

Kompleksi lipida i DNK

Poljak, Frano

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:948850>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
FIZIČKI ODSJEK

Frano Poljak

KOMPLEKSI LIPIDA I DNK

Diplomski rad

Zagreb, 2016.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
FIZIČKI ODSJEK

SMJER: ISTRAŽIVAČKI

Frano Poljak

Diplomski rad

Kompleksi lipida i DNK

Voditelj diplomskog rada: dr. sc. Tomislav Vuletić

Ocjena diplomskog rada: _____

Povjerenstvo: 1. _____

2. _____

3. _____

Datum polaganja: _____

Zagreb, 2016.

Zahvaljujem se mentoru dr. sc. Tomislavu Vuletiću na pomoći, savjetima i idejama pri nastanku ovog rada, dr. sc. Damiru Aumileru i Marku Šoštaru na pomoći pri postavljanju mjernog uređaja i savjetima prilikom mjerenja, dr. sc. Nataši Vujičić na strpljenju pri zajedničkom korištenju laboratorija, dr. sc. Ruži Frkanec i dr. sc. Adeli Štimac na pripravi uzoraka i idejama za daljnja mjerenja, kolegici Natali Nakić na pomoći u pripravi DNK uzoraka, prijatelju Draženu Nikoliću na pomoći pri radu u LaTeX-u, te svojoj obitelji na strpljenju i podršci.

Sažetak

Sastavljen je mjerni uređaj za fluorescencijsku korelacijsku spektroskopiju i kalibriran je koristeći se poznatim parametrima fluorofore Cy5. Određen je efektivni konfokalni volumen. Određeni su koeficijenti difuzije DNK15 i DNK60 molekula, eksperimentalno i prema teorijskom modelu. Kao test reproducibilnosti uređaja provedeno je mjerenje ovisnosti difuzijskog vremena DNK15 o viskoznosti okolnog medija. Dobiveni rezultati dobro reproduciraju očekivanu ovisnost. Sintetizirani su različiti liposomski uzorci te su provedena mjerenja autokorelacija fluorescentno označenih DNK pomiješanih s liposomima u svrhu opažanja kompleksacije DNK s lipidima. Nestabilni lipopleksi opaženi su pri miješanju DNK15 s kationskim liposomima, dok kompleksacija nije uočena pri dodavanju liposoma s ugrađenim adamantan-aminogvanidinom. Opsežniji eksperimenti trebaju biti provedeni u svrhu unapređivanja mjernog uređaja i proučavanja liposomske transfekcije u gen-skoj terapiji.

DNA-lipids complexes

Abstract

Using known parameters for Cy5 fluorophore, a fluorescence correlation spectroscopy instrument was installed. The effective confocal volume was determined. Diffusion coefficients of DNA15 and DNA60 molecules were determined, both experimentally and according to the theoretical model. As a reproducibility test, the diffusion time versus medium viscosity measurement for DNA15 was conducted. The results show a good agreement with the expected dependency. A various liposome samples were synthesized and the autocorrelation measurements of a fluorescently labelled DNA mixed with liposomes were performed, in order to detect their complexation. When cationic liposomes were added, unstable lipoplexes were detected, while complexation was not observed in case of adamantyl aminoguanidine-incorporated liposomes. Further experiments need to be conducted to improve the instrument and to better understand the liposome transfection in gene therapy.

Sadržaj

1	Uvod	1
2	Teorijski uvod	3
2.1	DNK molekula	3
2.2	Poisson-Boltzmannova teorija	5
2.3	Lipidi i liposomi	7
2.4	Kationski liposomi i kompleksi lipida i DNK	9
3	Metode i materijali	12
3.1	Fluorescencija	12
3.2	Fluorescencijska korelacijska spektroskopija	13
3.3	Mjerni uređaj	20
3.4	Materijali	23
3.5	Optimizacija mjernog uređaja	25
4	Rezultati i diskusija	30
5	Zaključak	36

1 Uvod

Individualni gen u živoj stanici segment je DNK molekule koji, u većini slučajeva, djeluje kao otisak za proizvodnju određenog proteina. U sekvenci gena kodirana je sekvenca amino kiselina koje sačinjavaju protein. Ako određeni gen mutira, njegov proteinski produkt možda neće biti uopće načinjen, ili će njegova funkcija biti slaba ili čak previše agresivna. Ta nesavršenost u proizvodnji proteina može kompromitirati vitalne funkcije stanica i tkiva i stoga izazvati simptome bolesti. Znanstvenici su odavno bili intrigirani mogućnošću zamjene, blokiranja ili slične manipulacije genima postavljanjem strane DNK u njih i tako postizanju transfekcije – dovođenju funkcionalnih gena u stanicu. Tijekom 60.-ih godina prošlog stoljeća, istraživači su ustvrdili da je primarna prepreka unošenju DNK molekule u stanicu činjenica da je molekula, u vodenoj otopini sličnoj kao u stanici, negativno nabijena. Dakle, molekula je elektrostatski odbijena od stanične membrane, budući da ista nosi također negativan naboj. [1]

Mnoge su strategije predložene za unos gena u stanicu pri tzv. genskoj terapiji. Jedna od njih koristila je modificirane viruse za unošenje DNK molekule u stanicu. Modificirani virus s DNK molekulom napada stanicu i ispušta "zdravi" gen koji se zatim prenosi u jezgru. Iako su modificirani virusi efektivni u prenošenju gena, njihovo korištenje u terapijske svrhe nailazi na određene probleme. Glavno ograničenje je mogućnost generiranja imune reakcije pacijenta na virus čime se ili uništava virus ili se ubija inficirana stanica prije nego je virus imao šansu pomoći pacijentu. [1]

Osim virusa, postoji i velik broj ne-viralnih strategija za prijenos gena u stanicu. Sve one iskorištavaju kompleksaciju pozitivno nabijenih agenata s DNK molekulom. Nastali se kompleksi unose u stanicu. Sintetički (ne-viralni) prijenosnici DNK interesantni su primarno zbog činjenice da ne izazivaju imune reakcije kao i zbog mogućnosti prenošenja velikih komada DNK molekule u stanicu. Papahadjopoulos i Nicolau nezavisno su uspjeli postići transfekciju miješanjem DNK s liposomima. Felgner je poslije predložio korištenje mješavine kationskih i neutralnih liposoma umjesto, prirodno najbrojnijih, negativno nabijenih lipidnih membrana, a to je trebalo olakšati interakciju liposoma s DNK kao i sa staničnom površinom. Otkriveno je da dolazi do formacije stabilnih kompleksa lipida i DNK, tzv. lipopleksa, za koje se pokazalo da su efikasni u transfekciji uzgojenih stanica. Međutim, njihova klinička upotreba je ograničena najviše zbog toksičnosti sintetiziranih lipida koji se koriste, ali i činjenice da je njihova efikasnost transfekcije ipak znatno manja u uspoređi s istom kod virusnih prijenosnika. Stoga, znatan se trud ulaže u podizanje efikasnosti transfekcije kompleksa uz istovremeno smanjivanje njihove toksičnosti. Važan korak u razumijevanju i osmišljavanju što efikasnijih kompleksa je razumijevanje veze između strukture, kompozicije i funkcije kompleksa. Cijelo područje genske terapije i pokušaja liječenja bolesti na razini njihova genskog uzroka djeluje vrlo obećavajuće za buduće medicinske aplikacije, a brojna se klinička ispitivanja provode trenutno,

ciljajući na liječenje tumora, nasljednih bolesti i različitih drugih poremećaja. [2, 3]

U ovom radu, proučavana je kompleksacija lipida i DNK metodom fluorescencijske korelacijske spektroskopije, korelacijske analize fluktuacija fluorescencijskog intenziteta. Madge, Elson i Webb prvi su 1972. eksperimentalno primijenili tehnike korelacije signala na fluorescenciju, a tehnika se nadalje razvila nizom publikacija u kojima se razvila i teorijska pozadina metode. U novije vrijeme metoda se znatno unaprijedila kombiniranjem s konfokalnom mikroskopijom i tako postala iznimno moćno i osjetljivo analitičko oruđe s pregršt mogućnosti za različita mjerenja.

U drugom poglavlju ukratko je opisana DNK molekula i elektrostatski fenomeni vezani za samo-privlačenje molekule u otopinama. Nadalje, opisana su svojstva lipidnih molekula i formacija liposomskih vezikula. Na kraju poglavlja, opisano je stvaranje kompleksa lipida i DNK i njihovo korištenje u genskoj terapiji.

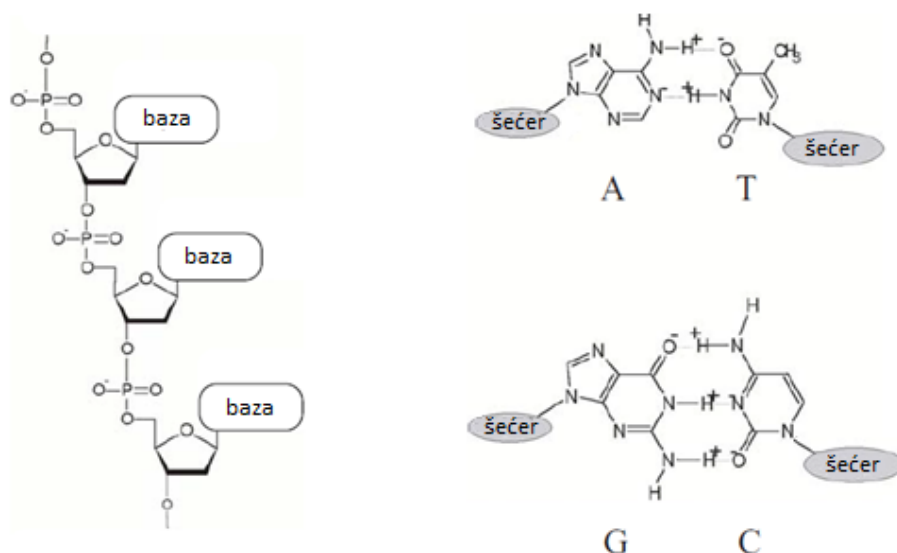
U trećem poglavlju, opisana je metoda fluorescencijske korelacijske spektroskopije. Uz teorijsku pozadinu, opisano je postavljanje i optimizacija korištenog mjernog uređaja. Navedeni su i opisani uzorci na kojima su provedena mjerenja.

U posljednjem su poglavlju prikazani rezultati mjerenja, a provedena je i diskusija o istim rezultatima.

2 Teorijski uvod

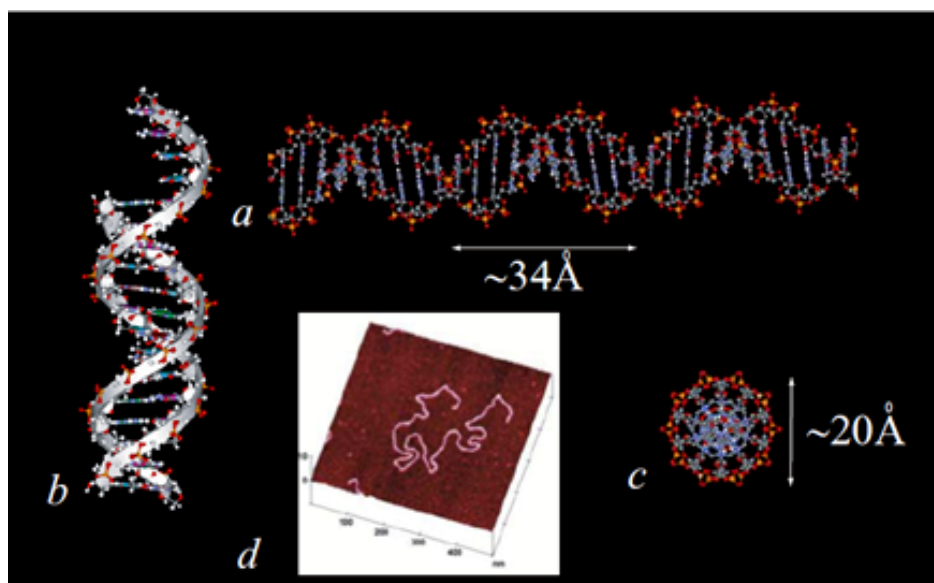
2.1 DNK molekula

Deoksiribonukleinska kiselina (DNK) semifleksibilni je polimer načinjen od deoksiribonukleotidnih jedinica koje formiraju lanac preko poliesterske potpore i skupa s ribonukleinskom kiselinom (RNA) čini klasu biopolimera koji se zovu polinukleotidi. Te dvije molekule sadrže genetske upute za razvoj staničnih oblika života. Formalno, ester je sačinjen od fosforne kiseline i šećera deoksiriboze. Na svaki je šećer vezana jedna od četiriju heterocikličkih baza. Baze uključene u formiranje DNK su: adenin (A) i gvanin (G), derivati purina, te timin (T) i citozin (C), derivati pirimidina. [1] Elementi strukture DNK molekule prikazani su na slici 2.1. Monomerska jedinica baza-šećer zove se nukleozid, a monomerska jedinica baza-šećer-fosforna kiselina zove se nukleotid.

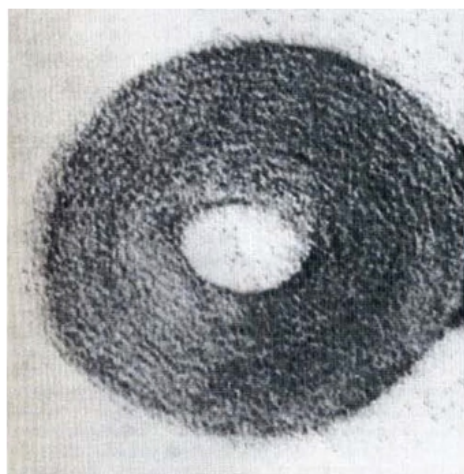


Slika 2.1: Elementi DNK: (lijevo) jedna zavojnica DNK sačinjena je od fosfatne skupine, šećera deoksiriboze i četiriju dušičnih baza; (desno) četiri moguće baze u DNK molekuli čine specifične parove (AT i CG) između dviju komplementarnih zavojnica. [1]

Jedinstvena svojstva DNK molekule u najvećem su dijelu rezultat njene fascinantne sekundarne strukture. Strukturu molekule razjasnili su J. D. Watson i F. H. C. Crick 1953. godine, koristeći se mjerenjima difrakcije X-zraka za određeni oblik DNK molekule nazvan B-DNK. Otkrili su da je DNK molekula sačinjena od dva polinukleotidna lanca zavijena jedan oko drugog u dvostruku zavojnicu radijusa $R_D \sim \text{\AA}$. Lanci su međusobno povezani vodikovim vezama između baza na suprotnim zavojnicama i to tako da se adenin uvijek veže s timinom, a gvanin s citozinom, pa su dvije zavojnice DNK molekule komplementarne. Genetski je kod, dakle, određen s točnom sekvencom podudarnih parova baza duž poliesterskog lanca. Na slici 2.2 prikazani su različiti pogledi strukture B-DNK molekule. [1]



Slika 2.2: Prikazi B-DNK: a) kugla i štap model DNK molekule. Period zavojnice je $\cong 34 \text{ \AA}$. b) Struktura dvostruke zavojnice B-DNK. c) Tlocrtni prikaz B-DNK, s promjerom $\cong 20 \text{ \AA}$. d) AFM¹ slika jedne DNK molekule adsorbirane na lizinom² funkcionaliziranoj površini tinjca³.



Slika 2.3: Elektronski mikrograf genoma λ bakteriofaga. [4]

Pri fiziološkim uvjetima DNK molekula poprima oblik neuređene zavojnice, što znači da ako se bilo koja dva dijela molekule približe na udaljenost manju od 1 nm, dolazi do snažnog odbijanja koje je posljedica negativne nabijenosti DNK molekule. No, ako se u razrijeđenoj vodenoj otopini nalazi i mala koncentracija polivalentnih kationa, ista se DNK molekula kondenzira u čvrsto pakirane toruse. Primjer takve kondenzacije DNK molekule prikazan je na slici 2.3. Dakle, DNK molekula privlači samu sebe u širokom spektru različitih otopina, od kojih se mnoge lako realiziraju *in vivo*. Takvo se privlačenje makro-iona u prisustvu polivalentnih kontra-iona⁴ protivi

¹eng. *Atomic Force Microscopy*, mikroskopija atomskih sila

²Lizin je esencijalna aminokiselina koja sudjeluje u izgradnji bjelančevina.

³Tinjci su grupa silikatnih materijala različitog sastava.

