti hybridizace větší než 1 ukazuje na podmínky, při kterých se na imobilizované polyA vlákno váže v průměru více než jedno vlákno polyT a tedy prokazatelně dochází k tvorbě triplexů. Jsou to oblasti 1000 mM koncentrace  $Na^+$ , 5 mM koncentrace  $MgCl_2$  bez přítomnosti sodíku a 15 mM koncentrací  $Mg^{2+}$  iontů i se všemi koncentracemi NaCl.

Podobně jako u duplexů, i triplexy jsou mnohem účinněji stabilizovány hořečnatými ionty, než ionty sodnými. HE při 15 mM koncentraci  $MgCl_2$  je 1,60 zatímco při 1000 mM koncentraci NaCl je 1,46.

Pokud jsou při nenulové koncentraci hořčiku přidávány sodné ionty, dochází ke snížení HE. Při dalším zvyšování koncentrace  $Na^+$  úspěšnost hybridizace a množství triplexů roste.



**Obr. 25:** Závislost úspěšnosti hybridizace 23meru BdA<sub>23</sub> imobilizovaného na povrchu senzoru a dT<sub>23</sub>, které mohou tvořit triplexy, na koncentraci solí. Měřeno v při 25 °C v pufru Tris.

#### 4.1.8 Vliv povrchu na hybridizaci imobilizovaných oligonukleotidů

Rovnovážná konstanta tvorby plně komplementárního duplexu 23merů určená v této diplomové práci ( $8,6 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ ) je srovnatelná s rovnovážnou konstantou, kterou pomocí SPR měření získal Peterson a kol. pro plně komplementární 25mery v prostředí s 1M NaCl ( $6 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ ) (Peterson et al. 2002). Na druhé straně však model nejbližších sousedů (SantaLucia 1998), který je všeobecně považovaný za věrohodný způsob teoretického stanovení rovnovážné konstanty pro volné duplexy v roztoku, dává rovnovážnou konstantu našeho 23meru v roztoku v 1M NaCl a teplotě 25 °C o velikosti  $1 \cdot 10^{23} \text{ M}^{-1}$ . Od námi určené hodnoty z hybridizačních měření na SPR senzoru se tedy liší o 16 řádů.

Při hledání vysvětlení tohoto rozdílu je třeba vyjít ze speciální situace, která vzniká při studiu hybridizace oligonukleotidů imobilizovaných na pevný povrch. Z molekulárních simulací vyplývá, že duplex 9merů v roztoku nahradí 825 molekul vody (Ivan Barvík, Jr. 2008). Pokud uvažujeme 10 nm širokou vrstvu při povrchu senzoru, ve které se ON nacházejí (délka 23meru je přibližně 7 nm), nachází se v 1 cm<sup>2</sup> této vrstvy bez přítomnosti ON  $3,35 \cdot 10^{16}$  molekul vody. Při pokrytí  $6 \cdot 10^{12}$  molekul/cm<sup>2</sup> představují duplexy objemový ekvivalent  $1,26 \cdot 10^{16}$  molekul vody. Poměr duplexů ku množství molekul vody 1:3 500. Objem zaujímaný ON je tak srovnatelný s objemem zaujímaným vodou.

Lokální objemovou koncentraci duplexů v blízkosti povrchu můžeme při pokrytí  $6 \cdot 10^{12}$  molekul/cm<sup>2</sup> tedy odhadnout na 10 mM, což je v porovnání s koncentracemi běžně používanými při

studiu interakcí ON v roztoku pomocí UV absorpce, CD, kalorimetrie nebo Ramanova rozptylu hodnota velmi vysoká. Bude proto hrát velmi výraznou roli nejen omezený objem vodního prostředí v okolí oligonukleotidů, ale i interakce s okolními ON. Největší vliv přitom budou mít ON nacházející se na jednom streptavidinu (velikost streptavidinu je přibližně 7 nm).

Poměr úspěšnosti hybridizace plně komplementárních duplexů a imobilizace biotinylovaného ON je pro všechny měřené koncentrace solí (až na nízké koncentrace sodných iontů) blízky jedné konstantní hodnotě (viz obr. 13). Průběh obou závislostí je tedy kvalitativně velmi podobný. Z toho lze usuzovat, že tyto dvě principiálně naprosto odlišné interakce jsou ovlivňovány stejným fyzikálním jevem.

Při hledání společného jmenovatele je možné vyloučit vliv interakce streptavidin-biotin, který se nachází jen u první reakce. Pravděpodobným původcem je tedy elektrostatické odpuzování polyanionických cukr-fosfátových řetězců, které po imobilizaci na povrch vytvoří velmi koncentrovanou vrstvu.

Navrhovaný mechanismus je takový, že při imobilizaci biotinylovaného ON na povrch senzoru postupně roste celkový záporný náboj imobilizovaných ON a zvyšuje se repulze ON. Při malých koncentracích iontů, kdy je záporný náboj na fosfátových skupinách nedostatečně kompenzován, tak po čase repulze vzroste natolik, že se biotinylovaný ON nedostane dostatečně blízko ke streptavidinu, aby s ním mohl interagovat. Tím se proces imobilizace zastaví.

Peterson a kol. experimentálně ověřili, že pokud musí komplementární řetězec pronikat do větší hloubky oligonukleotidové vrstvy, vede to k výraznému zpomalení kinetiky hybridizace (Peterson et al. 2002). Zatímco biotinylovaný oligonukleotid musí proniknout až ke streptavidinu, aby došlo k jeho navázání, komplementární ON hybridizuje se sekvencí, která je od streptavidinu vzdálená o 2 triethylen glycoly a navíc je mnohem pohyblivější v prostoru. To může vysvětlit, proč při nízkých koncentracích iontů už nedochází k imobilizaci biotinylovaných ON, i když vazebná místa pro biotin byla zaplněna jen z části, ale přitom k hybridizaci dochází. Výjimkou je situace, kdy v pufru nejsou přítomny žádné ionty. Tehdy je imobilizováno nenulové množství biotinylovaných ON (poměr molekul streptavidinu k počtu molekul imobilizovaného ON je 2:1), ale k hybridizaci vůbec nedochází, protože se komplementární ON nemůže přiblížit na dostatečně malou vzdálenost.

Přítomnost oligonukleotidů v těsné blízkosti duplexu může měnit parametry hybridizace, což je patrné i z disociačních konstant duplexu se 4 nekomplementárními bázeovými páry. Disociační konstanta je nejvyšší na začátku disociace a s klesající povrchovou koncentrací duplexů klesá, jak klesá povrchová koncentrace duplexů a repulze okolních oligonukleotidů (obr. 22 a 23). Li-



mitně blíží hodnotě  $k_d^0$ , rychlostní disociační konstantě duplexu volně v roztoku bez přítomnosti okolních oligonukleotidů.

