



UNIwersytet
PRZYRODNICZY
WE WROCLAWIU

AUTOREFERAT

Informacje o osiągnięciu naukowym i dorobku naukowo-badawczym

Załącznik 2a

Tytuł osiągnięcia naukowego:

„Nowatorskie wykorzystanie metod fluorescencji pojedynczych cząsteczek w badaniach procesu kondensacji plazmidowego DNA”

Dr Teresa Kral
Katedra Fizyki i Biofizyki

AUTOREFERAT

1. Imię i nazwisko: **Teresa Kral**
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe z podaniem nazwy miejsca i roku ich uzyskania oraz tytuł rozprawy doktorskiej.

Doktor nauk biologicznych, dyscyplina: biofizyka (1999) Wydział Biologii i Nauk Ziemi, Uniwersytet Łódzki, Tytuł rozprawy doktorskiej: „*Wpływ kationowych i anionowych związków amfifilowych oraz ich mieszanin na proces desorpcji wapnia z błon lipidowych*”. Promotor: Prof. dr hab. Bożenna Różycka-Roszak, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu (ówczesna Akademia Rolnicza). Recenzenci: Prof. Dr hab. Zofia Szweda-Lewandowska, Uniwersytet Łódzki oraz Prof. dr hab. Marian Podolak, Uniwersytet Opolski.

Magister fizyki, dyscyplina: fizyka jądrowa (1990) Wydział Matematyczno-Fizyczny, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin. Tytuł pracy magisterskiej: „*Skład izotopowy wodoru i tlenu w wodzie krystalizacyjnej gipsu*”. Promotor: Prof. dr hab. Stanisław Hałas.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.

1999 – obecnie, adiunkt w Katedrze Fizyki i Biofizyki Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu,

1990-1999, asystent w Katedrze Fizyki i Biofizyki Akademii Rolniczej (obecnie Uniwersytet Przyrodniczy) we Wrocławiu,

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art.16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

4a. Tytuł osiągnięcia naukowego. Osiągnięcie naukowe zostało udokumentowane w formie jednotematycznego cyklu publikacji pod wspólnym tytułem:

„Nowatorskie wykorzystanie metod fluorescencji pojedynczych cząsteczek w badaniach procesu kondensacji plazmidowego DNA”

4b. Publikacje wchodzące w skład zgłaszanego osiągnięcia naukowego.

Na osiągnięcie naukowe składa się **10 publikacji** w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR).

- H1.** **Teresa Kral**, Marek Langner, Martin Beneš, Dagmara Baczyńska, Maciej Ugorski, Martin Hof, (2002) The application of fluorescence correlation spectroscopy in detecting DNA condensation. *Biophysical Chemistry*, 95, 135-144. (IF: 1.494, p.MNiSW 20)
- H2.** **Teresa Kral**, Martin Hof, Marek Langner, (2002) Effect of spermine on the plasmid condensation and dye release observed by fluorescence correlation spectroscopy. *Biological Chemistry*, Vol. 383, 331-335. (IF: 2.548, p.MNiSW 20)
- H3.** **Teresa Kral**, Martin Hof, Piotr Jurkiewicz and Marek Langner, (2002) Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS) as a tool to study DNA condensation with hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB). *Cellular & Molecular Biology Letters*, vol.7, 203-211. (IF: 0.651, p.MNiSW 10)
- H4.** **Teresa Kral**, Katarzyna Widerak, Marek Langner; Martin Hof (2005) Propidium iodide and PicoGreen as dyes for the DNA fluorescence correlation spectroscopy measurements. *Journal of Fluorescence*, vol. 15, 2, 179-183. (IF: 2.038, p.MNiSW 20)
- H5.** **Teresa Kral**, Marek Langner, Martin Hof, (2006) DNA-spermine and DNA-lipid aggregate formation visualized by Fluorescence Correlation Spectroscopy, *Chemotherapy*, 52 (4): 196-199. (IF: 1.511, p.MNiSW 15)
- H6.** Jana Humpolíčková,; Aleš Benda; Jan Sýkora; Radek Macháň; **Teresa Kral**; Barbara Gasinska; Joerg Enderlain; Martin Hof (2008) Equilibrium dynamics of spermine-induced plasmid DNA condensation revealed by fluorescence lifetime correlation spectroscopy. *Biophysical Journal*, 94, 3, L17-L19. (IF: 4.683, p.MNiSW 24)
- H7.** **Teresa Kral**; Jeanne Leblond; Martin Hof; Daniel Scherman; Jean Herscovici; Nathalie Mignet, (2010) Lipopolythiourea/DNA interaction: a biophysical study. *Biophysical Chemistry* 2010; 148(1-3): 68-73. (IF: 2.108, p.MNiSW 27)
- H8.** Gaëlle Pembouong, Nelly Morellet, **Teresa Kral**, Martin Hof, Daniel Scherman, Michel-Francis Bureau, Nathalie Mignet, (2011) A comprehensive study in triblock copolymer membrane interaction, *Journal of Controlled Release*, 151, 1, 10, 57-64. (IF: 6.499, p.MNiSW 45)
- H9.** Marie Breton, Jean-François Berret, Claudie Bourgaux, **Teresa Kral**, Martin Hof, Chantal Pichon, Michel Bessodes, Daniel Scherman, and Nathalie Mignet (2011) Protonation of Lipids Impacts the Supramolecular and Biological Properties of Their Self-Assembly., *Langmuir*, 27 (20), 12336-12345 (IF: 4.186, p.MNiSW 35)
- H10.** Paweł Misiak, Kazimiera A. Wilk, **Teresa Kral**, Edyta Woźniak, Hanna Pruchnik, Renata Frackowiak, Martin Hof, Bożenna Różycka-Roszak (2013) New gluconamide-type cationic surfactants: Interactions with DNA and lipid membranes, *Biophysical Chemistry* 180–181, 44–54. (IF: 2.319, p.MNiSW 20)