⁴eng. *counterion*, ioni suprotnog naboja u otopini ili drugom elektrokemijskom sustavu

intuitivnom shvaćanju elektrostatike. Razumijevanje nekih od takvih fenomena koji su uzrok ponašanja makro-iona u otopinama može se ostvariti u okviru teorija srednjeg polja, dok neki drugi fenomeni zahtijevaju i eksplicitno uključivanje korelacija u teoriju. Iako teorija srednjeg polja za interakciju jednako nabijenih makro-iona vodi na odbojne sile koje monotonno padaju, za razumijevanje porijekla privlačenja mora se započeti s Poisson-Boltzmannovom (u daljnjem tekstu, PB) teorijom srednjeg polja. [4]

2.2 Poisson-Boltzmannova teorija

Formalno, PB teoriju srednjeg polja možemo izvesti tako da aproksimiramo slobodnu energiju otopine makro-iona, kontra-iona i soli sljedećim funkcionalom ionske koncentracije [4]:

$$F_{FB}(\{n_i\}) = \int d\mathbf{r} \left\{ \frac{1}{2} \rho \Psi + kT \sum_i n_i \ln(n_i/n_0) \right\}. \quad (2.1)$$

Drugi član je usrednjeni entropijski doprinos slobodnoj energiji iona, gdje je n_i koncentracija i -te ionske vrste s nabojem $z_i e$, a n_0 određuje minimum potencijala. Prvi član je elektrostatska energija, gdje je gustoća naboja $\rho(\mathbf{r})$ zbroj gustoća naboja makro-iona i pokretnih iona:

$$\rho(\mathbf{r}) = \rho_{makro}(\mathbf{r}) + \sum_i z_i e n_i(\mathbf{r}). \quad (2.2)$$

Lokalni elektrostatski potencijal je $\Psi(\mathbf{r})$. Gustoća naboja i potencijal povezani su Poissonovom jednadžbom, $-\nabla^2 \Psi = (4\pi/\varepsilon)\rho(\mathbf{r})$, gdje je ε dielektrična konstanta vodenog medija u kojem su ioni otopljeni. Minimizacija jednadžbe 2.1 s obzirom na ionske koncentracije vodi na uvjet da iste zadovoljavaju Boltzmannovu distribuciju. Eksplicitno, koristeći Poissonovu jednadžbu, dobiva se relacija [4]:

$$\nabla^2 \Psi = -\frac{4\pi e n_0}{\varepsilon} \sum_i z_i \exp(-z_i e \Psi / kT) \quad (2.3)$$

za potencijal izvan površine makro-iona. Ovakva se nelinearna diferencijalna jednadžba, poznata kao Poisson-Boltzmannova, rješava uz rubni uvjet da je električno polje $\mathbf{E} = -\nabla \Psi$ na površini makro-iona konzistentno s fiksnom površinskom gustoćom naboja σ , tj. $-\nabla \Psi = (4\pi/\varepsilon)\sigma$.

Elektrostatska vlastita energija⁵ makro-iona računa se uvrštavanjem PB jednadžbe u jednadžbu 2.1 za izolirani makro-ion te potom oduzimanjem slobodne energije sa svim nabojima postavljenim na nulu. Kad se takva računica provede za model nabijenog štapa, elektrostatska vlastita energija ispada pozitivna, budući da prirast u entropijskoj slobodnoj energiji induciran ograničenjem iona blizu štapa premašuje smanjenje njihove elektrostatske energije. [4]

⁵eng. *electrostatic self-energy*

Za velike udaljenosti, bezdimenzionalni elektrostatski potencijal $e\Psi(\mathbf{r})/kT$ između makro-iona malen je u odnosu na jedinicu i PB jednađba se reducira na Debye-Huckelovu (u daljnjem tekstu DH) jednađbu, koja ima Helmholtzov oblik:

$$\nabla^2\Psi = z^2\kappa\Psi. \quad (2.4)$$

Debyeova duljina zasjenjenja je $\kappa^{-1}(\kappa^2 \equiv 8\pi\lambda_B n_0)$, gdje je $\lambda_B \equiv e^2/\varepsilon kT$ Bjerrumova duljina, a z je jačina od z_i . Jednađbu 2.4 trivijalno je riješiti za dva paralelna linijska naboja gustoće λ razmaknuta za r , a to se rješenje može iskoristiti pri izračunu sile na štap. U tom se slučaju integrira tenzor naprezanja preko cilindrične površine izvan štapa s radijusom dovoljno velikim u odnosu na κ^{-1} tako da DH aproksimacija bude zadovoljena. Na taj se način dobiva efektivna interakcija $V(r) \approx (2\lambda^*/\varepsilon)(\pi/2\kappa r)^{1/2}\exp(-\kappa r)$, za $\kappa r \gg 1$. Ovdje je λ^* efektivan ili reduciran naboj po jedinici duljine čija veza s originalnom gustoćom naboja λ dolazi iz potpunog rješenja PB jednađbe. Za $b < \lambda_B$, gdje je b udaljenost između fiksnih naboja na štapu, omjer λ^*/λ jednak je Manning-Oosawinom parametru $\xi \equiv \lambda_B/b$, a inače jedinici. Sličan račun za sferne makro-ione pokazuje da je efektivan naboj z^*e izolirane sfere jednak originalnom naboju ze . S druge strane, za nabijene plohe reducirana plošna gustoća naboja efektivno je jednaka nuli. [4]

Prema gore navedenom, u PB teoriji efekt je pokretnih kontra-iona i ko-iona dvojak. Prvo, kontra-ioni reduciraju efektivan naboj koji djeluje na makro-ione. Drugo, pokretni ioni s oba predznaka djeluju tako da zasjenjuju naboj makro-iona. Formalno, oni proizvode eksponencijalno opadajući električni potencijal na velikim udaljenostima. Kao rezultat, interakcija između dva identična makro-iona uvijek ostaje odbojna, iako s manjom jačinom (relativno na originalnu vrijednost koja se pojavljuje bez prisustva pokretnih iona). Dio odgovora na pitanje zašto postoji jaka privlačna interakcija između nabijenih makro-iona poput DNK slijedi iz ispitivanja koncepta kondenzacije kontra-iona, ideje koju su, neovisno jedan o drugom, razvili Fumio Osawa i Jerry Manning u kasnim 60-im godinama 20. stoljeća. Kondenzacija kontra-iona ovisi o odnosu energijskog i entropijskog doprinosa u minimizaciji slobodne energije pokretnih naboja blizu izoliranog makro-iona. [4]

Za cilindričnu geometriju, kulonska potencijalna energija koja privlači kontra-ione prema nabijenom štapu ovisi logaritamski o udaljenosti od štapa, dok se jačina privlačenja skalira s gustoćom naboja štapa. Entropija kontra-iona, budući da ovisi logaritamski o koncentraciji, također ovisi logaritamski o udaljenosti od štapa. Koji će doprinos prevagnuti ovisi stoga o gustoći naboja cilindričnog štapa. Kritična vrijednost naboja po jedinici duljine je e/λ_B , gdje je λ_B Bjerrumova duljina, udaljenost pri kojoj je kulonska interakcija između dvaju fundamentalnih naboja jednaka termalnoj energiji kT . Kondenzacija kontra-iona događa se kada je udaljenost između naboja b dovoljno malena tako da bezdimenzionalni omjer ξ premašuje jedinicu. Kad god je $\xi > 1$, reducirani naboj štapa jednostavno je originalna vrijednost podijeljena

s ξ^6 . [4]

Neovisno o plošnoj gustoći naboja, za plošnu geometriju fiksnih naboja, kontra-ioni su uvijek kondenzirani. Takva situacija nastaje jer elektrostatska energija varira linearno s udaljenošću i stoga uvijek nadmašuje entropijski doprinos. Obratno, za izolirani sferni makro-ion, kontra-ioni uvijek ostaju slobodni jer trodimenzionalni kulonski potencijal opada inverzno s udaljenošću. [4]

Dva su mehanizma identificirana koja vode na pojavu privlačnih djelovanja uz medijaciju kontra-iona. Prvi mehanizam uključuje korekcije u obliku Gaussovih fluktuacija u PB teoriju srednjeg polja. Ovaj privlačni član može se smatrati Casimirovom silom, analognom van der Waalsovima interakcijama između molekula. Za molekule, bitne fluktuacije u položaju su kvantno-mehaničke prirode, dok su za disolvirane makro-ione statističke prirode. [4]

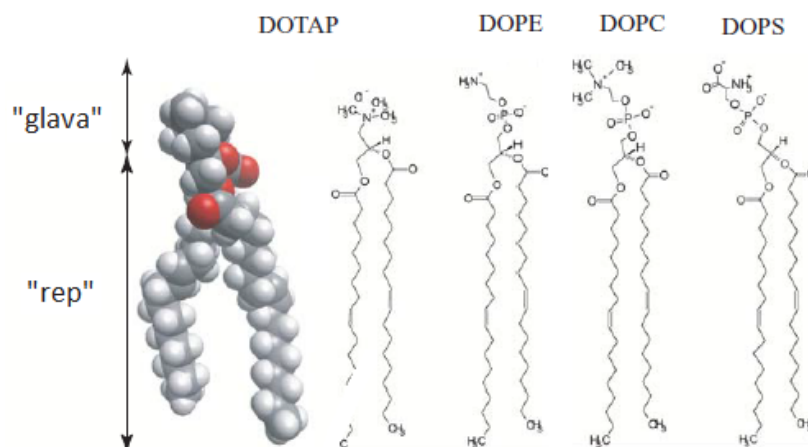
Drugi mehanizam fokusira se na elektrostatske korelacije kratkoga dosega između kontra-iona. Koristeći se kombinacijom računalnih simulacija i analiza pojednostavljenih modela, dobiva se kratkodosežna interakcija čija se snaga privlačenja povećava smanjivanjem temperature. [5, 6] Ovaj oblik interakcije povezan je sa silama koje, prema prethodnim istraživanjima, sugeriraju da bi, na dovoljno niskim temperaturama, kontra-ioni trebali formirati samouređeni dvodimenzionalni Wignerov kristal⁷ i da bi se dvije pokretne površinske rešetke trebale međusobno privlačiti. [7] Temperaturni prag snažno ovisi o valenciji kontra-iona.

2.3 *Lipidi i liposomi*

Lipidi su skup biomolekula koje biokemičari definiraju kao tvari netopljive u vodi koje mogu biti izdvojene iz stanica organskim otapalima niske polarnosti. To su organske tvari različite kemijske građe, a uključuju masti, ulja, voskove, monogliceride, digliceride, trigliceride, fosfolipide i druge. Osim što djeluju kao strukturna komponenta stanične membrane, služe pohrani energije i signalizaciji. Masti, a posebno fosfolipidi, važni su kao glavni konstituenti u svim biološkim membranama gdje odvajaju njihovu unutrašnjost od vanjskog svijeta i definiraju organele s njihovim specifičnim funkcijama u stanici. Fosfolipidi sadrže dvije acilne skupine (s obično 14 do 24 ugljikova atoma) povezane s glicerolnom skupinom, a treću estersku vezu čini fosfatna skupina. Lanci masnih kiselina mogu biti zasićeni ili nezasićeni. Na slici 2.4 shematski su prikazane strukture četiriju lipida, pozitivnog DOTAP-a, neutralnih DOPE-a i DOPC-a, te negativno nabijenog DOPS-a. DOTAP je, za razliku od ostala tri, sintetički pripremljen lipid koji dijeli neka od svojstava s prirodnim lipidima, ali nosi, prirodno rijedak, pozitivan naboj. Često se koristi kao komercijalni reagens za kationsku lipidnu transfekciju. [1]

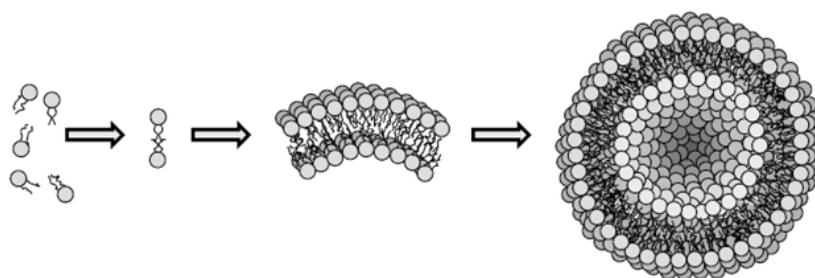
⁶Za DNK na sobnoj temperaturi $\xi = 4.2$.

⁷Wignerov kristal je specifična kristalinična faza u kojoj se mogu naći elektroni na dovoljno niskim temperaturama



Slika 2.4: Shematska ilustracija četiriju lipida: pozitivno nabijeni DOTAP, neutralni DOPE i DOPC, te negativno nabijeni DOPS. Za DOTAP, prikazan je i prostorni model jedne od tipičnih konfiguracija. [1]

Lipidi su, općenito, hidrofobne ili amfifilne molekule. Ampifilna priroda lipidnih molekula omogućava im tvorbu različitih struktura kao što su vezikuli ili liposomi. Liposomi su fluidne vezikularne strukture koje se formiraju akumulacijom lipida koji međudjeluju jedan s drugim na energetski povoljan način, a ovisno o svojoj strukturi i kompoziciji otopine mogu razdvajati hidrofobne i hidrofilne molekule od otopine. Budući da imaju dinamička svojstva i da su relativno jednostavni za manipulaciju, često su korišteni u analitičkim znanostima i pri prijenosu lijekova, ali i gena u genskoj terapiji. Od njihova prvog objavljenog korištenja 1964. godine, kada su ih Bangham i Horne otkrili prilikom istraživanja fosfolipida elektronskim mikroskopom, vrijednost i praktičnost funkcija liposoma široko je prepoznata i kontinuirano unapređivana. [8]



Slika 2.5: Shematska ilustracija procesa formiranja liposoma. [9]

Liposomi su obično formirani spontanom spajanjem otopljenih lipidnih molekula, od kojih svaka ima hidrofilnu glavu i hidrofoban rep. Spajanje lipida daje entropijski povoljnija stanja niže slobodne energije pa se stvaraju bimolekularni lipidni spojevi, što je shematski prikazano na slici 2.5. Takvi su spojevi karakterizirani spojem hidrofobnih hidrokarbonskih repova koji gledaju jedan prema drugome i hidrofilnim glavama koje gledaju prema vani. U ovom trenutku, stvaranje dvosloja još uvijek je energetski nepovoljno budući da su hidrofobni dijelovi još uvijek u kontaktu s vodom, a

taj se problem nadilazi zakrivljenošću formirajućeg dvosloja da bi se konačno stvorio zatvoreni vezikul (2.5). [9] Ovo je samouređenje pogonjeno smanjenjem slobodne energije stabilno i korišteno kao moćan mehanizam inženjeringa liposoma. [10]

2.4 Kationski liposomi i kompleksi lipida i DNK

Kationski lipidi obično zadržavaju pozitivan naboj preko jednog ili više amina⁸ prisutnih u polarnoj glavi lipida. Prisutnost pozitivno nabijenih amina potpomaže vezanje s anionima, poput onih u DNK molekulama.

Otopina kationskih lipida, često formirana s pomoćnim neutralnim lipidima, može se pomiješati s DNK i tako nastaje pozitivno nabijen kompleks, nazvan lipopleks. [11] Iako svaki lipid ima drugačije strukturalne aspekte, koji daju i drugačije karakteristike čitavom kompleksu, osnovna struktura kationskih lipida oponaša kemijske i fizikalne attribute bioloških lipida. Pozitivan naboj na polarnoj glavi olakšava spontanu elektrostatsku interakciju s DNK, kao i vezanje rezultirajućeg lipopleksa na negativno nabijene komponente stanične membrane prije unosa kompleksa u stanicu. [12, 13]

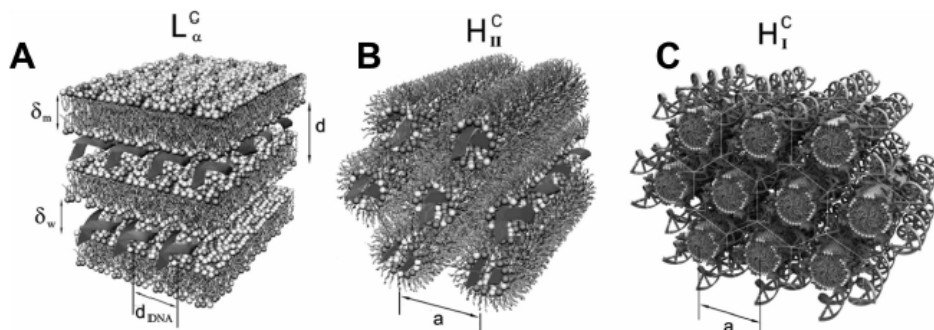
S fizikalnog aspekta, lipopleksi su uređeni, spontano nastali kompozitni agregati. Njihovu formaciju pokreće snažno elektrostatsko privlačenje koje je, kao što je već rečeno, praćeno otpuštanjem malih, pokretnih kontra-iona u otopini. Takva kompleksacija uzrokuje porast translacijske entropije kontra-iona. Porast je najveći pri tzv. izoelektričnoj točki, kada je ukupan naboj lipida jednak ukupnom DNK naboju. [14]

Nužni koraci pri uspješnom umetanju nukleinskih kiselina u stanicu zahtijevaju različita, često i međusobno isključujuća svojstva lipopleksa. Na primjer, velike količine kationskih lipida olakšavaju vezanje na površinu stanice, ali istovremeno povećavaju citotoksičnost. [15] Nadalje, lipopleksi moraju biti dovoljno stabilni da izdrže putovanje do i preko membrane u unutrašnjost stanice, ali, jednom kada su unutar stanice, moraju biti dovoljno 'krhki' da može doći do dekompozicije i otpuštanja DNK sadržaja u citoplazmu. [16] Stoga je razumijevanje faktora koji definiraju energijska, strukturalna i termodinamička svojstva lipopleksa ključno za optimiziranje njihove transfekcijske efikasnosti. [17]