Z výše uvedených výpočtů také plyne, že pokud by byla koncentrace iontů při povrchu stejná, jako koncentrace iontů v roztoku, tak by např. při 15 mM koncentraci  $\text{MgCl}_2$  připadalo by na jeden duplex jen necelý jeden hořčnatý iont, což je v rozporu s vysokou mírou úspěšnosti hybridizace. Koncentrace kationtů tak musí být v blízkosti povrchu zvýšena v důsledku přitažlivých interakcí s duplexem.

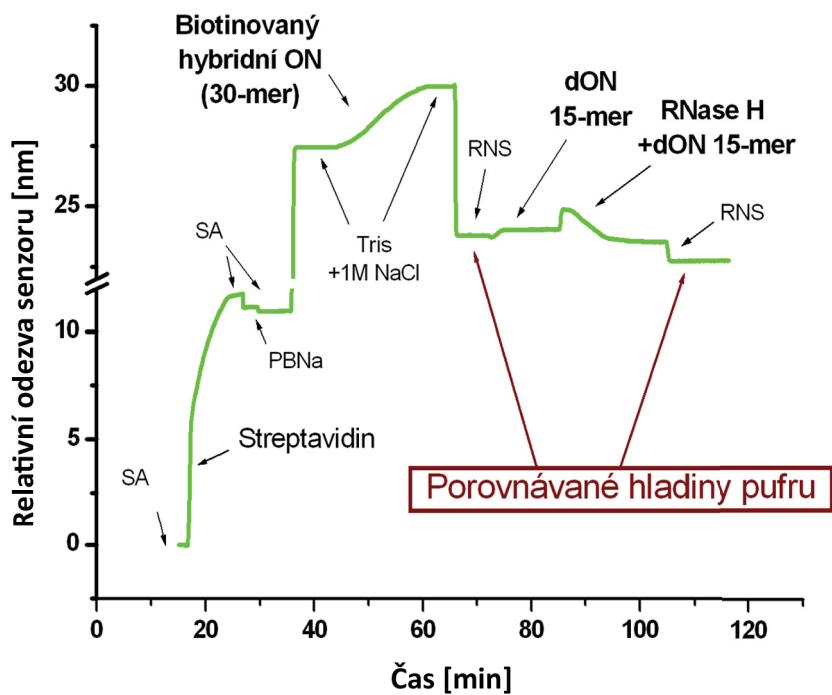
## 4.2 Studium Ribonukleasy H

Pro studium RNasy H byly použity biotinované hybridní oligonukleotidy se sekvencí biotin-(TEG)<sub>2</sub>-5'-dC<sub>7</sub>-rA<sub>16</sub>-dC<sub>7</sub>-3'. Na 16 rA ve středu sekvence se vázal 15mer dT<sub>15</sub> a tento hybridní duplex sloužil jako substrát pro RNasu H. Úvodní sekvence deoxycytidinů vytvářela větší vzdálenost mezi substrátem a povrchem senzoru a tím omezovala jeho vliv na studovanou reakci. Konečných 7 deoxycytidinů zvětšovalo hmotu odštípnutého vlákna a tak sloužilo k zesílení odezvy.

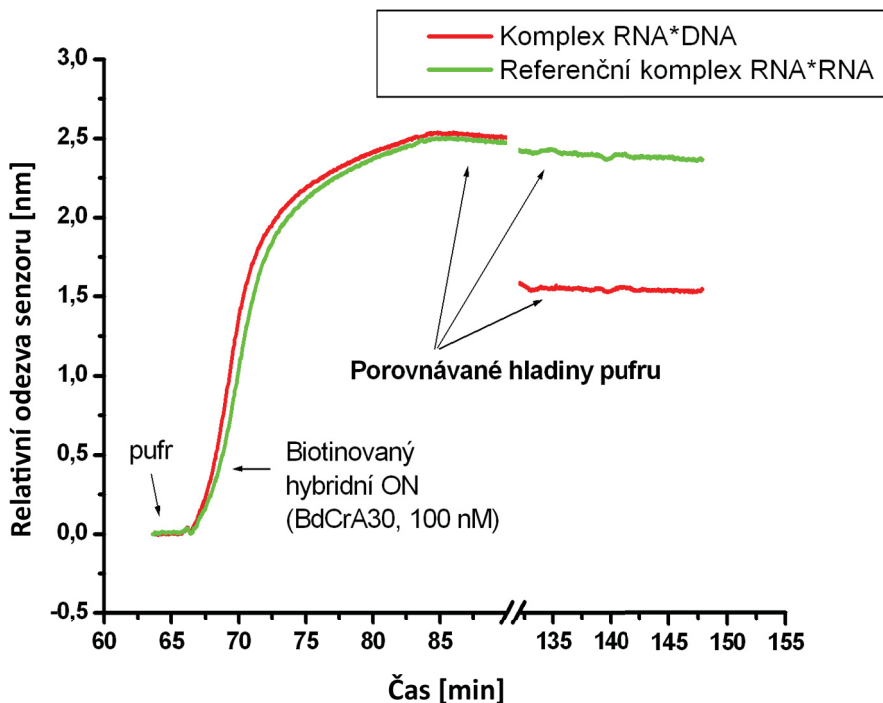
Navrhovaná assay se skládá z několika kroků (viz obr. 26): **(1)** Hybridní oligonukleotid byl na povrch imobilizován pomocí vazby streptavidin-biotin, jak je popsáno výše. Po imobilizaci biotinovaného ON byl povrch inkubován v RNS pufru dokud nebyla dosažena stabilní odezva senzoru. **(2)** Pak byl k povrchu přiveden roztok komplementárních 15merů a došlo k vytvoření hybridních duplexů. Duplexy krátkých RNA/DNA ON nejsou dostatečně stabilní, proto byl povrch po dosažení saturace bez přepnutí zpět do pufru ihned inkubován směsným roztokem těchto 15merů o nezměněné koncentraci a RNasy H. Těsně před začátkem inkubace byl z důvodu menší spotřeby průtok změněn na 20  $\mu\text{L}/\text{min}$ . **(3)** Poté byl povrch omýván opět RNS puftrem. Pokud během působení RNasy H nedošlo k úplné disociaci komplementárních vláken, byl povrch regenerován 2 % kyselinou mravenčí (v obrázku není ukázáno). Množství našťípaných biotinylovaných vláken bylo získáno porovnáním hladiny RNS pufru před dON a po RNase H. Procentuální množství je vztaženo k biotinylovanému ON po odečtení hmoty biotinu a TEG spacerů.