Podsumowanie bibliometryczne dla publikacji stanowiących osiągnięcie:

Sumaryczny Impact Factor (według roku publikacji) wynosi $\sum IF_{H1-H10} = 28.037$

Sumaryczna liczba punktów MNiSW z roku wydania wynosi $\sum p.MNiSW_{H1-H10} = 236$

Sumaryczna liczba cytowań wg Web of Sciences wynosi $\sum WoS_{H1-H10} = 148$ (na dzień 15.05.2018)

Kopie publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego znajdują się w Załączniku 5, a oświadczenia współautorów tych publikacji zawarte są w Załączniku 4.

4c. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Problem kondensacji DNA skupia wiele uwagi i jest konsekwentnie badany przez ponad czterdzieści ostatnich lat (Zinchenko, 2016; Yoo & Aksimentiev, 2016). Zgromadzona wiedza na temat procesu kondensacji DNA (używa się też terminów: „fałdowanie DNA” lub „upakowanie DNA” w przypadku pojedynczej cząsteczki) w warunkach podobnych do tych w żywej komórce, może być i jest częściowo wykorzystywana do projektowania i konstruowania funkcjonalnych „sztucznych komórek” mających potencjalne zastosowanie w systemach terapii genowej. W tym wyraźnie innym w porównaniu z żywą komórką, choć powiązanym podejściu, proces kondensacji/upakowania DNA jest wykorzystywany w celu opracowania skutecznych systemów dostarczania genów. Eksperymentalne modelowanie takiego złożonego systemu biologicznego jest trudne, ale ważne jest zrozumienie czasoprzestrzennej dynamiki cząsteczki DNA. Ze względu na znaczenie procesu kondensacji/upakowania DNA liczne badania dążą do wyjaśnienia morfologii skondensowanego DNA, dynamiki samego procesu oraz wpływu czynników regulacyjnych (Teif & Bohinc, 2011; Ran & Jia, 2015). Substancje kondensujące oraz ich kombinacje, będąc mediatorami transfekcji, powinny reagować na niekorzystne i nietrwałe warunki środowiskowe w obrębie komórki (Jorge, Nunes, Cova, & Pais, 2016; Yoo & Aksimentiev, 2016). Klasyczne techniki makroskopowe stosowane w badaniach upakowania DNA zazwyczaj polegają na eksperymentach z układami molekularnymi, które dają średnią ze wszystkich możliwych konformacji cząsteczkowych. W przeciwieństwie do metod klasycznych, techniki na poziomie pojedynczej cząsteczki (*single molecule techniques*, SMTs), takie jak: atomic-force microscopy (AFM), laser optical tweezers (LOTs), magnetic tweezers (MTs), biomembrane force probes (BFPs), fluorescence resonance energy transfer (FRET) oraz fluorescencja pojedynczej cząsteczki (*single-molecule fluorescence*, SMF), umożliwiają obserwację pojedynczych cząsteczek w ich indywidualnej konformacji (Xin et al., 2017; Cheng, Jia, & Ran, 2015; Rudiuk, Yoshikawa, & Baigl, 2011; Husale, Grange, Karle, Burgi, & Hegner, 2008; Anselmetti, Fritz, Smith, & Fernandez-Busquets, 2000; Ritort, 2006; Grunwell et al., 2001; Whitley, Comstock, & Chemla, 2017).