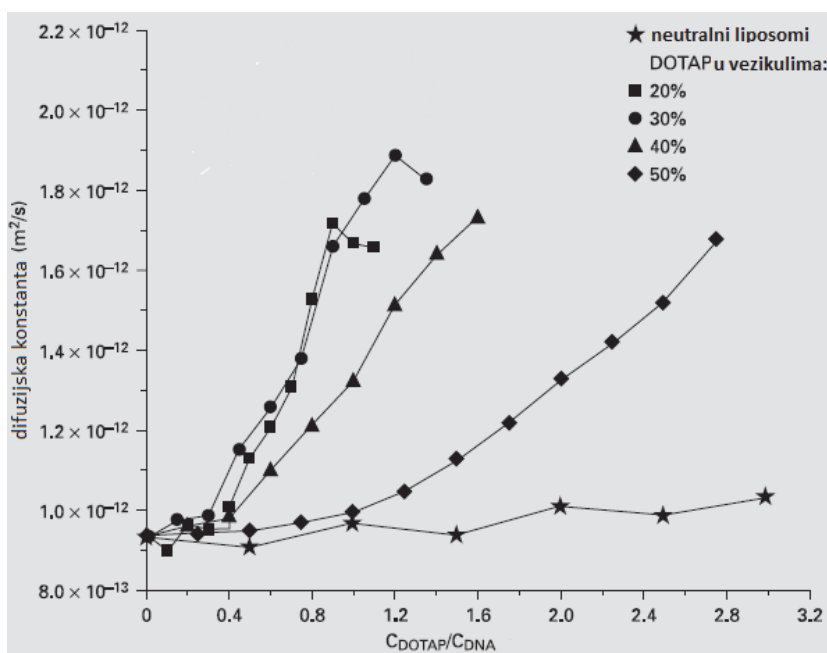
Većina se lipida u vodenoj otopini uređuje u *planarne dvosloje*, često se zatvarajući u vezikule, dok se drugi lipidi uređuju u *inverzno-heksagonalnu fazu*. I dok su lipidni slojevi koji čine ove strukture mekani agregati, DNK je kruta molekula sa zanemarivom strukturalnom fleksibilnošću. Stoga je struktura kompleksa lipida i DNK diktirana svojstvima molekularnog pakiranja lipida, koji mogu promijeniti svoju geometriju nakon kompleksacije. Rezultirajuća geometrija lipopleksa reflektira balansiranje između svojstava pakiranja lipida i elektrostatske interakcije s DNK. [14] U ranim proučavanjima kompleksa pretpostavljano je da se liposomi ne mijenjaju vezanjem s DNK, međutim, elektronska mikroskopija je ukazala na drastičnu reorga-

⁸Amini su organski spojevi, derivati amonijaka, u kojima su atomi vodika zamijenjeni organskim grupama.

nizaciju liposoma i kompletnu enkapsulaciju DNK molekule. [18, 19] Eksperimenti su otkrili bogati polimorfizam nastalih agregata i dali približne informacije o njihovoj veličini i obliku. Temeljeno na vizualnoj pojavi, neke od opaženih struktura dobile su slikovita imena, kao na primjer "špageti" ili "mesne okruglice". [20]



Slika 2.6: Shematski prikazi unutarnje strukture lipopleksa načinjeni pomoću podataka rendgenske difrakcije. A) Lamelarna faza kompleksa. B) Invertirana heksagonalna faza kompleksa. C) Recentno otkrivena heksagonalna faza kompleksa s DNK umetnutom u intersticije sa simetrijom pčelinjeg saća. [21]



Slika 2.7: Ovisnosti difuzijskog koeficijenta fluorescentno označenog β Apr-1-neo plazmida o omjeru koncentracija DOTAP-a i DNK za različite molarne koncentracije DOTAP-a u lipidnom agregatu. [22]

Nije prošlo dugo dok su proučavanja rendgenskom difrakcijom dala strukturalne informacije i otkrila da su lipopleksi periodičke strukture i DNK molekule i lipidnih slojeva, te da postoje dva "kanonska" načina pakiranja: lamelarni i heksagonalni. Shematski prikazi struktura kompleksa napravljeni pomoću podataka dobivenih sinkrotronskom rendgenskom difrakcijom prikazani su na slici 2.6. Na slici je prikazana

i shema još jednog heksagonalnog pakiranja u kojem su DNK molekule umetnute na intersticijska mjesta sa simetrijom pčelinjeg saća. [14]

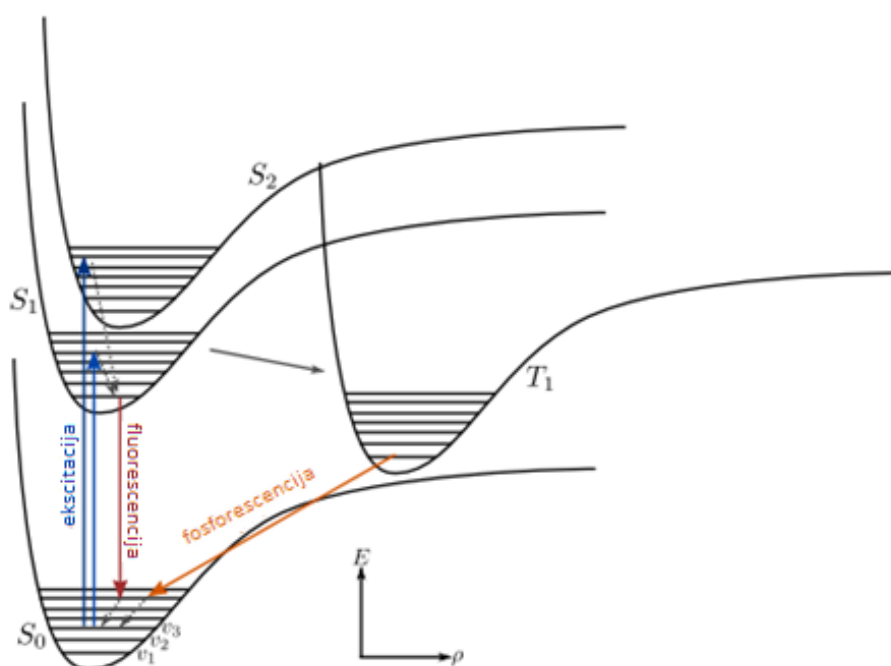
Kao sredstvo za vizualizaciju kompleksacije uspješnom se pokazala metoda fluorescencijske korelacijske spektroskopije, bazirana na fluktuacijskoj analizi fluorescentnog intenziteta i sposobna odrediti difuzijske koeficijente pojedinačne molekule. Budući da su difuzijski koeficijenti korelirani s oblikom i veličinom fluorescentno označene molekule, ta metoda pruža informacije o konformacijskim promjenama u agregatima nastalim kompleksacijom. Kao primjer proučavanja kompleksacije, na slici 2.7 prikazana je ovisnost difuzijskog koeficijenta fluorescentno označenog β Apr-1-neo plazmida⁹ o omjeru koncentracija liposoma i DNK. DNK molekula označena je s PicoGreen fluorescentnom bojom. Ovisnosti su prikazane za različite udjele kationskog DOTAP-a u lipidnom agregatu. Vidljivo je da se difuzijski koeficijent ne mijenja kada se plazmid miješa s neutralnim liposomima. Rezultati pokazuju da fluorescencijna korelacijska spektroskopija omogućava dobivanje izravnih informacija o supramolekularnim interakcijama koje se teško dobivaju s drugim eksperimentalnim tehnikama. [22]

⁹Plazmid je mala DNK molekula unutar stanice koja je fizički odvojena od kromosomske DNK i može se neovisno o njoj replicirati.

3 Metode i materijali

3.1 Fluorescencija

Luminiscencija je emisija svjetlosti iz bilo koje tvari i događa se iz elektronski pobuđenih stanja. Dijeli se formalno na fluorescenciju i fosforescenciju, ovisno o tome je li pobuđeno elektronsko stanje singletno ili tripletno. Osnovno stanje većine molekula je singletno (molekula kisika je primjer iznimke) pa se pobuđeni singletni elektron brzo relaksira u osnovno stanje uz emisiju fotona, budući da takav prijelaz čuva ukupan spin. S druge strane, pri fosforescenciji, krše se kvantno-mehanička izborna pravila promjenom ukupnog spina, pa su vremena života takvih elektrona znatno duža. [23]

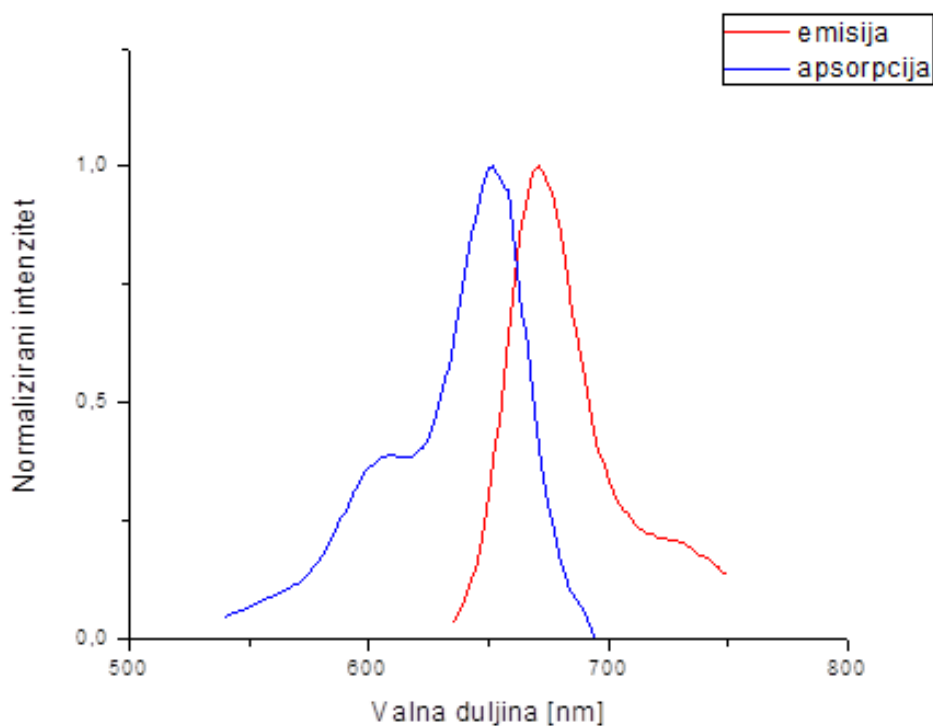


Slika 3.1: Jablonski dijagram s naznačenim osnovnim i pobuđenim stanjima te vibracijskim nivoima. Prikazano je i tripletno stanje. Pune obojene strelice indiciraju ekscitaciju/emisiju fotona, crne točkaste internu konverziju, dok puna crna strelica indicira prijelaz u tripletno stanje. [23]

Najčešći način prikazivanja procesa pri apsorpciji i emisiji svjetlosti jest pomoću Jablonski dijagrama. Tipičan Jablonski dijagram prikazan je na slici 3.1. Osnovno stanje i pobuđena stanja označena su slovima S_0 , S_1 , S_2 , a vibracijski nivoi s v_1 , v_2 , v_3 . Apsorpcijski prijelaz događa se na femtosekundnoj vremenskoj skali i obično podiže jedan od elektrona u više vibracijsko stanje. Nakon apsorpcije, molekula može doživjeti proces interne konverzije u kojem se elektron relaksira u niža vibracijska stanja. U tom se procesu, koji se događa na pikosekundnoj vremenskoj skali, ne oslobađa foton i energija se gubi u obliku topline. Budući da se fluorescencija događa na nanosekundnoj skali, većina će elektrona imati vremena stići do najnižeg vibracijskog nivoa

pobuđenog elektronskog stanja. Iz tog se stanja elektron može relaksirati u osnovno stanje uz emisiju fluorescentnog fotona. Na slici je naznačen i proces fosforescencije.

Drugi način ilustriranja fluorescencije jest pomoću apsorpcijskih i emisijskih spektara. Na slici 3.2 prikazani su apsorpcijski i emisijski spektar molekule cijanina 5 (u daljnjem tekstu Cy5). Cijanin je fluorofora, fluorescentni kemijski spoj koji re-emitira svjetlost nakon ekscitacije, a koristi se kao boja koja se kovalentno veže na makromolekulu i tako djeluje kao marker pri fluorescentnom oslikavanju ili spektroskopiji. Može se primijetiti da su apsorpcijski i emisijski spektar Cy5 gotovo zrcalni jedan drugome što se može objasniti činjenicom da vibracijski nivoi u osnovnom stanju nisu značajno promijenjeni između apsorpcije i emisije. Također, vidljivo je da fluorescentni foton ima nižu energiju od ekscitacijskog fotona, a ta se energijska razlika naziva Stokesov pomak.

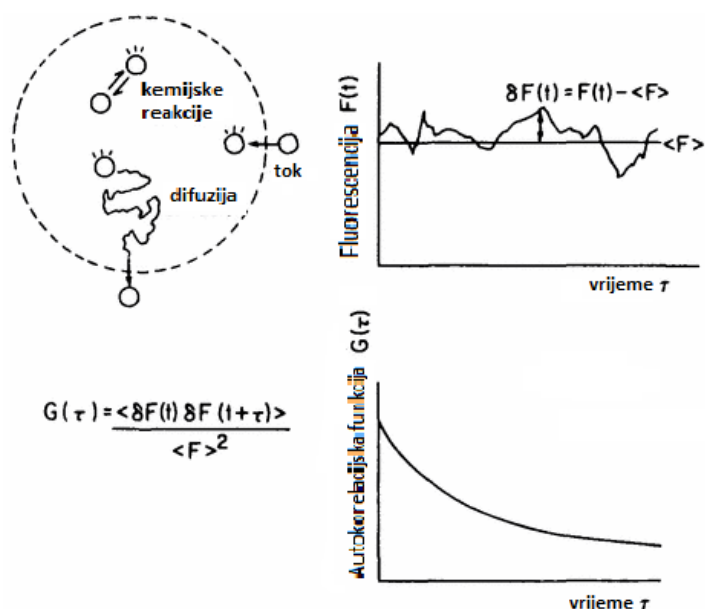


Slika 3.2: Fluorescentni spektar fluorofore Cy5. [24]

3.2 Fluorescencijska korelacijska spektroskopija

Fluorescencijska korelacijska spektroskopija (u daljnjem tekstu FCS) eksperimentalna je metoda korelacijske analize fluktuacija fluorescencijskog intenziteta i predstavlja jednu od mnogih metoda analiziranja ekstremno niskih koncentracija biomolekula pri visokoj prostornoj i vremenskoj rezoluciji. U kontrastu s drugim fluorescencijskim tehnikama, parametar od primarnog interesa nije sam emisijski intenzitet, već radije spontane fluktuacije intenziteta uzrokovane minimalnim devijacijama

malog sustava od termalne ravnoteže. Uz pomoć FCS-a mogu se upravo iz takvih fluktuacija odrediti fizički parametri kao što su lokalna koncentracija ili difuzijski koeficijenti. [25] Sama se tehnika razvila 70.-ih godina kao poseban slučaj relaksacijske analize. Klasične relaksacijske metode induciraju određenu vrstu vanjskih perturbacija kao što su temperatura ili tlak i izvlače informacije o kinetičkim parametrima sustava iz procesa njegova povratka u ravnotežno stanje. Novost u FCS metodi u odnosu na te klasične tehnike je iskorištavanje vrlo malih spontanih fluktuacija fizičkih parametara koji su na neki način povezani s fluorescencijom molekula. Fluktuacije mogu biti kvantificirane u njihovoj snazi i trajanju vremenskim autokoreliranjem snimljenog signala intenziteta, matematičkom procedurom po kojoj je tehnika dobila ime. Autokorelacijska analiza pruža mjeru samo-sličnosti vremenskog niza signala i stoga opisuje postojanost informacije koju signal nosi.¹⁰ [23]



Slika 3.3: Shematski prikaz konceptualne osnove FCS-a i konstrukcije autokorelacijske funkcije. [26]

Jedan od glavnih koncepata FCS-a jest postizanje što manjeg broja opaženih molekula, tako da svaka od njih znatno doprinosi mjerenom signalu.¹¹ U tu se svrhu koriste efikasne fluorescentne boje, snažni i stabilni izvori svjetlosti kao što su laseri, te ultra osjetljivi detektori s jednofotonskom osjetljivošću. Najveći napredak postignut je kombiniranjem FCS-a s konfokalnom detekcijom, kod koje se laserska svjetlost snažno fokusira objektivom visoke numeričke aperture¹² do difrakcijskog limita. Samo je nekoliko obojenih molekula unutar osvijetljenog područja pobuđeno. Kako bi se dodatno ograničio detekcijski volumen u ravninu slike postavlja se iris (eng. *pinhole*), koji blokira svjetlost izvan područja fokusa. Detekcijski se volumen

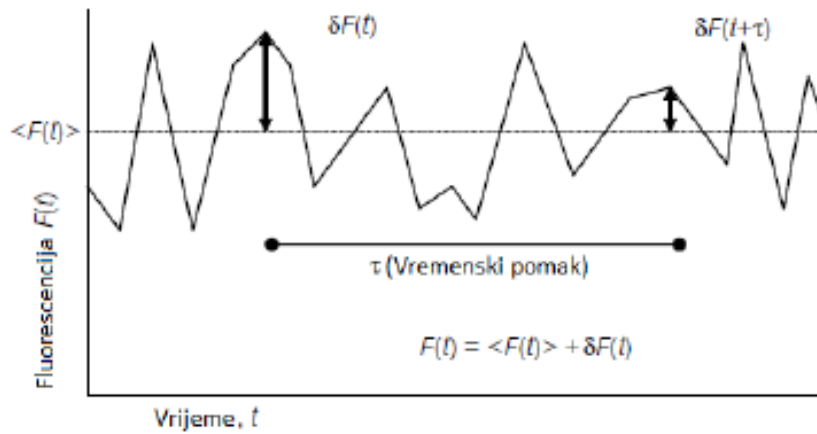
¹⁰Autokorelacija je mjera sličnosti signala sa samim sobom u različitim vremenskim trenucima.