Pro ověření specifčnosti RNasy H byly testovány dva referenční systémy: DNA/DNA duplex (tvořený BdCdA<sub>30</sub> a dT<sub>15</sub>) a RNA/RNA duplex (tvořený BdCrA<sub>30</sub>/rU<sub>15</sub>). Nebyla pozorována žádná interakce enzymu s těmito komplexy (obr. 27).

Pro optimalizaci navrženého schématu monitorování funkce RNasy H v co největší míře byl napřed zkoumán vliv množství přidaných solí do imobilizačního pufru na množství navázaného biotinylovaného hybridního vlákna. Pro imobilizaci vlákna obsahujícího ribonukleotidy

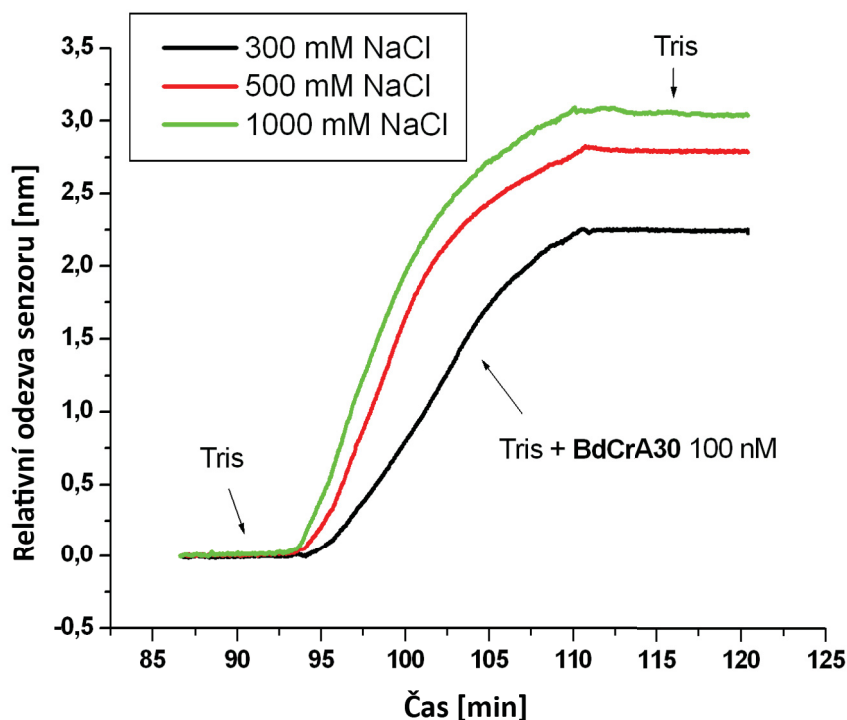


Obr. 26: Schéma assaye pro studium RNasy H s typickým průběhem odezvy senzoru ve fázích vazby streptavidinu, imobilizace substrátu a působení RNasy H. Biotinovaným hybridním ON byl 30mer  $BdCrA_{30}$ , dON 15mer byl  $dT_{15}$ .



Obr. 27: Detail dosažených výsledků. Porovnání měřícího a referenčního kanálu.

není možné použít pufr s obsahem  $Mg^{2+}$  iontů, který je nejlepší pro imobilizaci krátkých dON, protože jejich přítomnost zrychluje samovolnou degradaci RNA. Tento efekt je výraznější při vyšších teplotách. Proto byl optimalizován jen obsah sodných iontů v rozsahu 300–1000 mM. Závislost množství imobilizovaných hybridních ON na koncentraci  $Na^+$  je zobrazena na obr. 28. Imobilizace byla nejúspěšnější v pufru s přidáním 1000 mM NaCl. Díky rychlejšímu průběhu imobilizace mohla být koncentrace  $BdCrA_{30}$  snížena na 75 nM.



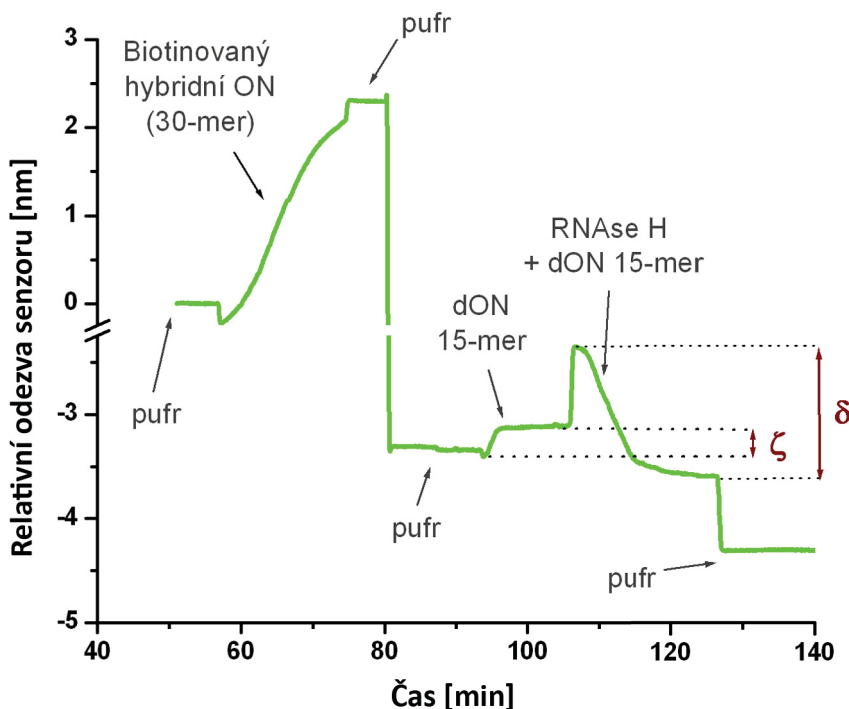
**Obr. 28:** Vliv koncentrace sodných iontů na množství navázaného biotinylovaného hybridního vlákna.

Vyvinutý formát přímé detekce představuje slibný nástroj pro studium kinetik hybridizace antisensního oligonukleotidu a jeho následné hydrolýzy RNAsou H. Aby bylo možné porovnávat kinetiky hydrolýzy RNA RNAsou H z různých měření, byla data korigována na různé množství komplementárního ON  $\zeta$  navázaného před působením RNasy H.

Předpokládá se, že komplementární ON během působení RNasy úplně disociuje. Odezva senzoru SR na RNasu H byla korigována podle vztahu:

$$CR = SR - SR * (\zeta / \delta) \quad (11)$$

kde  $CR$  je opravená odezva,  $\delta$  je absolutní úbytek hmoty během působení RNasy H (měřený jako rozdíl těsně po začátku a před koncem inkubace v roztoku s RNasou, viz obr. 29).  $CR$  je dále kalibrována na 3 nm navázaného  $BdCrA_{30}$ .