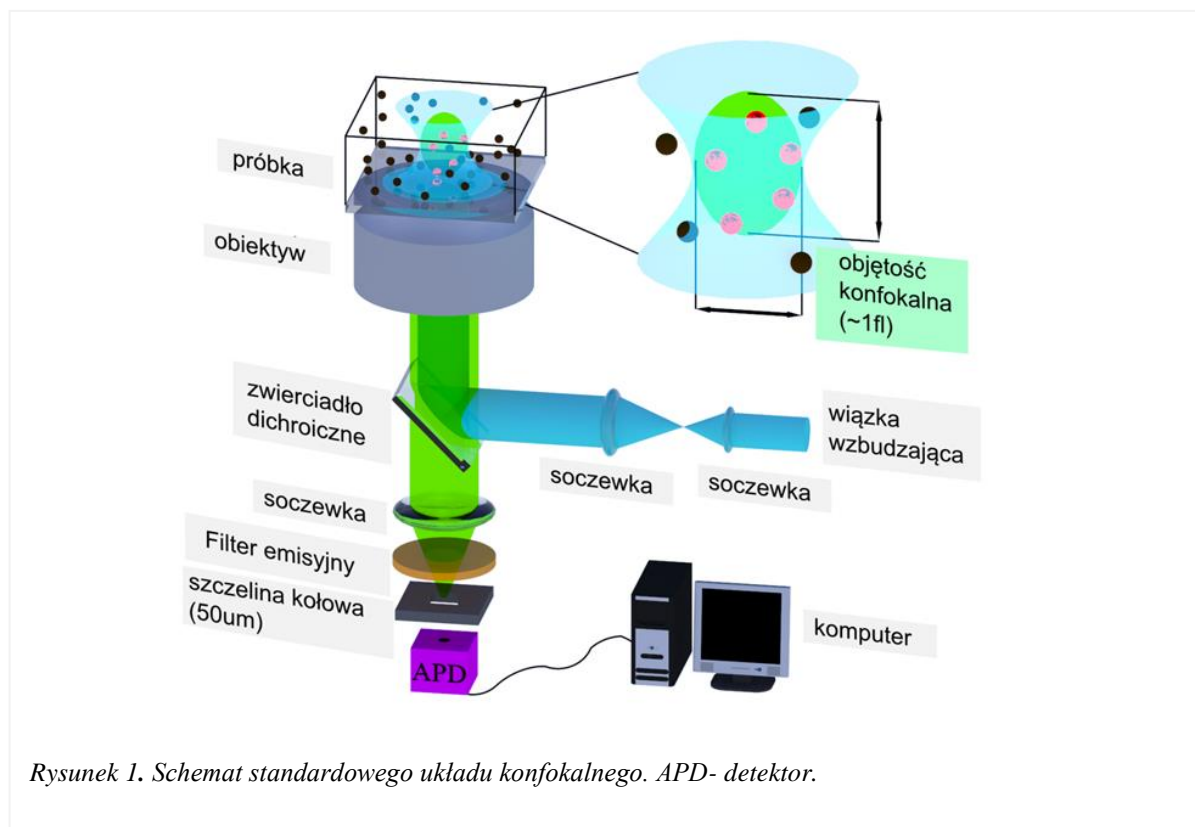
Głównym celem przeprowadzonych przeze mnie badań, zawartych w monotematycznym cyklu publikacji, była próba scharakteryzowania kondensacji plazmidowego DNA na poziomie pojedynczej cząsteczki, wykorzystując po raz pierwszy następujące metody **SMF**: spektroskopię korelacji fluorescencji (Fluorescence Correlation Spectroscopy, FCS), czasowo-rozdzielczą spektroskopię korelacji fluorescencji (Time Correlated Single Photon Counting Fluorescence Correlation Spectroscopy, TCSPC-FCS) oraz

spektroskopię korelacji czasu życia fluorescencji (Fluorescence Lifetime Correlation Spectroscopy, FLCS).

Motywacją do przeprowadzenia badań była możliwość pionierskiego wykorzystania (przy braku doniesień naukowych) wyżej wymienionych metod w celu śledzenia dynamiki zmian konformacyjnych plazmidowego DNA w objętościach rzędu 1fl oraz przy stężeniach rzędu nM, które jest trudno osiągnąć za pomocą innych metod, dających możliwość pomiarów w fizjologicznie istotnej skali.