¹¹Kada je broj molekula velik, fluktuacije su premale u odnosu na ukupni signal da bi bile razlučene.

¹²Numerička apertura optičkog sustava bezdimenzionalan je broj koji opisuje raspon kuteva na kojima sustav može primati ili emitirati svjetlost.

može limitirati na manje od jednog femtolitra pa su koncentracije u nanomolarnom području optimalne za obavljanje mjerenja. U tim su uvjetima fluktuacije signala inducirane difuzijom molekula u i izvan fokalnog volumena dovoljno velike da proizvedu dobre signal-šum omjere. [27]

Konceptualna osnova FCS-a ilustrirana je na slici 3.3. U ravnoteži, fluorescentne molekule prenose se difuzijom ili tokom kroz otvoreno i osvijetljeno područje opservacije ili doživljavaju prijelaze između stanja različitog fluorescentnog doprinosa. To uzrokuje temporalne fluktuacije u mjerenom fluorescencijskom intenzitetu. Fluktuacije δF u fluorescenciji $F(t)$ od prosječne fluorescencije $\langle F \rangle$ autokorelirane su kao $G(t)$. Autokorelacijska funkcija, koja mjeri prosječno trajanje fluktuacije fluorescencije, opada s vremenom, a brzina i oblik opadanja povezani su s mehanizmima i brzinama procesa koji generiraju same fluktuacije.



Slika 3.4: Ilustracija fluktuacija fluorescentnog signala. [27]

U FCS-u razmatraju se korelacije između fluorescentnog intenziteta i istog intenziteta u nekom trenutku τ kasnije, odnosno između fluktuacije intenziteta i fluktuacije intenziteta u trenutku τ kasnije. Ilustracija fluktuacija signala vidljiva je na slici 3.3, a detaljnije je prikazana na slici 3.4 na kojoj je naznačen i vremenski pomak τ . Vremenske korelacije intenziteta samog sa sobom ili autokorelacije definirane su kao:

$$G(\tau) = \frac{\langle F(t)F(t + \tau) \rangle}{\langle F^2 \rangle} \quad (3.1)$$

$$g(\tau) = \frac{\langle \delta F(t)\delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F^2 \rangle} \quad (3.2)$$

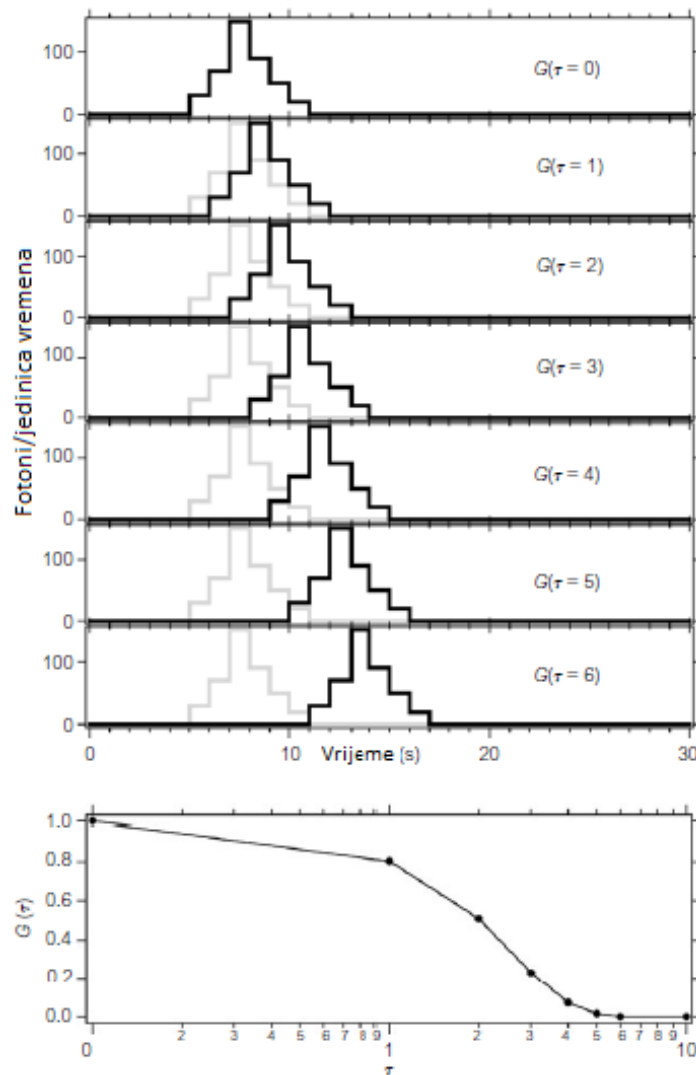
gdje je veza između $G(\tau)$ i $g(\tau)$:

$$G(\tau) = 1 + g(\tau). \quad (3.3)$$

Ne-normalizirana autokorelacija vremenskog niza podataka dana je kao:

$$g(\tau) = \frac{1}{T} \int_0^T \delta F(t)\delta F(t + \tau)dt \quad (3.4)$$

gdje je T ukupno vrijeme snimanja. Na slici 3.5 shematski je prikazano računanje autokorelacije iz skupa podataka za jednu molekulu. Kada se radi o eksperimentalnom određivanju autokorelacijske funkcije u obzir se moraju uzeti korištena vremena integracije (širine intervala po kojima se zbraja), te vremenske skale fluktuacija od interesa. Autokorelacijska funkcija može se odrediti koristeći hardverski korelator. On bilježi fluktuacije u intenzitetu, zatim ih pohranjuje, množi s fluktuacijama u kasnijim vremenima, te sve to zbraja i normalizira. Današnja sofisticirana elektronika dopušta variranje vremena integracije i sposobna je prikazati autokorelacijsku funkciju u realnom vremenu za one vremenske odmake τ za koje je to moguće u tom stadiju mjerenja. [27]



Slika 3.5: Shematski prikaz principa računanja autokorelacije iz skupa podataka za jednu molekulu (gore). Fluorescentni signal $F(t)$ pomaknut je za korelacijsko vrijeme τ (u ovom slučaju integracijsko vrijeme). Nakon toga, originalni i pomaknuti signal su pomnoženi, te je integrirano područje pohranjeno kao vrijednost autokorelacijske funkcije u trenutku τ . Vrijednosti autokorelacijske funkcije $G(\tau)$ zatim su prikazane na logaritamskoj skali korelacijskog vremena (dolje). [27]

Ako se pretpostavi da sve fluktuacije nastaju samo zbog promjena u lokalnoj koncentraciji δC unutar efektivnog volumena, varijacije se mogu zapisati kao:

$$\delta F(t) = \kappa \int_V I_{ex}(\mathbf{r}) \cdot S(\mathbf{r}) \cdot \delta(\sigma \cdot q \cdot C(\mathbf{r}, t)) \cdot dV. \quad (3.5)$$

Pojedinačni parametri u gornjem izrazu uglavnom opisuju vjerojatnost pobuđenja fluorescentne čestice unutar fokalnog volumena, te vjerojatnost naknadnog detektiranja emitiranog fotona. Tu je κ ukupna efikasnost detekcije, $I_{ex}(\mathbf{r})$ je prostorna raspodjela ekscitacijske energije s maksimalnom amplitudom I_0 , a $S(\mathbf{r})$ je bezdimenzionalna optička transfer funkcija. Preostali član opisuje dinamiku fluorescentne čestice: $\delta\sigma$ opisuje fluktuacije u molekularnom apsorpcijskom presjeku, δq fluktuacije u kvantnoj propusnosti, a $C(\mathbf{r}, t)$ fluktuacije u lokalnoj koncentraciji čestica u trenutku t (Brownovo gibanje). [27]

Da bi se gornja jednadžba pojednostavnila, koristi se konvolucija dvije bezdimenzionalne prostorne optičke transfer funkcije $I_{ex}(\mathbf{r})/I_0$ i $S(\mathbf{r})$. Kao rezultat dobiva se jedna funkcija PSF($\mathbf{r}$)¹³, koja opisuje prostornu distribuciju emitirane svjetlosti. Vrlo uspješan i često korišten model PSF funkcije mjereni volumen opisuje trodimenzionalnim gausijanom [28]:

$$\text{PSF}(\mathbf{r}) = \exp\left(\frac{2(x^2 + y^2)}{\omega_0^2} - \frac{2z^3}{z_0^2}\right). \quad (3.6)$$

Preostali parametri κ , σ i q mogu se kombinirati s amplitudom I_0 da bi dali parametar koji određuje broj fotona po detektiranoj molekuli po sekundi $\eta_0 = I_0 \cdot \kappa \cdot \sigma \cdot q$. Ovaj parametar može biti mjera signal-šum omjera te se tako koristiti kao brza usporedba kvalitete različitih postavki. Koristeći navedene informacije, jednadžba 3.5 postaje:

$$\delta F(t) = \int_V \text{PSF}(\mathbf{r}) \delta(\eta C(\mathbf{r}, t)) dV. \quad (3.7)$$

Supstitucijom jednadžbe 3.7 u jednadžbu 3.2 dobiva se:

$$g(\tau) = \frac{\int \int \text{PSF}(\mathbf{r}) \text{PSF}(\mathbf{r}') \langle \delta(\eta C(\mathbf{r}, t)) \delta(\eta C(\mathbf{r}', t + \tau)) \rangle dV dV'}{(\int \text{PSF}(\mathbf{r}) \langle \delta(\eta C(\mathbf{r}, t)) \rangle dV)^2}. \quad (3.8)$$

Izraz 3.8 bit će vrlo pojednostavljen ukoliko su ili koncentracija ili parametar η konstantni za dani sustav. Pretpostavi li se prvo da se fluorescentna svojstva čestice ne mijenjaju u vremenu, tj. da je $\delta\eta = 0$, uz separaciju $\delta(\eta C(\mathbf{r}, t)) = C\delta\eta + \eta\delta C$ jednadžba 3.8 postaje:

$$g(\tau) = \frac{\int \int \text{PSF}(\mathbf{r}) \text{PSF}(\mathbf{r}') \langle (\delta C(\mathbf{r}, 0) \delta C(\mathbf{r}', \tau)) \rangle dV dV'}{(\langle C \rangle \int \text{PSF}(\mathbf{r}) dV)^2} \quad (3.9)$$

Ponašanje fluktuacija koncentracije određeno je difuzijskom jednadžbom:

¹³PSF (eng. *Point Spread Function*) je konvolucija profila intenziteta ekscitacijske svjetlosti s volumenom iz kojeg se skuplja fluorescencija.

$$\frac{\partial \delta C(\mathbf{r}, t)}{\partial t} = D \nabla^2 \delta C(\mathbf{r}, t) \quad (3.10)$$

s rubnim uvjetom $\delta C(\mathbf{r}, t) = 0$ u $\mathbf{r} = 0$. Rješenje uz primjenu Fourierove transformacije je:

$$\tilde{C}(\mathbf{v}, t) = \tilde{C}(\mathbf{v}, 0) \exp(-Dv^2 t) \quad (3.11)$$

gdje je D koeficijent difuzije, neovisan o korištenim postavkama sustava. Sada se može izračunati tzv. autokorelacijska funkcija fluktuacija koncentracije, funkcija koja povezuje fluktuacije u dvije proizvoljne točke u prostoru, razmaknute za vremenski interval τ :

$$\langle \delta C(\mathbf{r}, 0) \delta C(\mathbf{r}', \tau) \rangle = \frac{1}{(2\pi)^{3/2}} \int d^3 v e^{-\mathbf{v} \cdot \mathbf{r}'} \langle \delta C(\mathbf{r}, 0) \tilde{C}(\mathbf{v}, t) \rangle. \quad (3.12)$$

Koristeći izraz 3.5, uz nešto računanja, dobiva se:

$$\langle \delta C(\mathbf{r}, 0) \delta C(\mathbf{r}', \tau) \rangle = \frac{\langle C \rangle}{(4\pi D \tau)^{-3/2}} \cdot e^{-\frac{\mathbf{r} \cdot \mathbf{r}'}{4D\tau}}. \quad (3.13)$$

Slijedi:

$$g(\tau) = \frac{1}{\langle C \rangle (4\pi D \tau)^{-3/2}} \frac{\int \int \text{PSF}(\mathbf{r}) \text{PSF}(\mathbf{r}') \cdot e^{-\frac{\mathbf{r} \cdot \mathbf{r}'}{4D\tau}} dV dV'}{\left(\int \text{PSF}(\mathbf{r}) dV \right)^2}. \quad (3.14)$$

Koristeći se definicijom efektivnog fokalnog volumena [27]:

$$V_{ef} = \frac{\left(\int \text{PSF}(\mathbf{r}) dV \right)^2}{\int \text{PSF}(\mathbf{r}) dV} = \pi^{3/2} \cdot \omega_0^2 \cdot z_0 \quad (3.15)$$

te vezom između lateralnog vremena difuzije τ_D i koeficijenta difuzije:

$$\tau_D = \frac{\omega_0^2}{4D}, \quad (3.16)$$

za autokorelacijsku funkciju jedne slobodno difundirajuće vrste molekula dobiva se:

$$g(\tau) = \frac{1}{V_{ef} \langle C \rangle} \cdot \frac{1}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_D} \right)} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + \left(\frac{\omega_0}{z_0} \right)^2 \cdot \frac{\tau}{\tau_D}}}. \quad (3.17)$$

Prvi faktor u gornjoj jednadžbi inverz je prosječnog broja čestica $\langle N \rangle$ unutar fokalnog volumena. Koeficijent difuzije može se izračunati pomoću karakterističnog vremena opadanja korelacijske funkcije τ_D .

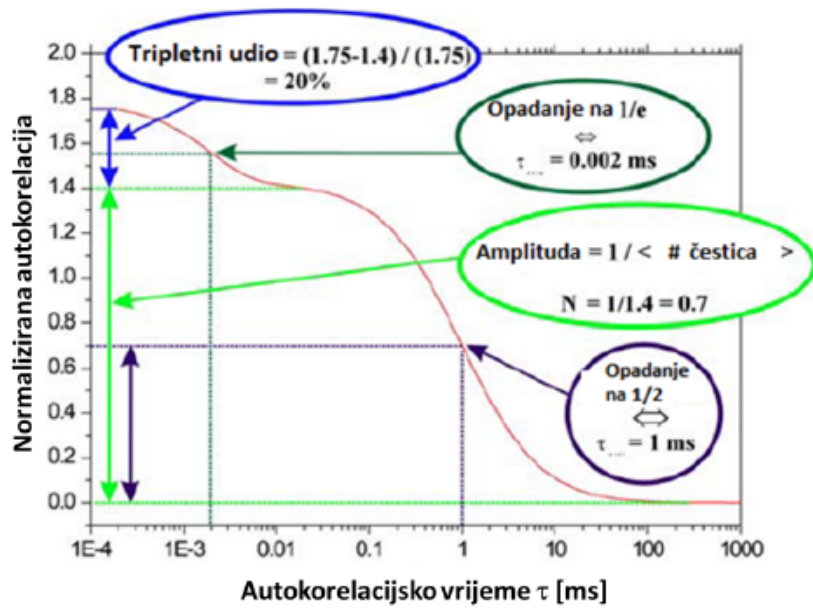
Izraz za autokorelacijsku funkciju izveden je uz pretpostavku da se fluorescentna svojstva ne mijenjaju dok molekula prolazi kroz fokus lasera. U stvarnosti to nije tako, a najčešći uzrok takvog "treperenja" intenziteta fluorescencije je tranzicija u prvo pobuđeno tripletno stanje. Prema kvantnoj mehanici prijelazi takve vrste su zabranjeni pa je vrijeme relaksacije relativno dugo. Tijekom tog intervala, molekula

ne može emitirati fluorescentne fotone, pa se prekida inače kontinuirana emisija fluorescencije.