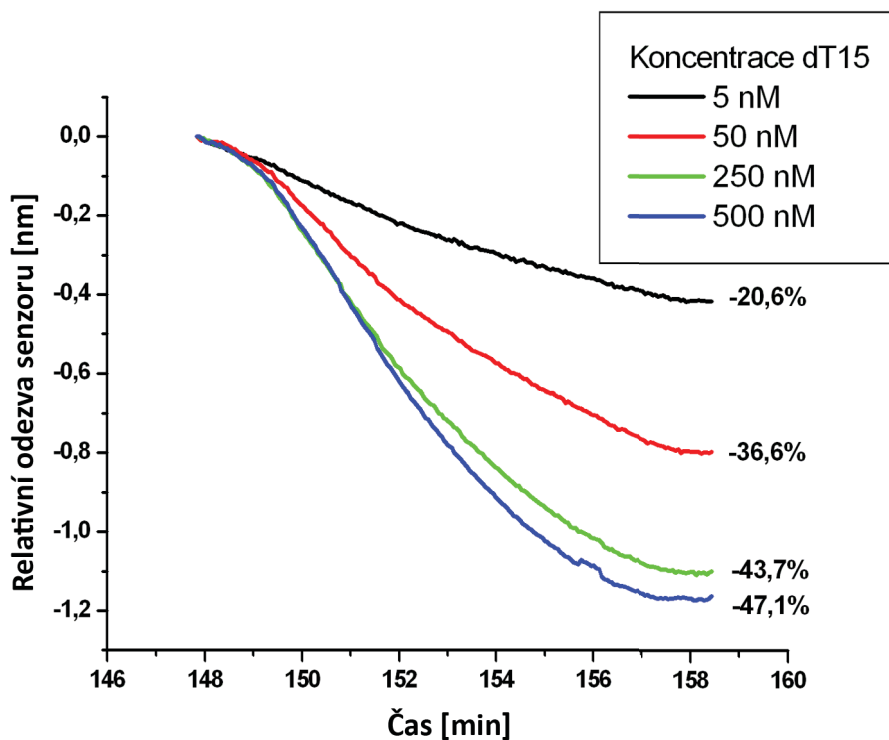
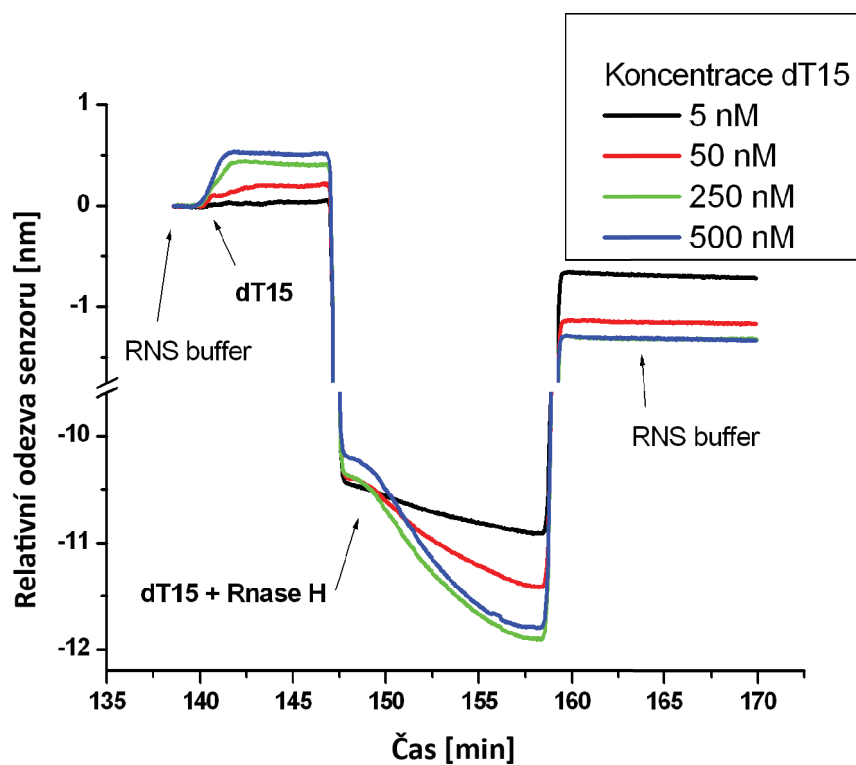


Obr. 29: Přibližná část od imobilizace biotinovaného ON. Vysvětlení veličin viz text.

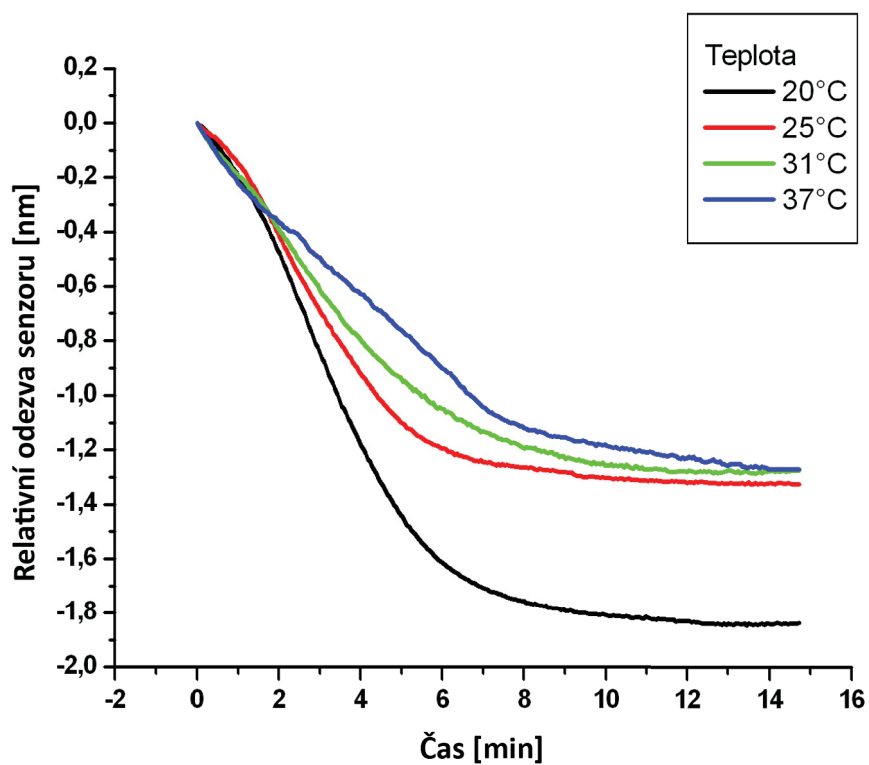
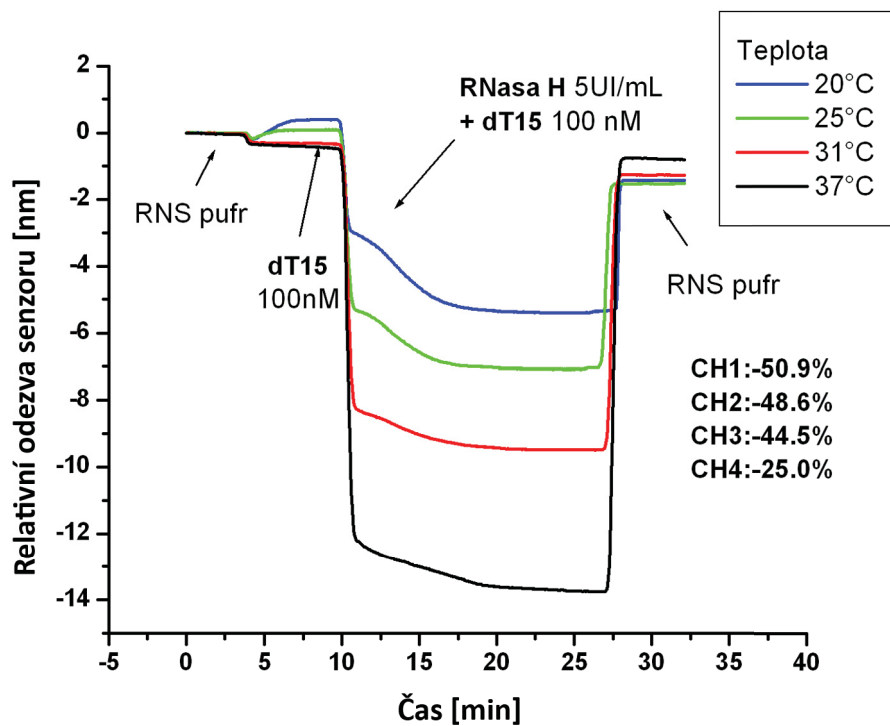
Byl zkoumán vliv koncentrace substrátu na kinetiku hydrolyzy. Při stejném množství navázaného biotinylovaného vlákna se měnila koncentrace antisensních oligonukleotidů (obr. 30, nahore). Jejich koncentrace má na výsledný výtěžek reakce podstatný vliv (obr. 30, dole). Zpomalení kinetiky reakce na začátku hydrolyzy je pravděpodobně dáno dočasnou vazbou RNasy H na substrát.

Dalším zkoumaným parametrem byl vliv teploty na aktivitu RNasy H. Obr. 31 zachycuje odezvu senzoru na hybridizaci antisensního oligonukleotidu na imobilizované hybridní vlákno a následná hydrolyza RNasou H. Měření probíhala při 20, 25, 31 a 37 °C. K vazbě  $dT_{15}$  při teplotě 31 °C a 37 °C nedochází, protože tyto teploty leží nad teplotou tání hybridního duplexu 15merů  $rA/dT$ . Jak stabilita tohoto duplexu s klesající teplotou roste, roste i množství navázaného  $dT_{15}$ .

Na obr. 31 dole jsou zobrazeny kinetiky hydrolyzy za různých teplot. Aktivita RNasy H je největší při 37 °C. Absolutní množství hydrolyzovaných vláken bylo ale při této teplotě nejmenší, což může být dáno nižší dostupností substrátu. Jak bylo ukázáno výše, nižší koncentrace sub-



**Obr. 30:** Vliv koncentrace substrátu na hydrolyzu Rnasy H. Tvorba hybridního duplexu a jeho hydrolyza Rnasou H [nahore]. Kinetika hydrolyzy RNAsou H [dole]. Pro pozvolnější průběh byla koncentrace Rnasy H snížena na 4,2 UI/mL.



**Obr. 31:** Vliv teploty na vyvinutou assay pro studium RNasy H. Tvorba hybridního duplexu a jeho hydrolyza RNasou H [nahore]. Kinetika hydrolyzy RNasou H [dole]. Koncentrace RNasy byla 5UI/mL, průtok 20  $\mu$ L/min.

strátu může kinetiku reakce výrazně zpomalit. Zajímavé jsou rozdílné náběhy kinetik. Zatímco při 37 °C je jejich náběh téměř lineární, při 25 °C se kinetika zrychluje až po 3 minutách od začátku inkubace (viz obr. 31 dole). Předpokládaný důvod je ten, že se RNasa H při 37 °C váže na substrát mnohem rychleji, již v průběhu skoku v indexu lomu, zatímco při 25 °C již vazba ovlivňuje tvar kinetik.

Přestože při 31 °C a 37 °C k tvorbě hybridního duplexu nedochází, hydrolýza RNA vlákna probíhala. Vyplývá z toho, že mechanismus hydrolýzy RNA musí být třístupňový proces, který vyžaduje přítomnost všech tří účastníků: cílové RNA, antisensního oligonukleotidu, a RNasu H s  $Mg^{2+}$ . Rozdělení tohoto procesu na dvě nezávislé části (např. navázání antisensního oligonukleotidu na cílovou RNA a následné studium hydrolýzy RNasou H) může vést k zavádějícím výsledkům. Potvrzuje to výsledky z předchozích studií (Li and Wartell 1998), které ukazují, že RNasa H je aktivním účastníkem tvorby hybridního duplexu. Může katalyzovat tvorbu hybridního RNA/DNA duplexu a následně jeho hydrolýzu, i když samotná rovnovážná reakce RNA a DNA tvorbu hybridního duplexu nepodporuje.



# Kapitola 5

## Závěr

V rámci diplomové práce byly metodou rezonance povrchových plasmonů studovány biomolekulární interakce významné z hlediska potenciálního testování vhodnosti nových typů syntetických analog nukleových kyselin pro antisensní použití. Konkrétně se jednalo o měření hybridizace s plně komplementárními i neúplně komplementárními sekvencemi přirozených nukleových kyselin a o sledování aktivity RNasy H.

Hybridizace nukleových kyselin byla studována na krátkých DNA oligonukleotidech, tvořících triplexy, plně komplementární duplexy a duplexy s nekomplementárními bázeovými páry. Byl sledován vliv typu pufru a kombinace koncentrací sodných a hořečnatých iontů.

Bylo prokázáno, že vliv typu pufru udržujícího neutrální pH na hybridizaci nukleových kyselin je zanedbatelný, pokud je v roztoku dostatečné množství přidávaných sodných nebo hořečnatých iontů. V případě, že kromě samotného pufru nejsou jiné ionty přidány, projevuje se vliv kationtů, které disociují z daného pufru.