Umjesto ponovnog izračunavanja ispravne autokorelacijske funkcije za ovakve blago izmijenjene uvjete, moguće je koristiti mnogo jednostavniju i općenitiju formu. Ako intramolekularne ili intermolekularne reakcije uzrokuju fluktuacije intenziteta na vremenskim skalama puno bržim od onih na kojima se događaju fluktuacije zbog samog gibanja čestica, moguća je separacija dinamike:

$$g_{ukupno}(\tau) = g_{gibanje}(\tau) \cdot X_{triplet}(\tau). \quad (3.18)$$

Naravno, ovakva je pretpostavka valjana samo u slučaju da reakcije ne mijenjaju koeficijent difuzije. [27]



Slika 3.6: Primjer autokorelacijske krivulje s brzom tripletnom dinamikom. [27]

Može se pokazati da se za tripletni dio autokorelacijske funkcije dobiva [27]:

$$X_{triplet}(\tau) = \frac{1}{1-T} (1 - T + T \cdot e^{-\frac{\tau}{\tau_{triplet}}}) \quad (3.19)$$

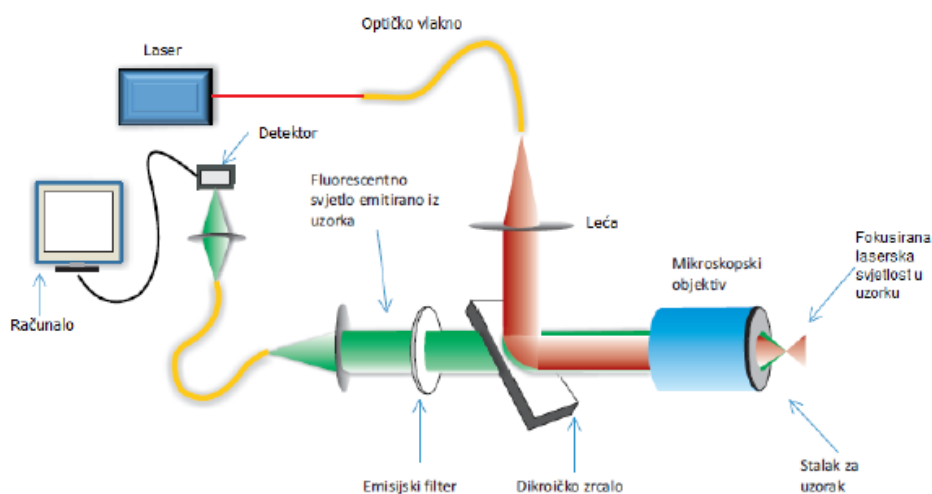
gdje je T udio molekula u tripletnom stanju, a $\tau_{triplet}$ karakteristično tripletno relaksacijsko vrijeme. Tripletni dio autokorelacijske funkcije manifestira se kao dodatno "rame" u mjerenim krivuljama na kratkim vremenskim skalama. Primjer autokorelacijske krivulje s brzom tripletnom dinamikom prikazan je na slici 3.5. Potpuna autokorelacijska funkcija za slobodnu česticu jest:

$$g_{ukupno}(\tau) = \left(\frac{1 - T + T \cdot e^{-\frac{\tau}{\tau_{triplet}}}}{1 - T} \right) \cdot \frac{1}{V_{ef}\langle C \rangle} \cdot \frac{1}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + \left(\frac{\omega_0}{z_0}\right)^2 \cdot \frac{\tau}{\tau_D}}}. \quad (3.20)$$

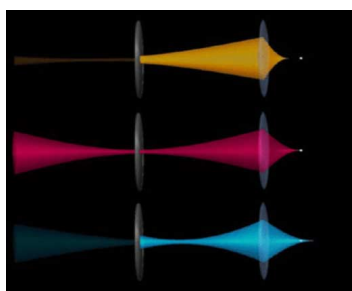
Osim difuzije i tripletne dinamike, postoje i drugi mehanizmi koji mogu utjecati na FCS mjerenja, no njih je teško pridružiti određenoj vremenskoj skali.

3.3 Mjerni uređaj

Općeniti konfokalni mjerni postav za fluorescencijsku korelacijsku spektroskopiju shematski je ilustriran na slici 3.7. Svjetlost lasera prvo prolazi kroz optičko vlakno koje služi "pročišćavanju" snopa rezanjem bilo kakvih nepravilnosti na rubovima snopa, a to je bitno zbog postizanja što pravilnijeg konačnog oblika volumena unutar uzorka. Nakon optičkog vlakna svjetlost prolazi kroz kulimacijsku leću na kojoj se širina snopa prilagođava tako da prekrije čitavu površinu objektiva. Na taj se način u potpunosti iskorištava visoka numerička apertura objektiva i postiže se veća razlučivost.



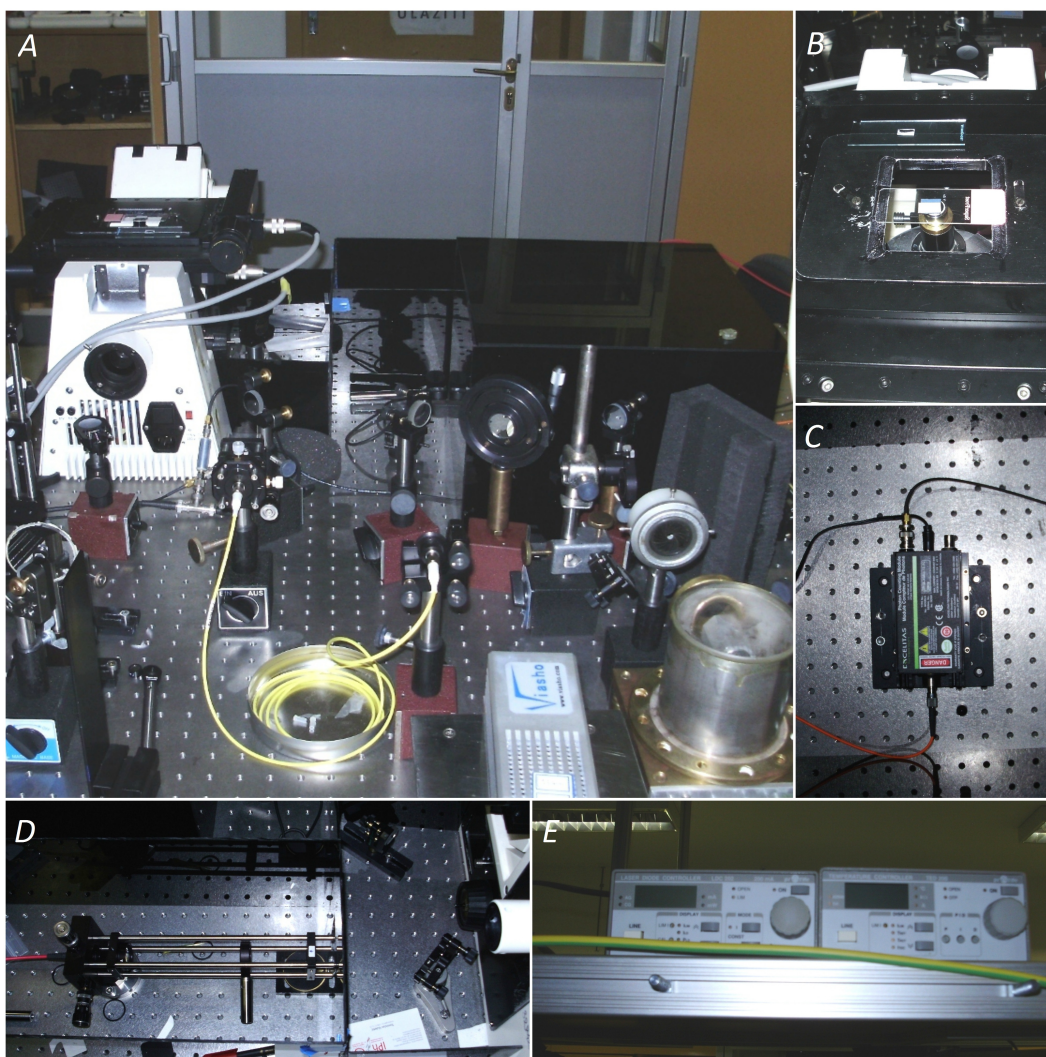
Slika 3.7: Eksperimentalni postav za fluorescentnu korelacijsku spektroskopiju. [27]



Slika 3.8: Shematski prikaz konfokalnog principa. Bijela točka označava dio uzorka koji se nalazi na fokalnoj ravni leće. [29]

Prije nego što dođe do objektiva i fokusira se na uzorak, svjetlost lasera nailazi i na dikroično (dikromatsko) zrcalo koje reflektira lasersku svjetlost, a propušta fluorescentnu. Fluorescentna svjetlost s uzorka skupljena je istim objektivom i propuštena kroz dikroično zrcalo i emisijski filter. Jedan ili više emisijskih filtera potrebno je postaviti na put fluorescentne svjetlosti budući da je uspjeh blokiranja neželjene (laserske) svjetlosti dikroičkim zrcalom uglavnom vrlo slab. Fluorescentna svjetlost zatim je uz pomoć leće fokusirana na iris i drugo optičko vlakno. Uloga irisa u konfokalnom postavu jest blokiranje bilo kakve svjetlosti emitirane izvan fokalnog područja,

što je shematski prikazano na slici 3.8. Bijelom točkom označen je dio uzorka koji se nalazi na fokalnoj ravnini leće i, budući da je svjetlost emitirana s tog dijela uzorka fokusirana točno na iris, prikupljeni signal je visokog intenziteta. To je prikazano srednjim dijagramom na slici. Svjetlost emitirana s dijela uzorka izvan fokalne ravnine leće fokusirana je s desne ili lijeve strane irisa i stoga je signal koji se šalje na detektor slab (gornji i donji dijagram). Dakle, samo fluorescentna svjetlost iz malog konfokalnog volumena prolazi kroz iris, iako je puno veći volumen uzorka osvijetljen. Nakon irisa, svjetlost je fokusirana na detektor, a signal s detektora zatim je obrađen pomoću pripadne elektronike i prikazan na računalu.



Slika 3.9: A) FCS postav sklopljen na Institutu za fiziku. Na slici se vide laser, različita zrcala, optičko vlakno te kućište s objektivom. U crnim kutijama nalaze se iris i detektor. B) Objektiv i kutijice s uzorcima. C) Detektor. D) Izlazni dio postava s filtrom, irisom i optičkim vlaknom. E) Regulatori temperature diode i struje kroz diodu.

Za potrebe ovog rada, FCS postav sklopljen je u Laboratoriju za lasersku spektroskopiju pri Institutu za fiziku. Različiti dijelovi korištenog uređaja prikazani su na slici 3.9.

Kao izvor svjetlosti korišten je poluvodički diodni laser valne duljine 632 nm. La-

ser sadrži termoelektrični modul za hlađenje koji radi na principu Peltierovog efekta. Regulatori temperature i struje kroz diodu prikazani su na slici 3.9 E.

Svjetlost lasera pomoću dvaju ravnih zrcala usmjerena je na ulaz optičkog vlakna. Pomoću vijaka kojim se zrcala mogu zakretati gore-dolje i lijevo-desno namještana je putanja laserske zrake kako bi se ista što preciznije usmjerila na ulaz optičkog vlakna. Na taj se način minimiziraju gubitci intenziteta zrake pri prolasku kroz vlakno. Pri temperaturi diode od 20 °C i struji kroz diodu od 50 nA, mjerачem snage utvrđeno je da je snaga na ulazu u vlakno približno 5.2 mW, dok je snaga na izlazu iz vlakna 1.52 mW. Dakle, na izlazu iz vlakna snaga zrake gotovo je 30 % početne, što se pokazalo sasvim dovoljno za potrebe provedenih FCS mjerenja.

Kao što je prethodno već spomenuto, nakon optičkog vlakna, zraka svjetlosti usmjerena je na kulimacijsku leću, a nakon toga, zraka se sustavom dvaju ravnih zrcala, preko dikroičkog zrcala, dovodi na objektiv. Pri tome se, korištenjem vijaka za pomicanje zrcala, zraka nastoji što preciznije usmjeriti na sredinu dikroičkog zrcala, a samim time i na objektiv. Korišten je objektiv visoke numeričke aperture, $NA = 1.2$. Prednji dio mjernog uređaja prikazan je na slici 3.9 A. Dikroičko se zrcalo može i pomaknuti tako da laserska zraka prati put fluorescencijske svjetlosti nakon refleksije na donjoj površini posudice za uzorke (slika 3.9 B). Taj položaj zrcala korišten je pri namještanju visine objektiva prilikom mjerenja.

Fluorescentna svjetlost s uzorka zatim se pomoću još jednog sustava ravnih zrcala dovodi na leću koja dalje fokusira svjetlost na iris. Prije irisa, svjetlost prolazi kroz emisijski filtar koji blokira neželjenu lasersku svjetlost još prisutnu u snopu. Vanjska zrcala, kao i iris, imaju vijke kojima se njihov položaj može fino namještati, a leća se može horizontalno pomicati. Svi navedeni stupnjevi slobode namještani su tako da se dobiju što kvalitetnija mjerenja autokorelacije. Vanjski dio mjernog uređaja prikazan je na slici 3.9 D.

Prolaskom kroz iris zraka se optičkim vlaknom promjera 100 μm dovodi na detektor (slika 3.9 C). Korišten je SPCM-AQRH (eng. *Single Photon Counting Module*) detektor (Excelitas Technologies') koji detektira pojedinačne fotone unutar intervala valnih duljina od 400 do 1200 nm. Signal s detektora poslan je na PC karticu koja sadrži dijelove za tzv. TCSPC¹⁴ tehniku, tj. tehniku vremenski koreliranog brojanja fotona koja je korištena pri mjerenjima. Ta se tehnika bazira na detekciji pojedinačnih fotona u nekom periodičkom svjetlosnom signalu, mjerenju vremena detekcije, te rekonstrukciji profila vala iz individualnih mjerenja.

TCSPC modul povezan je s računalom i dolazi s odgovarajućim softverom koji uključuje postavke parametara, kontrolu mjerenja, kontrolu skeniranja, učitavanje i pohranjivanje mjerenih podataka te prikaz u 2-dimenzionalnom i 3-dimenzionalnom modu. Pohrana podataka omogućena je u ASCII formatu.

¹⁴eng. *Time Correlated Single Photon Counting*

3.4 Materijali

Pri optimizaciji i testiranju eksperimentalnog postava korištena je 5 mM otopina već spomenute fluorofore Cy5, koja je pri mjerenjima dodatno razrjeđivana, ovisno o potrebi samog mjerenja. Cy5 je često korišten kao standardna kontrola za analizu difuzija FCS-om budući da je difuzijski koeficijent Cy5 ekstenzivno proučavan i dobro poznat.

DNK uzorci korišteni pri mjerenjima obuhvaćali su različite sintetičke DNK molekule s malim brojem parova baza. Rezultati prikazani u ovom radu odnose se na dvostruko zavijene DNK molekule (BioVit) s 15 i 60 parova baza (u daljnjem tekstu DNK15 i DNK60). Priprema dvostrukih DNK molekula uključivala je sljepljivanje jednostrukih komplementarnih DNK. Nakon što su pomiješane otopine jednostrukih DNK u omjeru 1 : 1, stavljene su u termoblok na 95°C na 5 minuta, a zatim su ostavljene da se hlade do sobne temperature kako bi se DNK lanci slijepili. Sljepljivanje se izvršava sporim hlađenjem kako ne bi došlo do neželjenih sekundarnih struktura. Koncentracija DNK molekula u otopini je 20 nM.

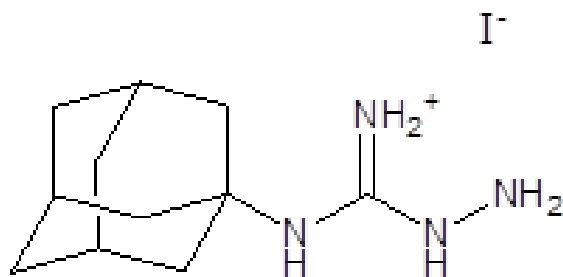
Kratika uzorka	Opis uzorka
LP1	negativni liposomi sastava Pc : Chol = 7 : 5
LP2	pozitivni liposomi sastava Pc : Chol : DOTAP = 7 : 5 : 1
LP3	liposomi sastava Pc : Chol = 7 : 5 s ugrađenim spojem 7 (5 mM), efikasnost ugrađivanja 48 %
LP4	liposomi sastava Pc : Chol = 7 : 5 s ugrađenim spojem 7 (10 mM), 1 mM Tris, efikasnost ugrađivanja 21 %
LP5	pozitivni liposomi sastava Pc : Chol : DOTAP = 7 : 5 : 1, 1 mM Tris

Tablica 3.1: Kratice i opisi pojedinih liposomskih uzoraka korištenih u mjerenjima.

Liposomski uzorci pripremani su na Imunološkom zavodu u Laboratoriju za imunokemiju i biokemiju hidratacijom tankog lipidnog filma. Pri eksperimentima opisanim u radu korištene su tri vrste liposomskih uzoraka: negativno nabijeni liposomi, liposomi s ugrađenim spojem 7 i pozitivno nabijeni (kationski) liposomi. Opisi svih korištenih uzoraka, zajedno s njihovim kraticama korištenim u tekstu, dani su u tablici 3.1. Uzorci s ugrađenim spojem pripremljeni su tako da su fosfatidilkolin iz jajeta i kolesterol u molarnom omjeru 7:5 otopljeni u sustavu otapala kloroform : metanol = 1:1. U otopinu lipida zatim je dodan spoj 7 (adamantan-aminogvanidin) otopljen u metanolu, tako da mu u liposomskoj suspenziji bude ukupna koncentracija 5 mM (LP3) ili 10 mM (LP4). Nakon uparavanja otapala, lipidni film je hidratiziran s puferom tako da koncentracija lipida bude 10 mg/mL. Korišten je 10 mM Tris pufer (LP3), odnosno 1 mM (LP4), u oba slučaja pH vrijednosti 7.5. Pripravljene liposomi ostavljeni su preko noći na 4 °C da se stabiliziraju i bubre. Liposomi

su centrifugiranjem pri 3220 g, 75 min na 4 °C odvojeni od neugrađenog materijala. Supernatanti su spremljeni, a liposomski talog resuspendiran je s puferom. Veličina liposoma smanjena je višestrukom ekstruzijom kroz membranu od 800 i 100 nm korištenjem ekstrudera (LiposoFast, Avestin, Canada). Efikasnost ugrađivanja spojeva u liposome određena je spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije spoja u supernatantima odvojenih centrifugiranjem iz liposomske suspenzije. Količina spojeva u supernatantima određena je iz standardnih pravaca, a količina ugrađenog materijala indirektno je izračunata oduzimanjem količine spojeva u supernatantima od ukupne količine spojeva korištenih za pripravu liposoma. Koncentracije spoja korištene za standardni pravac bile su u rasponu od 0.025-0.2 mg/mL. Supernatant je razrijeđen 100 puta. Apsorbancija je mjerena na 240 nm. U liposome se ugradilo 48 % spoja (LP3), odnosno 21 % (LP4).

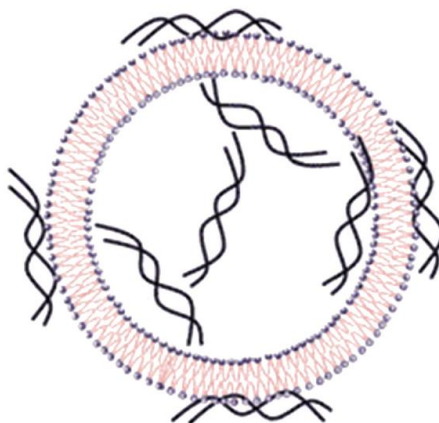
Navedeni spoj kombinira dva strukturna fragmenta u istoj molekuli: adamantanski fragment i derivat gvanidina. Kemijska struktura korištenog spoja 7 prikazana je na slici 3.10. Adamantanski fragment često je prisutan u strukturama različitih bioaktivnih spojeva i to zahvaljujući njegovim posebnim svojstvima koja uključuju lipofilnost¹⁵, krutost strukture i malu napetost u molekuli, a time se poboljšava stabilnost i distribucija spojeva u krvnoj plazmi i omogućava lakši prolazak kroz staničnu membranu. S druge strane, gvanidini su poznati kao važni građevni elementi u stanicama živih organizama, pa je gvanidinska podjedinica dio aminokiseline arginina te purinske baze gvanina. Gvanidin je jedna od najjačih organskih baza, a sastoji se od ugljikovog atoma povezanog s trima dušikovim atomima, pri čemu su prisutna dva aminska i jedan iminski dušik. Gvanidinske podjedinice prisutne su u mnogim biološki aktivnim molekulama, a neki od tih spojeva već imaju svoju primjenu u kliničkom liječenju. Gvanidini imaju svoju funkciju i kod transporta kroz molekulske membrane zbog svoje interakcije s fosfatnim ili nekim drugim anionskim podjedinicama prisutnim na površini stanica. Jako vezivanje vodikovim vezama te elektrostatske interakcije koje gvanidini omogućuju prva su faza u procesima transporta. Zbog navedenih svojstava derivati gvanidina imaju potencijalnu primjenu kao nosači bioaktivnih molekula kroz staničnu membranu. [30]



Slika 3.10: Struktura spoja 7, adamantan-aminogvanidina.

¹⁵Lipofilnost je svojstvo nekih spojeva da se lako otapaju u uljima i mastima.

Dva su načina na koja se spoj 7 ugrađuje u liposome: spoj se može ugraditi u vodu unutrašnjost liposoma ili u sam lipidni dvosloj na površini liposoma. Ugrađivanje pozitivno nabijene gvanidinske grupe na površinu liposoma testira se reakcijama liposoma s komplementarnim liposomima koji sadrže negativno nabijene fosfatne grupe ugrađene na površinu. Komplementarni liposomi se međusobno povezuju, što rezultira stvaranjem divovskih liposoma te multikomponentnih liposomskih sustava. Zbog svih navedenih razloga i zbog mogućnosti interakcije s anionskim podjedinicama spoj 7 ugrađivan je u liposomske uzorke i proučavana je moguća kompleksacija s DNK molekulom. Očekivani kompleks koji nastaje miješanjem ovakvih liposoma s DNK molekulom shematski je prikazan na slici 3.11. [31]



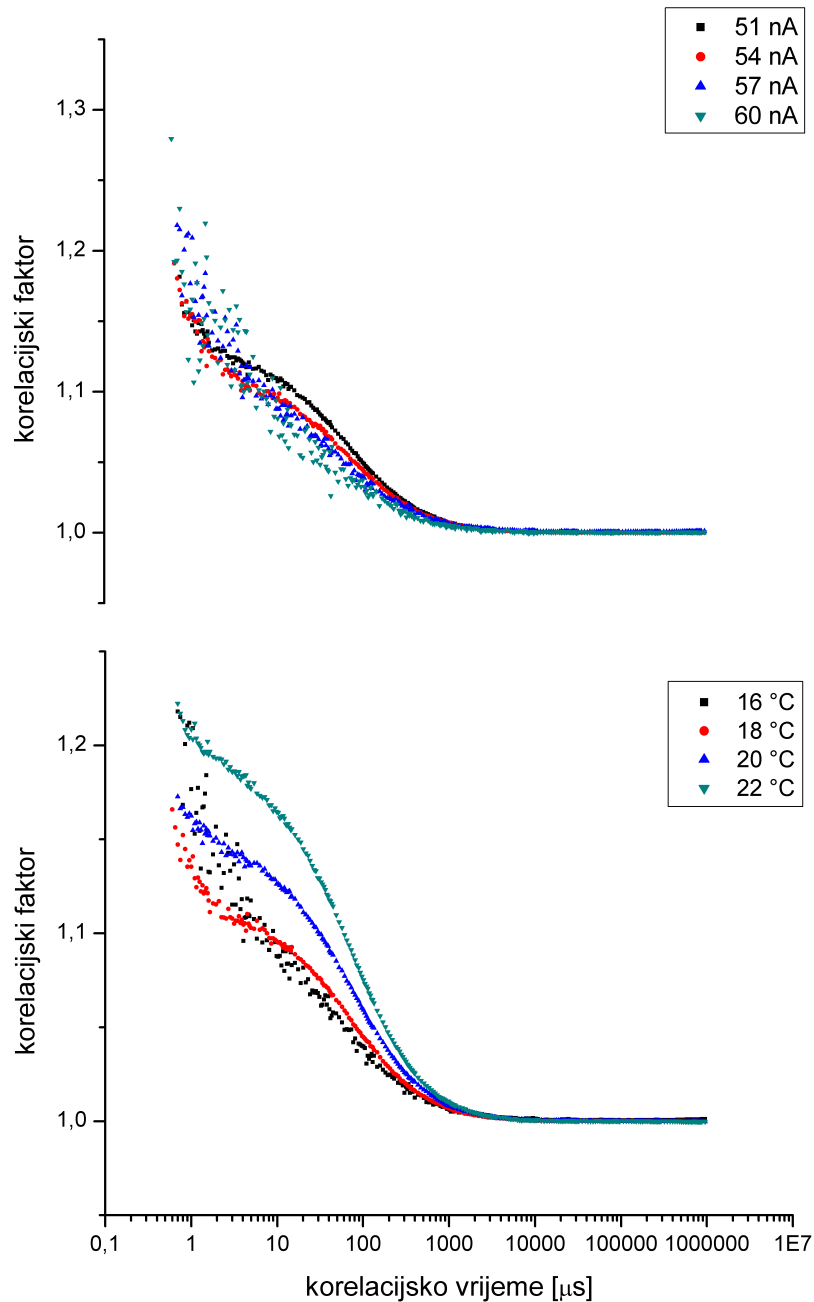
Slika 3.11: Shematski prikaz očekivanog kompleksa lipida sa spojem 7 i DNK molekula.

Pozitivno nabijeni liposomi pripremljeni su tako da su fosfatidilkolin iz jajeta, kolesterol i DOTAP u molarnom omjeru 7:5:1 otopljeni u sustavu otapala kloroform : metanol = 1:1. Nakon uparavanja otapala, lipidni film je hidratiziran s 10 mM Tris puferom (LP2), odnosno 1 mM (LP5), tako da koncentracija lipida bude 10 mg/mL. Pripravljene liposomi ostavljeni su preko noći na 4 °C da se stabiliziraju i bubre. Veličina liposoma smanjena je višestrukom ekstruzijom kroz membranu od 800 i 100 nm korištenjem ekstrudera (LiposoFast, Avestin, Canada). Na analogan način pripremljeni su i negativni liposomi. Lipidni filmovi su u tom slučaju hidratizirani s 10 mM Tris puferom.

3.5 Optimizacija mjernog uređaja

Prije samog korištenja za mjerenja, uređaj je kalibriran i optimiziran. Kao kalibracijski uzorak korištena je 5 mM otopina fluorofore Cy5 koja je pri mjerenju dodatno razrijeđena u 300 μ L vode. Na računalu su promatrane autokorelacijske krivulje koje se dobivaju mjerenjima. Podešavani su vijci na vanjskim zrcalima prije objektiva, te vijci za zakretanje irisa, dok na računalu nije dobiven zadovoljavajući izgled mjerenih krivulja. Ista procedura provjere pozicija zrcala i irisa provedena je i poslije, prije svakog mjerenja, budući da i iznimno maleni pomaci dijelova uređaja znatno utječu

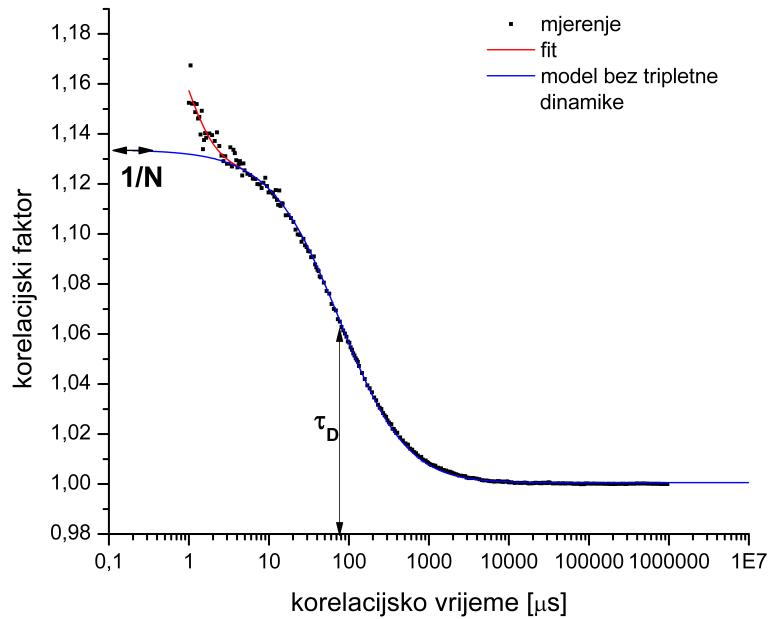
na kvalitetu dobivenih krivulja. Za svaki pojedini uzorak provedeno je pet mjerenja, svako s integracijskim vremenom od 1 minute, a podaci su prilikom obrade usrednjavani i analizirani. Inicijalno, struja kroz diodu postavljena je na 50 nA, dok je temperatura diode postavljena na 20 °C. Pri postupku optimizacije uređaja, ta su dva parametra mijenjana kako bi se odredila optimalna konfiguracija mjernog uređaja u svrhu dobivanja što kvalitetnijih mjerenja. Na slici 3.12 prikazane su mjerene autokorelacije Cy5 za različite vrijednosti struje kroz diodu i za različite vrijednosti temperature diode.



Slika 3.12: Gore: Mjerene autokorelacije Cy5 za različite vrijednosti struje kroz lasersku diodu. Dolje: Mjerene autokorelacije Cy5 za različite vrijednosti temperature laserske diode.

Na grafovima sa slike 3.12 vidljivo je da su mjerene autokorelacijske krivulje puno

preciznije pri višim strujama kroz diodu i pri nižim temperaturama diode. Mjerenja nisu provođena za struje više od 60 nA iz dva razloga. Prvo, pri višim vrijednostima struje veći bi intenzitet laserske zrake mogao uzrokovati fotoizbjeljivanje¹⁶ koje bi umanjilo fluorescenciju. Drugo, povećao bi se udio reflektirane laserske svjetlosti koja prođe kroz filter, a to bi znatno utjecalo na kvalitetu mjerenja. S druge strane, mjerenja pri temperaturama nižim od 16 °C nisu provođena zbog poteškoća u hlađenju diode Peltierovim efektom (mjerenja su vršena u proljetnim i ljetnim mjesecima pa je visoka temperatura sobe onemogućavala efikasnije hlađenje diode).



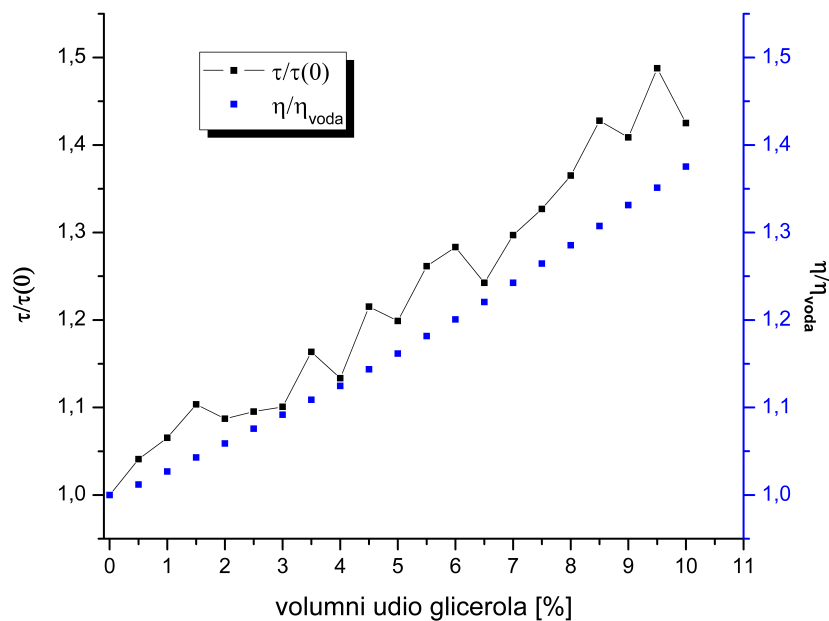
Slika 3.13: Mjerena autokorelacija Cy5. Na grafu je crvenom bojom prikazan fit na model dan izrazom 3.20, a plavom bojom model bez tripletne dinamike. Naznačene su i vrijednosti vremena difuzije i inverza prosječnog broja čestica.

Kao optimalna konfiguracija mjernog uređaja pokazala se ona sa strujom od 60 nA i temperaturom od 18 °C, pa je ista korištena u svim daljnjim mjerenjima u ovom radu. Jedno od brojnih mjerenja autokorelacije Cy5 pri takvoj konfiguraciji uređaja prikazano je grafom na slici 3.13. Na slici je prikazan i fit na teorijski model dan izrazom 3.20. Fitiranje, koje je u ovom radu provođeno u programu OriginPro, daje vrijednosti parametara u izrazu. Početne vrijednosti parametara iskustveno su postavljene na očekivane vrijednosti, osim ekscentriciteta konfokalnog volumena $K = z_0/\omega_0$ čija je vrijednost fiksirana na 4. Naime, fitanjem se ne mogu dobiti razumne vrijednosti tog parametra budući da je doprinos parametra obliku autokorelacijske krivulje iznimno malen. Također, K je snažno koreliran s ω_0 , što otežava precizno određivanje

¹⁶Fotoizbjeljivanje je gubitak sposobnosti fluoresciranja, može se reducirati npr. smanjivanjem intenziteta svjetlosti kojom se molekule pobuđuju.

oba parametra. Vrijednosti dvaju najvažnijih parametara, prosječnog broja čestica i difuzijskog vremena, naznačene su na slici 3.13. Difuzijsko vrijeme dobiveno kao rezultat fitanja iznosi $(77 \pm 6) \mu\text{s}$. Na slici je prikazan i model difuzije bez uključene tripletne dinamike, teorijski opisan izrazom 3.17, pa je vidljiv utjecaj tripletne dinamike na autokorelaciju.

Difuzijsko je vrijeme obrnuto proporcionalno difuzijskom koeficijentu, a prema izrazu 3.16 ovisi i o radijusu detekcijskog volumena pa se uređaj može kalibrirati određivanjem efektivnog (konfokalnog) volumena. Koristeći se difuzijskim vremenom dobivenim fitanjem i poznatom vrijednošću difuzijskog koeficijenta Cy5, $D_{\text{Cy5}} = 3.16 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$, pomoću izraza 3.16 dobiva se za radijus efektivnog volumena u lateralnom smjeru $\omega_0 = (0.31 \pm 0.01) \mu\text{m}$. Uz izraz 3.15, za efektivni se volumen dobiva $V_{\text{ef}} = (0.66 \pm 0.06) \text{ fL}$. Iako je taj rezultat blizu očekivanom ($\sim 1 \text{ fL}$), ovakva metoda određivanja konfokalnog volumena ima svoje nedostatke. Prvo, ona ovisi o odabranome modelu, odnosno teorijskom izrazu koji koristimo pri fitanju. Drugo, kao što je već rečeno, ekscentricitet konfokalnog volumena ne može se precizno odrediti.



Slika 3.14: Ovisnost difuzijskog vremena DNK60 o koncentraciji glicerola u vodenj otopini. Na istom su grafu prikazane i viskoznosti smjese glicerola i vode za pojedine koncentracije glicerola.