Byly změřeny dvourozměrné závislosti rovnovážných úrovní hybridizace na koncentracích sodných a hořečnatých iontů. Tyto závislosti ukazují, že sodné a hořečnaté ionty podporují hybridizaci pomocí odlišných interakčních schémat. Jejich účinnost je rozdílná, i pokud se porovnává jejich efekt při nejvyšších koncentracích, kdy dochází ke stavu nasycení (další zvyšování koncentrací kationtů už nevede ke zvýšení hybridizace). Hořečnaté ionty jsou v porovnání se sodnými ionty v podporování hybridizace mnohem efektivnější. Společný vliv obou iontů je ovlivněn jejich vzájemnou kompeticí do té míry, že nemůže být popsán dvěma samostatnými faktory (jedním, který by popisoval vliv sodných iontů a druhým, který by nezávisle určoval vliv hořečnatých iontů).

Bylo zjištěno, že množství oligonukleotidů imobilizovaných pomocí vazby streptavidin-biotin je koncentrací sodných a hořečnatých solí ovlivňováno velmi podobným způsobem jako hybridizace. Oba procesy (imobilizace biotinylovaných jednořetězcových vláken i hybridizace – tvorba duplexů a triplexů) jsou tedy ovlivněny společným fyzikálním jevem – repulzí záporných cukrfosfátových koster oligonukleotidů. Toto zjištění spolu s faktem, že hodnoty rovnovážné konstanty tvorby duplexů naměřené na SPR senzoru jsou podstatně menší, než hodnoty pro tvorbu stejného komplexu a za stejných podmínek v roztoku (a přesto podpurný vliv přidávání

kationtů vykazuje nasycení), ukazuje, že fyzikálně-chemické podmínky na povrchu senzoru se významně liší od situace ve volném roztoku. Vysvětlením je velmi vysoká objemová koncentrace oligonukleotidů v tenké vrstvě na povrchu senzoru. Podle provedených odhadů v rámci práce je na povrchu senzoru objem vodného prostředí mezi oligonukleotidy srovnatelný s objemem samotných oligonukleotidů. Za těchto podmínek se uplatňuje nejen elektrostatická repulze mezi dvěma vlákny tvořícími duplex, ale i repulze mezi imobilizovanými oligonukleotidy. Redukovaná velikost vodného obalu pak zřejmě souvisí s omezenou možností kompenzace záporného náboje kationty, přičemž ionty hořčíku se ukazují jako podstatně úspěšnější než ionty sodíku. Analýza kinetických průběhů hybridizace ukázala, že rozdíl mezi účinkem hořčíku a sodíku je především ve velikosti disociační rychlostní konstanty. Z toho vyplývá, že nedostatečná nábojová kompenzace se projevuje především ve vyšší pravděpodobnosti disociace. Detailní model popisující termodynamicky a statisticky tento jev přesahuje rámec této diplomové práce, ta však k němu poskytuje cenná experimentální data. Podle všeho se jedná o významnou problematiku, která přesahuje rámec techniky SPR senzorů a týká se nejen všech měření používajících imobilizaci oligonukleotidů o vysoké hustotě v tenké vrstvě, ale i možných situací s výskytem vysoké koncentrace nukleových kyselin v živých buňkách.

Měření hybridizace řetězců vytvářejících duplexy se 2, 3 a 4 nekomplementárními páry ukázala, že jev nábojové kompenzace se obdobným způsobem projevuje při tvorbě neúplně komplementárních komplexů.

V rámci diplomové práce byla rovněž vyvinuta reakční assay pro studium antisensních oligonukleotidů a RNasy H v reálném čase. Byla ukázána dostatečná citlivost a reprodukovatelnost navržené assaye a prověřena specifická účinnost štěpícího účinku RNasy H z hlediska hybridního DNA/RNA duplexu jako substrátu i s ohledem na typ štěpeného vlákna (RNA). Dále bylo demonstrováno, že assay umožňuje studium kinetik hydrolyzy RNasy H. Byl i prověřen vliv teploty a koncentrace substrátu na kinetiku hydrolyzy RNA vlákna. Výsledkem diplomové práce je tedy plně připravená assay pro sledování interakce RNasy H s hybridními duplexy tvořenými přirozenou RNA a novými typy modifikovaných antisensních oligonukleotidů.

# Literatura

- Agrawal, S., Z. Jiang, Q. Zhao, D. Shaw, Q. Cai, A. Roskey, L. Channavajjala, C. Saxinger and R. Zhang (1997): *Mixed-backbone oligonucleotides as second generation antisense oligonucleotides: in vitro and in vivo studies*. Proc Natl Acad Sci U S A 94(6): 2620-5.
- Anderson, G. P., M. A. Jacoby, F. S. Ligler and K. D. King (1997): *Effectiveness of protein A for antibody immobilization for a Eber optic biosensor*. Biosensors & Bioelectronics 12(4): 329-336.
- Ansell, R. J., O. Ramstrom and K. Mosbach (1996): *Towards artificial antibodies prepared by molecular imprinting*. Clinical Chemistry 42(9): 1506-1512.
- Babacan, S., P. Pivarnik, S. Letcher and A. G. Rand (2000): *Evaluation of antibody immobilization methods for piezoelectric biosensor application*. Biosensors & Bioelectronics 15(11-12): 615-621.
- Bamdad, C. (1998): *The use of variable density self-assembled monolayers to probe the structure of a target molecule*. Biophysical Journal 75(4): 1989-1996.
- Buckle, M., R. M. Williams, M. Negroni and H. Buc (1996): *Real time measurements of elongation by a reverse transcriptase using surface plasmon resonance*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 93(2): 889-894.
- Busse, S., V. Scheumann, B. Menges and S. Mittler (2002): *Sensitivity studies for specific binding reactions using the biotin/streptavidin system by evanescent optical methods*. Biosens Bioelectron 17(8): 704-10.
- Cooper, M. A. (2002): *Optical biosensors in drug discovery*. Nature Reviews Drug Discovery 1(7): 515-528.
- Crooke, S. T. (1999): *Molecular mechanisms of antisense drugs: Human RNase H*. Antisense & Nucleic Acid Drug Development 9(4): 377-379.
- Davies, J. F., Z. Hostomska, Z. Hostomsky, S. R. Jordan and D. A. Matthews (1991): *Crystal-Structure of the Ribonuclease-H Domain of Hiv-1 Reverse-Transcriptase*. Science 252(5002): 88-95.
- Edwards, D. A., B. Goldstein and D. S. Cohen (1999): *Transport effects on surface-volume biological reactions*. Journal of Mathematical Biology 39(6): 533-561.
- Freier, S. M. and K. H. Altmann (1997): *The ups and downs of nucleic acid duplex stability: structure-stability studies on chemically-modified DNA:RNA duplexes*. Nucleic Acids Res 25(22): 4429-43.

- Furrer, P., T. M. Billeci, A. Donati, C. Kojima, B. Karwowski, A. Sierzchala, W. Stec and T. L. James (1999): *Structural effect of complete [Rp]-phosphorothioate and phosphorodithioate substitutions in the DNA strand of a model antisense inhibitor-target RNA complex*. J Mol Biol 285(4): 1609-22.
- Galderisi, U., A. Cascino and A. Giordano (1999): *Antisense oligonucleotides as therapeutic agents*. J Cell Physiol 181(2): 251-7.
- Gleave, M. E. and B. P. Monia (2005): *Antisense therapy for cancer*. Nature Reviews Cancer 5(6): 468-479.
- Goldstein, B., D. Coombs, X. Y. He, A. R. Pineda and C. Wofsy (1999): *The influence of transport on the kinetics of binding to surface receptors: application to cells and BIAcore*. Journal of Molecular Recognition 12(5): 293-299.
- Haruki, M., E. Noguchi, S. Kanaya and R. J. Crouch (1997): *Kinetic and stoichiometric analysis for the binding of Escherichia coli ribonuclease HI to RNA-DNA hybrids using surface plasmon resonances*. Journal of Biological Chemistry 272(35): 22015-22022.
- Heller, M. J. (2002): *DNA microarray technology: devices, systems, and applications*. Annu Rev Biomed Eng 4: 129-53.
- Hendrickson, W. A., A. Pahler, J. L. Smith, Y. Satow, E. A. Merritt and R. P. Phizackerley (1989): *Crystal-Structure of Core Streptavidin Determined from Multiwavelength Anomalous Diffraction of Synchrotron Radiation*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 86(7): 2190-2194.
- Hock, B. (1997): *Antibodies for immunosensors - A review*. Analytica Chimica Acta 347(1-2): 177-186.
- Homola, J. (2008): *Surface plasmon resonance sensors for detection of chemical and biological species*. Chemical Reviews 108(2): 462-493.
- Homola, J. and M. Piliarik (2006): *Surface Plasmon Resonance (SPR) Sensors*. Surface Plasmon Resonance Based Sensors. J. Homola, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 45-47.
- James, P. L., T. Brown and K. R. Fox (2003): *Thermodynamic and kinetic stability of intermolecular triple helices containing different proportions of C+\*GC and T\*AT triplets*. Nucleic Acids Res 31(19): 5598-606.
- Jayasena, S. D. (1999): *Aptamers: An emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics*. Clinical Chemistry 45(9): 1628-1650.

- Johnsson, B., S. Lofas and G. Lindquist (1991): *Immobilization of Proteins to a Carboxymethyl-dextran-Modified Gold Surface for Biospecific Interaction Analysis in Surface-Plasmon Resonance Sensors*. Analytical Biochemistry 198(2): 268-277.
- Jung, L. S., K. E. Nelson, C. T. Campbell, P. S. Stayton, S. S. Yee, V. Perez-Luna and G. P. Lopez (1999): *Surface plasmon resonance measurement of binding and dissociation of wild-type and mutant streptavidin on mixed biotin-containing alkylthiolate monolayers*. Sensors and Actuators B-Chemical 54(1-2): 137-144.
- Jung, L. S., K. E. Nelson, P. S. Stayton and C. T. Campbell (2000): *Binding and dissociation kinetics of wild-type and mutant streptavidins on mixed biotin-containing alkylthiolate monolayers*. Langmuir 16(24): 9421-9432.
- Kanaya, S. (2001): *Prokaryotic type 2 RNases H*. Ribonucleases, Pt A 341: 377-394.
- Kanaya, S., C. Katsuda, S. Kimura, T. Nakai, E. Kitakuni, H. Nakamura, K. Katayanagi, K. Morikawa and M. Ikehara (1991): *Stabilization of Escherichia-Coli Ribonuclease-H by Introduction of an Artificial Disulfide Bond*. Journal of Biological Chemistry 266(10): 6038-6044.
- Katayanagi, K., M. Miyagawa, M. Matsushima, M. Ishikawa, S. Kanaya, M. Ikehara, T. Matsuzaki and K. Morikawa (1990): *3-Dimensional Structure of Ribonuclease-H from Escherichia-Coli*. Nature 347(6290): 306-309.
- Knoll, W., M. Liley, D. Piscevic, J. Spinke and M. J. Tarlov (1997): *Supramolecular architectures for the functionalization of solid surfaces*. Adv Biophys 34: 231-51.
- Kopka, M. L., L. Lavelle, G. W. Han, H. L. Ng and R. E. Dickerson (2003): *An unusual sugar conformation in the structure of an RNA/DNA decamer of the polypurine tract may affect recognition by RNase H*. Journal of Molecular Biology 334(4): 653-665.
- Koubova, V., E. Brynda, L. Karasova, J. Skvor, J. Homola, J. Dostalek, P. Tobiska and J. Rosicky (2001): *Detection of foodborne pathogens using surface plasmon resonance biosensors*. Sensors and Actuators B-Chemical 74(1-3): 100-105.
- Krakowiak, A., A. Owczarek, M. Koziolkiewicz and W. J. Stec (2002): *Stereochemical course of Escherichia coli RNase H*. Chembiochem 3(12): 1242-1250.
- Ladd, J., C. Boozer, Q. M. Yu, S. F. Chen, J. Homola and S. Jiang (2004): *DNA-directed protein immobilization on mixed self-assembled monolayers via a Streptavidin bridge*. Langmuir 20(19): 8090-8095.
- Li, J. and R. M. Wartell (1998): *RNase H1 can catalyze RNA/DNA hybrid formation and cleavage with stable hairpin or duplex DNA oligomers*. Biochemistry 37(15): 5154-5161.