Nakon mjerenja autokorelacije samog Cy5, provedena su mjerenja i s uzorcima obojene DNK. Dobivena difuzijska vremena za DNK60, odnosno DNK15 su $(367 \pm 6) \mu\text{s}$ i $(174 \pm 2) \mu\text{s}$, respektivno. Difuzijski koeficijent molekula se, uvažavanjem gore opisane kalibracije, računa kao [32]:

$$D = D_{\text{Cy5}} \frac{\tau_{\text{Cy5}}}{\tau_{\text{DNK}}}. \quad (3.21)$$

gdje je τ_{Cy5} dobiveno difuzijsko vrijeme Cy5, a τ_{DNK} difuzijsko vrijeme DNK molekule. Za dvije DNK molekule dobiva se: $D_{\text{DNK60}} = (0.69 \pm 0.06) \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ i $D_{\text{DNK15}} = (1.4 \pm 0.1) \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$. Translacijski difuzijski koeficijent za cilindričnu makromolekulu dan je kao [33]:

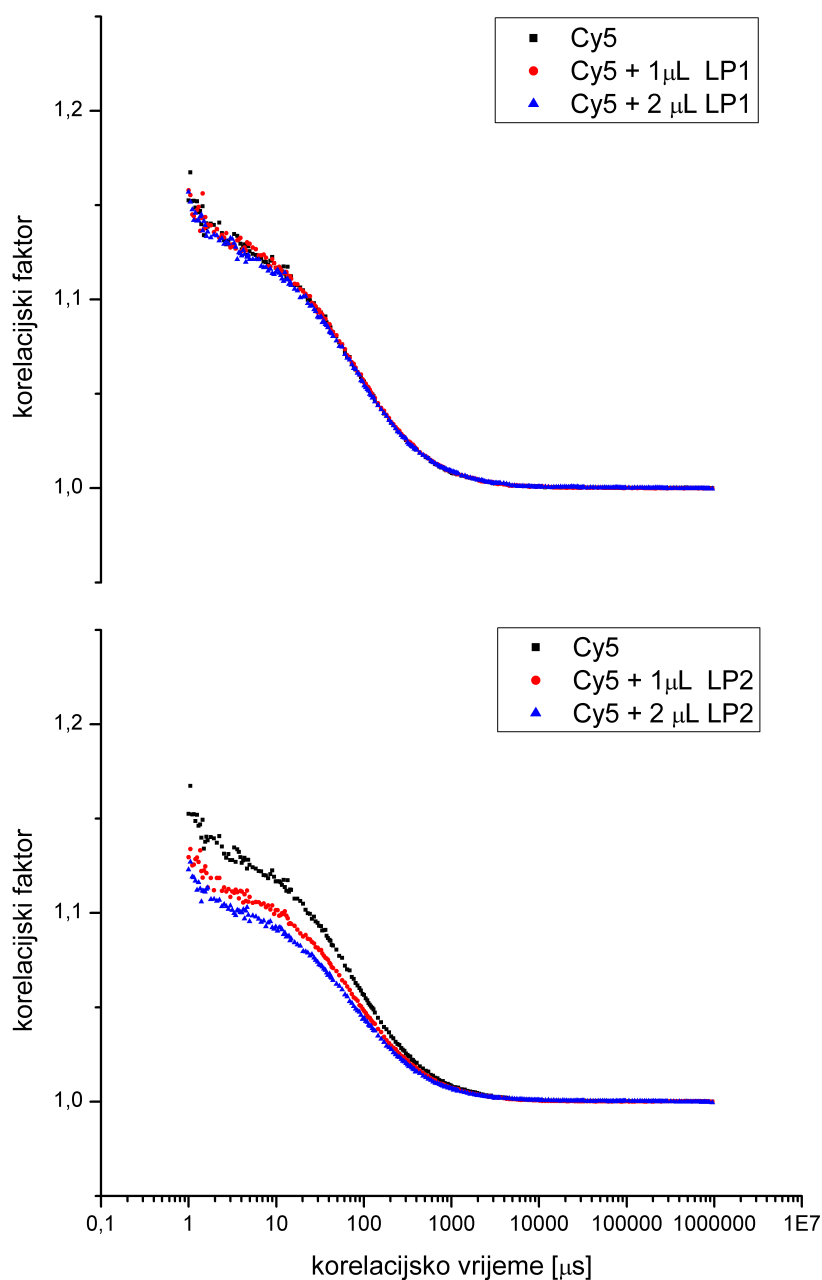
$$D^{\text{th}} = \frac{kT}{3\pi\eta} \frac{\ln(L_c/d) + 0.312}{L_c}. \quad (3.22)$$

gdje je $L_c = Nb$ duljina cilindrične molekule, d promjer, a $\eta = 8.9 \times 10^{-4} \text{ Pas}$ viskoznost vode ($T = 298.15 \text{ K}$). Uz duljinu perioda DNK $b = 0.34 \text{ nm}$ i $d = 2.6 \text{ nm}$, difuzijski koeficijent za DNK60 je $D_{\text{DNK60}}^{\text{th}} = 0.57 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$, a za DNK15 $D_{\text{DNK15}}^{\text{th}} = 0.94 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$. Eksperimentalno dobivene vrijednosti difuzijskih koeficijenata ne odudaraju znatno od vrijednosti izračunatih koristeći se modelom 3.22, koji pretpostavlja da se DNK molekule sa 60 ili 15 parova baza mogu tretirati kao izdužene, cilindrične konfiguracije.

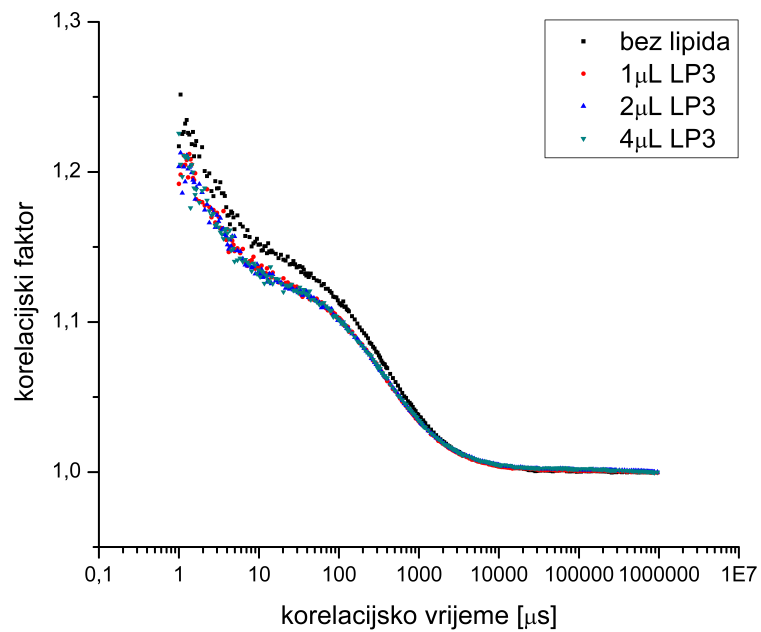
Kao dodatno testiranje mjernog uređaja proučavana je promjena difuzijskog vremena DNK u otopinama različitih viskoznosti i mjerenjem autokorelacija. Budući da je difuzijsko vrijeme obrnuto proporcionalno difuzijskom koeficijentu, a difuzijski koeficijent prema izrazu 3.22 obrnuto proporcionalan viskoznosti okolnog medija, očekivan je porast difuzijskog vremena s porastom viskoznosti. U svrhu mjerenja, korištena je 10 % otopina glicerola koja je nadalje razrjeđivana vodom. U otopine različite koncentracije glicerola dodavana je fluorescentno označena DNK60. Ovisnost dobivenog vremena difuzije DNK60 o koncentraciji glicerola u vodenoj otopini prikazana je na slici 3.14. Vidljivo je povećanje vremena difuzije s porastom koncentracije glicerola. Na istom grafu prikazane su i viskoznosti smjese glicerola i vode za različite koncentracije glicerola. [34]

4 Rezultati i diskusija

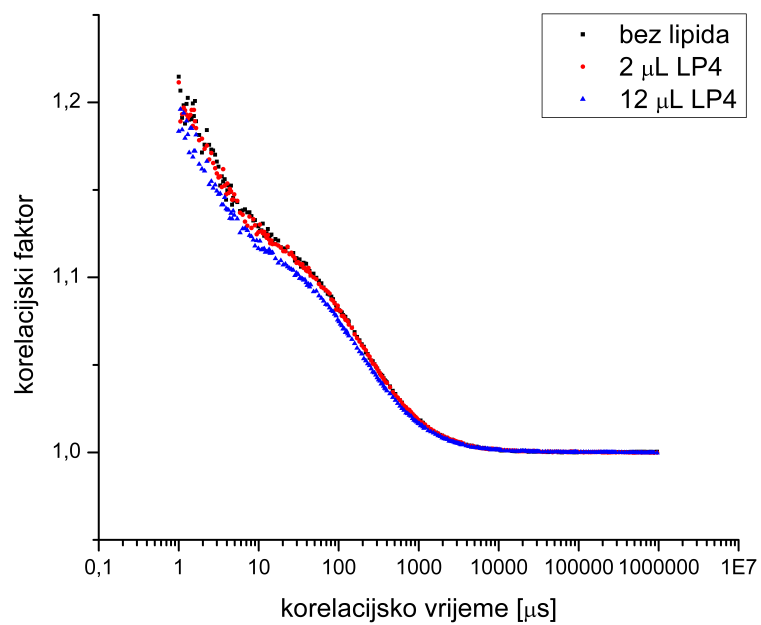
Nakon kalibracije koja je opisana u prethodnome poglavlju, mjerni uređaj korišten je za proučavanje difuzije u otopinama u koje su dodavani različiti liposomski uzorci. Kao testni primjer, provedeno je mjerenje autokorelacije Cy5 razrijeđenog u 10 mM Tris puferu. U 300 μL otopine u kojoj je koncentracija Cy5 20 μM dodavani su negativni (LP1) i pozitivni (LP2) liposomski uzorci. Budući da Cy5 nije nabijena molekula, očekivano je da se difuzijsko vrijeme neće promijeniti. Rezultati mjerenja prikazani su na slici 4.15.



Slika 4.15: Gore: Mjerene autokorelacije Cy5 bez liposoma i s dodanim negativnim liposomima LP1. Dolje: Mjerene autokorelacije Cy5 bez liposoma i s dodanim pozitivnim liposomima LP2.

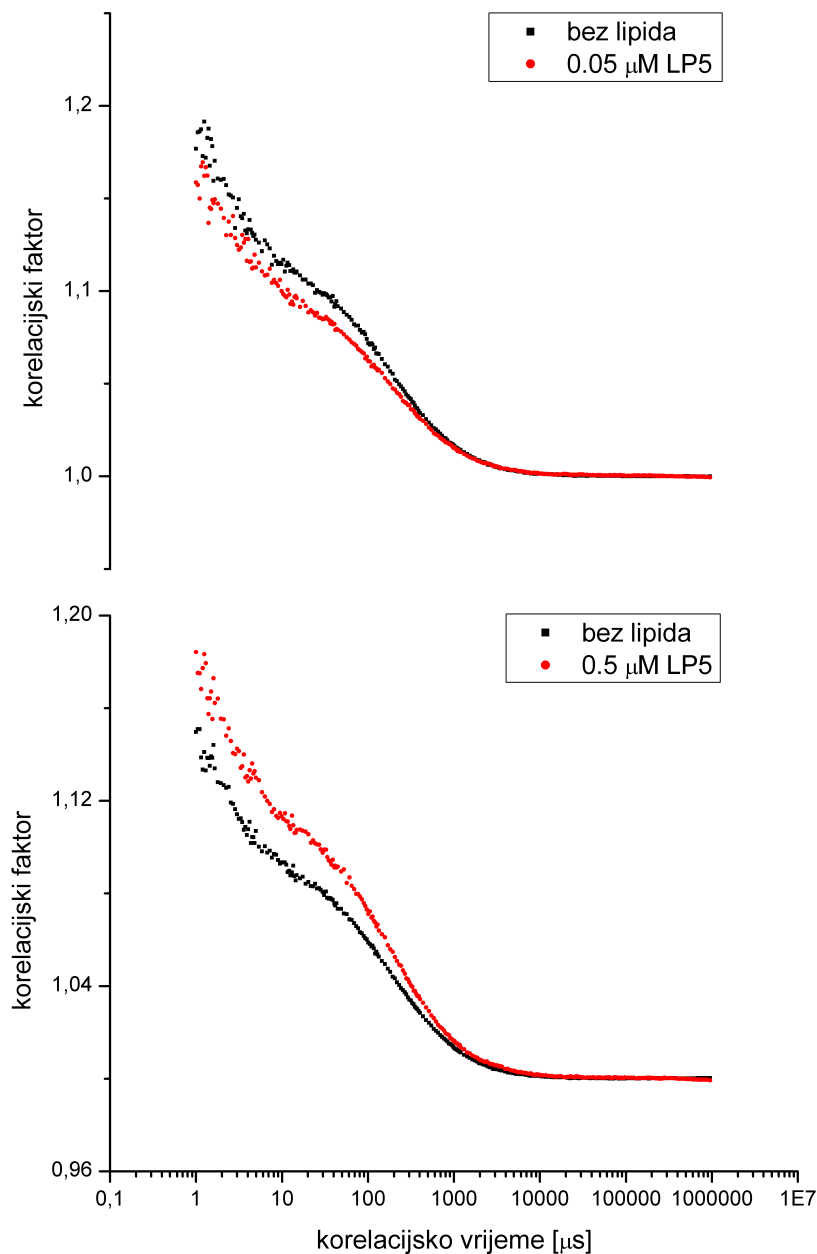


Slika 4.16: Mjerene autokorelacije DNK60 bez liposoma i s dodanim liposomima s ugrađenim spojem LP3.



Slika 4.17: Mjerene autokorelacije DNK15 bez liposoma i s dodanim liposomima s ugrađenim spojem LP4.

Vidljivo je na grafovima sa slike 4.15 da nema značajne promjene u difuziji Cy5 dodavanjem liposoma u otopinu, bilo da se radi o negativnim (gornji graf) ili pozitivnim (donji graf) liposomima. Dobivena difuzijska vremena Cy5 bez liposoma i s dodanim liposomima poklapaju se do na pogrešku mjerenja.

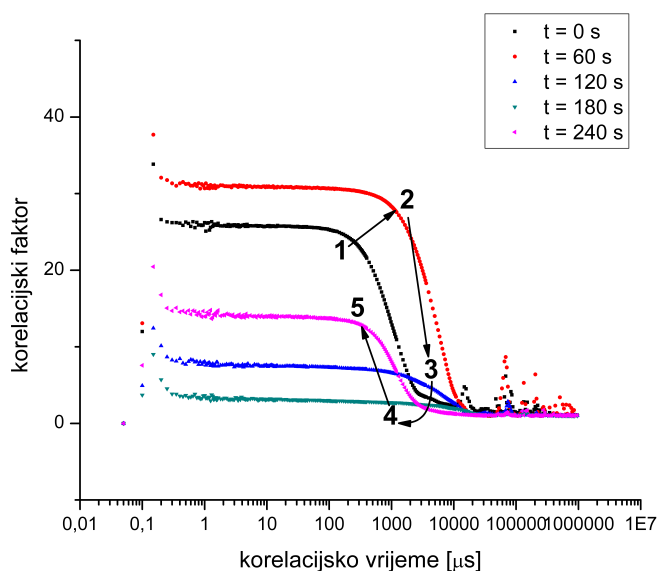


Slika 4.18: Gore: Mjerene autokorelacije DNK15 bez liposoma i s dodanim 0.05 mM pozitivnim liposomima LP5. Dolje: Mjerene autokorelacije DNK15 bez liposoma i s dodanim 0.5 mM pozitivnim liposomima LP5.

Slično je mjerenje provedeno i za DNK60. Otopina obojene DNK razrijeđena je 300 puta u 10 mM Tris puferu, a zatim su u pufer sukcesivno dodavani liposomi LP3. Ovi liposomi, kao što je već rečeno, sadrže ugrađeni spoj 7 pa je očekivani rezultat interakcija liposoma s DNK molekulom prikazana na slici 3.11 koja bi utjecala na difuziju i mijenjala dobivene vrijednosti difuzijskog vremena. Rezultati provedenog

mjerenja prikazani su na slici 4.16. Vidljivo je da dodavanje liposoma u puferku otopinu DNK nije utjecalo na difuziju DNK; vrijednosti difuzijskih vremena DNK bez liposoma i uz dodane liposome poklapaju se do na pogrešku mjerenja. Jedan od mogućih razloga ne opažanja kompleksacije u ovom slučaju može biti nedovoljna efikasnost ugrađivanja spoja 7 u liposomske aggregate. Iako je u otopini prisutan znatan višak pozitivnog naboja koji nosi spoj 7 (tablica 4.1), mala količina spoja izložena je na samoj površini liposoma.

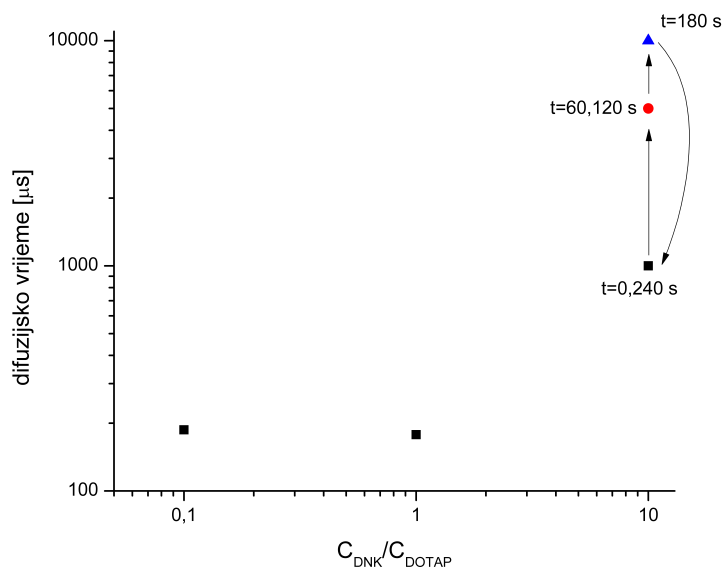
Mjerenje autokorelacije uz dodavanje liposomskih uzoraka s ugrađenim spojem 7 provedeno je i za DNK molekulu sa 15 parova baza. Molekula je razrijeđena 300 puta u 1 mM puferu, a zatim su u otopinu sukcesivno dodavani liposomi LP4. Rezultati tog mjerenja prikazani su na slici 4.17. Ni u ovom slučaju nije opažena promjena u difuzijskom vremenu dodavanjem liposoma u otopinu.