- Liedberg, B., I. Lundstrom and E. Stenberg (1993): *Principles of Biosensing with an Extended Coupling Matrix and Surface-Plasmon Resonance*. Sensors and Actuators B-Chemical 11(1-3): 63-72.
- Liedberg, B., C. Nylander and I. Lundstrom (1995): *Biosensing with Surface-Plasmon Resonance - How It All Started*. Biosensors & Bioelectronics 10(8): R1-R9.
- Lofas, S., B. Johnsson, A. Edstrom, A. Hansson, G. Lindquist, R. M. M. Hillgren and L. Stigh (1995): *Methods for Site Controlled Coupling to Carboxymethyl-dextran Surfaces in Surface-Plasmon Resonance Sensors*. Biosensors & Bioelectronics 10(9-10): 813-822.
- Mikkelsen, S. (1995): *Electrochemical biosensor for DNA sequence detection*. Electroanalysis 8(1): 15-19.
- Mills, M., P. B. Arimondo, L. Lacroix, T. Garestier, C. Helene, H. Klump and J. L. Mergny (1999): *Energetics of strand-displacement reactions in triple helices: a spectroscopic study*. J Mol Biol 291(5): 1035-54.
- Nelson, K. E., L. Gamble, L. S. Jung, M. S. Boeckl, E. Naeemi, S. L. Golledge, T. Sasaki, D. G. Castner, C. T. Campbell and P. S. Stayton (2001): *Surface characterization of mixed self-assembled monolayers designed for streptavidin immobilization*. Langmuir 17(9): 2807-2816.
- Nenninger, G. G., M. Piliarik and J. Homola (2002): *Data analysis for optical sensors based on spectroscopy of surface plasmons*. Measurement Science & Technology 13(12): 2038-2046.
- Niemeyer, C. M., W. Burger and R. M. J. Hoedemakers (1998): *Hybridization characteristics of biomolecular adaptors, covalent DNA streptavidin conjugates*. Bioconjugate Chemistry 9(2): 168-175.
- Nowotny, M., S. A. Gaidamakov, R. J. Crouch and W. Yang (2005): *Crystal structures of RNase H bound to an RNA/DNA hybrid: Substrate specificity and metal-dependent catalysis*. Cell 121(7): 1005-1016.
- Nuzzo, R. G. and D. L. Allara (1983): *Adsorption of Bifunctional Organic Disulfides on Gold Surfaces*. Journal of the American Chemical Society 105(13): 4481-4483.
- Oda, Y., M. Yoshida and S. Kanaya (1993): *Role of Histidine-124 in the Catalytic Function of Ribonuclease-Iii from Escherichia-Coli*. Journal of Biological Chemistry 268(1): 88-92.
- Oshannessy, D. J., M. Brighamburke and K. Peck (1992): *Immobilization Chemistries Suitable for Use in the Biacore Surface-Plasmon Resonance Detector*. Analytical Biochemistry 205(1): 132-136.
- Oshannessy, D. J., M. Brighamburke, K. K. Sonesson, P. Hensley and I. Brooks (1993): *Determination of Rate and Equilibrium Binding Constants for Macromolecular Interactions Using*



- Surface-Plasmon Resonance - Use of Nonlinear Least-Squares Analysis-Methods*. Analytical Biochemistry 212(2): 457-468.
- Parniak, M. A., K. L. Min, S. R. Budihias, S. F. J. Le Grice and J. A. Beutler (2003): *A fluorescence-based high-throughput screening assay for inhibitors of human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase-associated ribonuclease H activity*. Analytical Biochemistry 322(1): 33-39.
- Peterson, A. W., R. J. Heaton and R. M. Georgiadis (2001): *The effect of surface probe density on DNA hybridization*. Nucleic Acids Research 29(24): 5163-5168.
- Peterson, A. W., L. K. Wolf and R. M. Georgiadis (2002): *Hybridization of mismatched or partially matched DNA at surfaces*. Journal of the American Chemical Society 124(49): 14601-14607.
- Praseuth, D., A. L. Guieysse and C. Helene (1999): *Triple helix formation and the antigene strategy for sequence-specific control of gene expression*. Biochim Biophys Acta 1489(1): 181-206.
- Rizzo, J., L. K. Gifford, X. Zhang, A. M. Gewirtz and P. Lu (2002): *Chimeric RNA-DNA molecular beacon assay for ribonuclease H activity*. Molecular and Cellular Probes 16(4): 277-283.
- Rychetsky, P., Z. Hostomska, Z. Hostomsky and P. Strop (1996): *Development of a nonradioactive ribonuclease H assay*. Analytical Biochemistry 239(1): 113-115.
- Savitzky, A. and M. J. E. Golay (1964): *Smoothing + Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures*. Analytical Chemistry 36(8): 1627-&.
- Sikavitsas, V., J. M. Nitsche and T. J. Mountziaris (2002): *Transport and kinetic processes underlying biomolecular interactions in the BIACORE optical biosensor*. Biotechnology Progress 18(4): 885-897.
- Stein, C. A. (1996): *Phosphorothioate antisense oligodeoxynucleotides: questions of specificity*. Trends Biotechnol 14(5): 147-9.
- Stein, C. A. and Y. C. Cheng (1993): *Antisense oligonucleotides as therapeutic agents--is the bullet really magical?* Science 261(5124): 1004-12.
- Steitz, T. A. and J. A. Steitz (1993): *A General 2-Metal-Ion Mechanism for Catalytic Rna*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 90(14): 6498-6502.
- Su, X. D., Y. J. Wu, R. Robelek and W. Knoll (2005): *Surface plasmon resonance spectroscopy and quartz crystal microbalance study of streptavidin film structure effects on biotinylated DNA assembly and target DNA hybridization*. Langmuir 21(1): 348-353.



- Tombelli, S., M. Mascini and A. P. F. Turner (2002): *Improved procedures for immobilisation of oligonucleotides on gold-coated piezoelectric quartz crystals*. *Biosensors & Bioelectronics* 17(11-12): 929-936.
- Uhlmann, E. and A. Peyman (1990): *Antisense Oligonucleotides - a New Therapeutic Principle*. *Chemical Reviews* 90(4): 543-584.
- Ward, L. D. and D. J. Winzor (2000): *Relative merits of optical biosensors based on flow-cell and cuvette designs*. *Analytical Biochemistry* 285(2): 179-193.
- Watson, J. D. and F. H. Crick (1953): *Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid*. *Nature* 171(4356): 737-8.
- Wegner, G. J., H. J. Lee and R. M. Corn (2002): *Characterization and optimization of peptide arrays for the study of epitope-antibody interactions using surface plasmon resonance imaging.* *Analytical Chemistry* 74(20): 5161-5168.
- Witz, J. (1999): *Kinetic analysis of analyte binding by optical biosensors: Hydrodynamic penetration of the analyte flow into the polymer matrix reduces the influence of mass transport*. *Analytical Biochemistry* 270(2): 201-206.
- Yuen, A. R. and B. I. Sikic (2000): *Clinical studies of antisense therapy in cancer*. *Frontiers in Bioscience* 5: D588-D593.
- Zamaratski, E., P. I. Pradeepkumar and J. Chattopadhyaya (2001): *A critical survey of the structure-function of the antisense oligo/RNA heteroduplex as substrate for RNase H*. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 48(3): 189-208.