Slika 4.19: Mjerene autokorelacije DNK15 s dodatim 5 mM liposomima LP5. Prikazano je 5 uzastopnih mjerenja, svako s integracijskim vremenom od 1 minute.

Interakcija DNK molekule s pozitivno nabijenim liposomima proučavana je mjerenjem autokorelacije DNK15 u 1 mM puferskoj otopini u koju su dodavani liposomi LP5. Rezultati mjerenja prikazani su na slikama 4.18 i 4.19. Za 5 mM i 10 mM koncentracije dodanih LP5 u puferskoj otopini, kompleksacija liposoma s DNK nije opažena. Kao što je vidljivo i na slici 4.18, nema promjena u difuzijskom vremenu nakon dodavanja liposoma u otopinu. Međutim, kompleksacija se opaža za 5 mM koncentraciju dodanih liposoma. Na slici 4.19 mjereno je pet uzastopnih autokorelacija DNK s 5 mM LP5, svako mjerenje u trajanju od 1 minute. Na slici je označen redoslijed snimljenih krivulja, pa se može pratiti dinamika same kompleksacije. Na slici se uočavaju promjene u difuzijskom vremenu, koje je za svaku od krivulja znatno veće nego za DNK bez liposoma. To daje naslutiti da je u ovom slučaju došlo do formacije lipopleksa kako je to opisano prethodno u tekstu i shematski prikazano na

slici 2.6. Međutim, dobiveni kompleksi očito nisu stabilni budući da se difuzijsko vrijeme mijenja u vremenu i nije se ustalilo na nekoj vrijednosti. Daljnjim mjerenjem utvrđeno je da promjene u difuzijskom vremenu nakon nekog vremena nestaju. To znači da bi DNK neko vrijeme bila vezana na liposom, a onda bi liposomi agregirali i precipitirali ili na neki drugi način "sakrili" vezanu DNK i ponovno bi se detektirala samo nevezana DNK. U svakom slučaju promjene u difuzijskom vremenu upućuju na pojavu kompleksacije DNK i liposoma.



Slika 4.20: Ovisnost difuzijskog vremena DNK15 o omjeru koncentracija DNK i DOTAP-a.

Uzorak	Omjer neg./poz. naboj	Promjena u difuziji
DNK60 + LP3	1 : 1000	NE
	1 : 2000	NE
	1 : 4000	NE
DNK15 + LP4	1 : 7000	NE
	1 : 42000	NE
DNK15 + LP5	10 : 1	NE
	1 : 1	NE
	1 : 10	DA

Tablica 4.1: Sumirani rezultati mjerenja autokorelacija DNK s liposomima. Za svaki uzorak prikazan je omjer pozitivnog i negativnog naboja i naznačeno je opažanje/neopažanje promjena u difuziji.

Ovisnost dobivenih difuzijskih vremena DNK15 o omjeru DNK i kationskog lipida DOTAP-a prikazana je na slici 4.20 i ta slika sumira rezultate mjerenja autokorelacija

DNK15 s liposomima LP5. DOTAP je kationski lipid ugrađen u LP5 kao što je opisano u tablici 3.10. Na obje osi grafa korištene su logaritamske skale. Vidljivo je da je difuzijsko vrijeme za omjere koncentracija 0.1 i 1 jednako difuzijskom vremenu DNK15 bez dodanih liposoma. Za omjer koncentracija 10, pri kojem očito dolazi do kompleksacije, uočavaju se promjene u difuzijskom vremenu kao što je gore već rečeno.

Sumirani rezultati mjerenja autokorelacija DNK uzoraka s dodanim liposomima prikazani su u tablici 4.1. Navedeni su korišteni uzorci, a za svaki uzorak izračunati su omjeri pozitivnog i negativnog naboja prema koncentracijama spojeva korištenih u mjerenjima. Za svaki omjer naznačeno je opažanje, odnosno neopažanje promjena u difuziji i kompleksacije koja je promjene uzrokovala. Promjene u difuzijskom mjerenju i stvaranje kompleksa lipida i DNK uočeno je samo u mjerenju autokorelacije DNK15 s dodanim 5 mM LP5; u tom je slučaju omjer pozitivnog i negativnog naboja 10 : 1. Kao što je već rečeno, u tom slučaju dolazi do formacije lipopleksa. Za manje koncentracije LP5 kompleksacija nije uočena, iako je očekivana uzimajući u obzir dosadašnja saznanja i rezultate provedenih mjerenja. Interakcije DNK i liposoma s ugrađenim spojem 7, iako očekivane, nisu uočene ni za DNK 15 ni za DNK60.

5 Zaključak

Genska terapija obuhvaća različite strategije liječenja bolesti na razini genskog uzroka unošenjem gena u stanicu. Virusni prijenosnici DNK molekule generiraju imunu reakciju pacijenta, stoga se intenzivno proučavaju različite ne-viralne strategije prijenosa gena. Jedna od njih obuhvaća korištenje kompleksa liposomskih agregata s DNK. Upotreba takvih kompleksa još uvijek je ograničena zbog toksičnosti korištenih lipida, stoga se znatan trud ulaže u podizanje njihove efikasnosti transfekcije i smanjenja njihove toksičnosti. U tu se svrhu proučava i razumijeva veza između strukture, kompozicije i funkcije kompleksa.

U ovom radu, kompleksi lipida i DNK proučavani su metodom fluorescencijske korelacijske spektroskopije. Ta metoda, bazirana na korelacijskoj analizi fluktuacija fluorescencijskog intenziteta, daje informacije vezane za difuziju fluorescentno obilježenih molekulskih vrsta. Kombiniranje ove metode s različitim drugim eksperimentalnim tehnikama daje uvid u ponašanje biološki važnih molekula u okruženju kakvo postoji u živom organizmu. U svrhu mjerenja, na Institutu za fiziku postavljen je FCS uređaj. Uređaj je kalibriran koristeći se fluorescentnom bojom Cy5 koja se koristi kao standardna kontrola za analizu difuzija FCS-om. Pomoću poznatih podataka za Cy5, određen je konfokalni volumen, a dobivena vrijednost je u skladu s očekivanjem.

Nakon kalibracije uređaja, određeni su difuzijski koeficijenti DNK15 i DNK60 molekula. Isti su koeficijenti izračunati pomoću teorijskog modela difuzije DNK molekula. Eksperimentalno dobiveni rezultati vrlo su blizu teorijski izračunatim vrijednostima. Kao dodatna provjera reproducibilnosti mjernog uređaja, mjerena su vremena difuzije DNK molekule u ovisnosti o viskoznosti okolnog medija. Očekivan je porast vremena difuzije s porastom viskoznosti, a to je i pokazano dobivenim rezultatima.

Proučavanje samih kompleksa DNK s lipidima obuhvaćalo je različita mjerenja autokorelacija fluorescentno označenih DNK molekula u otopinama u koje su dodavani liposomski uzorci. Liposomski uzorci sintetizirani su na Imunološkom zavodu i obuhvaćali su negativno nabijene liposome, liposome s ugrađenim adamantan-aminogvanidinom i pozitivno nabijene liposome. Pozitivno nabijeni liposomi s DNK molekulom tvore pozitivno nabijene komplekse, tzv. lipoplekse, koji dolaze u nekoliko različito uređenih faza. Interakcija DNK i liposoma s ugrađenim spojem temelji se na elektrostatskom privlačenju pozitivno nabijenih gvanidinskih grupa ugrađenih u liposome i negativno nabijenih fosfatnih grupa DNK molekule.

Promjene u difuzijskom vremenu uzrokovane kompleksacijom DNK s liposomima uočene su jedino pri miješanju DNK15 s pozitivno nabijenim liposomskim uzorcima i to pri omjeru koncentracija pozitivnog i negativnog naboja 10 : 1, a to je rezultat koji bi se očekivao i pri koncentracijama pozitivnog naboja koje su za red veličine manje. Dobiveni lipopleksi ipak nisu ostajali stabilni i nakon nekog bi se vremena detektirala samo nevezana DNK. Kompleksacija DNK i liposoma s ugrađenim gvanidin-

skim grupama nije opažena. Mogući razlog leži u nedovoljnoj efikasnosti ugrađivanja adamantan-aminogvanidina u liposomske aggregate.

Daljnje proučavanje kompleksa FCS-om obuhvaćalo bi detaljnije promatranje kompleksacije pozitivno nabijenih liposoma s različitim DNK molekulama u svrhu dobivanja stabilnih kompleksa za koje se difuzijska vremena ne bi mijenjala u vremenu. Promatranja kompleksa DNK i liposoma s ugrađenim gvanidinom zahtijevala bi veće efikasnosti ugrađivanja spoja u liposome, iako se ni u tom slučaju ne očekuju jaki i dobro definirani signali, ali bi se promjena u difuziji mogla barem kvalitativno promatrati. Jedna od ideja indirektnog praćenja promjena u difuziji uključivala bi miješanje takvih liposoma s dugačkim DNK molekulama kojima je pridodana mala fluorescentno obilježena DNK.

U svakom slučaju, sastavljeni mjerni uređaj daje reproducibilne rezultate i sposoban je uočiti pojavu kompleksa lipida i DNK i dati barem kvalitativno razumijevanje promjena u difuzijskim vremenima. Budući da je metoda korelacijske spektroskopije iznimno korisno oruđe u promatranju različitih biomolekula, daljnja bi eksperimentiranja trebala biti u vidu usavršavanja metode i korištenja iste za proučavanje difuzijskih svojstava različitih sustava. Proučavanje kompleksa lipida i DNK ostaje bitan korak u unapređivanju genske terapije, a samim time i budućih medicinskih primjena u borbi protiv tumora, nasljednih bolesti i različitih drugih poremećaja.

Literatura

- [1] Harries, D. Electrostatic Interaction Between Macromolecules and Mixed Lipid Membranes. Doctoral Thesis. Jerusalem : Hebrew University, 2001.
- [2] Edelstein, M. L.; Abedi, M. R.; Wixon, J. Gene Therapy clinical trials worldwide to 2007 - an update. // The Journal of Gene Medicine. Vol. 9, 2007., str. 833-842.
- [3] The Journal of Gene Medicine Clinical Trial site, <http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical>, 10.11.2015.
- [4] Gelbart, W. M.; Bruinsma, R. F.; Pincus, P. A.; Parsegian, V. A. DNA-Inspired Electrostatics. // Physics Today. 53(9), 2000., str. 38-44.
- [5] Gronbech-Jensen, N.; Mashl, R. J.; Bruinsma, R. F.; Gelbart, W. M. Counterion-Induced Attraction between Rigid Polyelectrolytes. // Physical Review Letters. Vol. 78, Iss. 12, 1997., 2477.
- [6] Ha, B.-Y.; Liu, A. J. Counterion-Mediated Attraction between Two Like-Charged Rods. // Physical Review Letters. Vol. 79, Iss. 7, 1997., 1289.
- [7] Rouzina, I.; Bloomfield, V. A. Macroion Attraction Due to Electrostatic Correlation between Screening Counterions. 1. Mobile Surface-Adsorbed Ions and Diffuse Ion Cloud. // J. Phys. Chem. Vol. 100(23), 1996., str. 9977-9989.
- [8] Bangham, A. D.; Horne, R. W. Physical Studies of Phospholipids. // J. Mol. Biol. Vol. 8, Iss. 5, 1964., str. 660-668.
- [9] Balazs, D. A.; Goodbey, W. Liposomes for use in gene delivery. // J Drug Deliv. 2011.
- [10] Shimomura, M.; Sawadaishi, T. Bottom-up strategy of materials fabrication: A new trend in nanotechnology of soft materials. // Current Opinion in Colloid & Interface Science. Vol. 6, 2001., str. 6-11.
- [11] Wasungu, L.; Hoekstra, D. Cationic lipids, lipoplexes and intracellular delivery of genes. // J Control Release. Vol. 116, 2006., str. 255-264.
- [12] Elouahabi, A.; Ruysschaert, J. M. Formation and intracellular trafficking of lipoplexes and polyplexes. // Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy. Vol. 11, 2005., str. 336-347.
- [13] Pires, P.; Simoes, S.; Nir, S.; Gaspar, R.; Duzgunes, N.; Pedroso de Lima, M. C. Interaction of cationic liposomes and their DNA complexes with monocytic leukemia cells. // Biochimica Et Biophysica Acta. 1418(1), 1999., str. 71-84.

- [14] May, S.; Ben-Shaul, A. Modeling of cationic lipid-DNA complexes. // *Curr Med Chem.* 11(2), 2004., str. 151-167.
- [15] Dass, C.R. Vehicles for oligonucleotide delivery to tumors. // *J Pharm Pharmacol.* 54(1), 2002., str. 3-27.
- [16] Langner, M. The intracellular fate of non-viral DNA carriers. // *Cell. Mol. Biol. Lett.* Vol. 5, 2000., str. 295.
- [17] Dias, R.; Antunes, F.; Miguel, M.; Lindman, S.; Lindman, B. DNA-lipid systems. A physical chemistry study. // *Braz J Med Biol Res.* Vol. 35(5), 2002., str. 509-522.
- [18] Gustafsson, J.; Arvidson, G.; Karlsson, G.; Almgren, M. Complexes between cationic liposomes and DNA visualized by cryo-TEM. // *Biochim Biophys Acta.* 1235(2), 1995., str. 305-312.
- [19] Tarahovsky, Y. S.; Khusainova, R. S.; Gorelov, A. V.; Nicolaeva, T. I.; Deev, A. A.; Dawson, A. K.; Ivanitsky, G. R. DNA initiates polymorphic structural transitions in lecithin. // *FEBS Lett.* Vol. 390, 1996., str. 133-136.
- [20] Sternberg, B.; Sorgi, F. L.; Huang, L. New structures in complex formation between DNA and cationic liposomes visualized by freeze-fracture electron microscopy. // *FEBS Lett.* Vol. 356(2-3), 1994., str. 361-366.
- [21] Ewert, K. K.; Zidovska, A.; Ahmad, A.; Boussein, N. F.; Evans, H. M.; McAllister, C. S.; Samuel, C. E.; Safinya, C. R. Cationic Lipid-Nucleic Acid Complexes for Gene Delivery and Silencing: Pathways and Mechanisms for Plasmid DNA and siRNA. // *Top Curr Chem.* Vol. 296, 2010., str. 191-226.
- [22] Kral, T.; Langner, M.; Hof, M. DNA-Spermine and DNA-Lipid Aggregate Formation Visualized by Fluorescence Correlation Spectroscopy. // *Chemotherapy.* Vol. 52, 2006., str. 196-199.
- [23] Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy.* 3rd ed. Baltimore : Springer, 2006.
- [24] Chroma Technology Corp, Chroma Spectra Viewer, <https://www.chroma.com/spectra-viewer>, 30.9.2015.
- [25] Schwille, P.; Haustein, E. *Fluorescence Correlation Spectroscopy : An Introduction to its Concepts and Applications.* Göttingen : 2004.
- [26] Thompson, N. L. *Topics in Fluorescence Spectroscopy, Volume 1: Techniques.* New York : Plenum Press, 1991.

- [27] Šoštar, M. Fluorescencijska korelacijska spektroskopija. Diplomski rad. Zagreb : Prirodoslovno-matematički fakultet, 2012.
- [28] Chen, Y.; Müller, J. D.; So, P. T. C.; Gratton, E. The Photon Counting Histogram in Fluorescence Fluctuation Spectroscopy. // Biophysical Journal. Vol. 77, 1999. str. 553-567.
- [29] FCSXpert Solutions, The Confocal Principle, <http://www.fcsxpert.com/classroom/theory/what-is-confocal-volume.html>, 25.11.2015.
- [30] Šekutor, M.; Mlinarić-Majerski, K. Bioaktivne molekule - policiklički derivati gvanidina. // Kem. Ind. Vol. 64(3-4), 2015., str. 125-141.
- [31] Šekutor, M.; Štimac, A.; Mlinarić-Majerski, K.; Frkanec, R. Syntheses and characterization of liposome-incorporated adamantyl aminoguanidines. // Org. Biomol. Chem. Vol. 12, 2014., str. 6005-6013.
- [32] Salamon, K.; Aumiller, D.; Pabst, G.; Vuletić, T. Probing the Mesh Formed by the Semirigid Polyelectrolytes. // Macromolecules. Vol. 46, 2013., str. 1107-1118.
- [33] Tirado, M. M.; Martinez, C. L.; de la Torre, J. G. Comparison of theories for the translational and rotational diffusion coefficients of rod-like macromolecules. Application to short DNA fragments. // J. Chem. Phys. Vol. 81, 1984., str. 2047.
- [34] Lide, D. R., ed. CRC Handbook of Chemistry and Physics, Internet version 2006, <http://www.hbcpnetbase.com> 86th ed. Boca Raton, FL : Taylor and Francis, 2006.