I. Wstęp teoretyczny do metod fluorescencji pojedynczej cząsteczki

Spektroskopia korelacji fluorescencji (FCS) to nieinwazyjna technika fluorescencyjna, pozwalająca na śledzenie dynamiki pojedynczych molekuł dzięki zastosowaniu mikroskopii konfokalnej. W konwencjonalnej spektroskopii fluorescencyjnej (*steady state*) stosunkowo duża objętość próbki (100 μ l-1ml) oświetlana światłem wzbudającym dostarcza nam uśredniony sygnał fluorescencji, a w konsekwencji informację dotyczącą całego układu cząsteczek. Czułość metody FCS pokonuje to ograniczenie i dostarcza nam nieuśrednioną informację o badanej próbce na poziomie pojedynczej cząsteczki. Obecnie metoda FCS jest już relatywnie dobrze poznana oraz szeroko stosowaną techniką badawczą (E. L. Elson, 2011; Ries, Weidemann, & Schwille, 2012; Machań & Wohland, 2014). W metodzie tej śledzi się dyfuzję znakowanych fluorescencyjnie cząsteczek w ściśle zdefiniowanej objętości, oświetlanej przez skupioną wiązkę wzbudającą. Analiza statystyczna czasowej korelacji fluktuacji fluorescencji dostarcza nam informacji o współczynniku dyfuzji/czasie dyfuzji, pośrednio o rozmiarach oraz stężeniu cząstek. Pierwsze doniesienia naukowe dotyczące metody spektroskopii korelacji fluorescencji, zawierające zarówno opis przeprowadzonych eksperymentów jak i prezentację podstaw teoretycznych, ukazały się w latach siedemdziesiątych XX wieku (Magde, Elson, &



Rysunek 1. Schemat standardowego układu konfokalnego. APD- detektor.

Webb, 1972; E. Elson, 1974; Rigler, Grasselli, & Ehrenberg, 1979). Zwiększenie czułości metody FCS stało się możliwe dopiero kilkanaście lat później przez wprowadzenie optyki konfokalnej, zastosowanie wysokiej jakości laserów, filtrów optycznych oraz detektorów. Pozwoliło to wskrzesić i udoskonalić koncepcję FCS, redukując znacząco poziom tła, co było przepustką do detekcji sygnału pochodzącego od pojedynczych cząsteczek w roztworze oraz do rewizji teoretycznego opisu spektroskopii korelacji fluorescencji (Edman, 2000; Hess & Webb, 2002; Krichevsky & Bonnet, 2002; Chen, Müller, Berland, & Gratton, 1999; Meseth, Wohland, Rigler, & Vogel, 1999; Böhmer & Enderlein, 2003).

Podstawowy **układ pomiarowy FCS** wykorzystuje fluktuacje fluorescencji pochodzące z małej objętości wykrywania (1fl) oświetlonej próbki w celu uzyskania informacji o podstawowych procesach powodujących te fluktuacje (*Rysunek 1*). Obszar ten nazywany jest objętością konfokalną (*confocal volume*). W klasycznym mikroskopie konfokalnym źródłem światła wzbudzenia jest laser światła ciągłego. Wiązka wzbudzenia jest kierowana na układ soczewek, potem pada na zwierciadło dichroiczne, gdzie ulega odbiciu, a następnie pada na obiektyw o dużej aperturze numerycznej, który ogniskuje ją wewnątrz próbki. Następnie w wyniku emisji fluorescencji z próbki emitowane są fotony, które są skupiane przez ten sam obiektyw i ogniskowane na szczeliny kołowej (*pinhole*). Średnice stosowanych szczelin kołowych są rzędu 50-100µm. W prawie każdym układzie konfokalnym stosuje się dodatkowo przestrzenne filtry, które skutecznie „obcinają” próbkowaną objętość do dyfrakcyjnie ograniczonych rozmiarów. Emitowane fotony fluorescencji są gromadzone przez detektor, a następnie przetwarzane w funkcję korelacji.

Metoda FCS wykorzystywana jest m.in. do pomiaru własności dynamicznych cząstek. Jedną z najważniejszych wielkości opisującą dynamikę jest współczynnik dyfuzji, ponieważ zawiera on informacje o rozmiarze, konformacji oraz masie poruszającej się cząsteczki. Współczynnik dyfuzji $D[\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}]$ opisuje jak daleko może dotrzeć cząstka w wyniku ruchów dyfuzyjnych. Im większy współczynnik dyfuzji, tym szybciej cząstka się porusza. Trajektorię można scharakteryzować za pomocą tak zwanego średniego kwadratu przemieszczenia (MSD,) a $\langle r^2 \rangle$ opisuje obszar, który cząstka pokrywa w jednostce czasu, t . MSD jest liniowy w czasie, gdzie współczynnikiem proporcjonalności jest współczynnik dyfuzji:

$$\langle r^2 \rangle = 6 \cdot D \cdot t \quad \text{Równanie 1}$$

Równanie Stokesa-Einsteina wiąże współczynnik dyfuzji z własnościami cząstek oraz własnościami roztworu, przybierając postać:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi \cdot \eta R_h} \quad \text{Równanie 2}$$

Gdzie, k_B – stała Boltzmanna, T – temperatura bezwzględna, η - współczynnik lepkości roztworu. Cząsteczki są opisane przez promień hydrodynamiczny, R_h , który jest promieniem równoważnej kuli, która ma taki sam współczynnik dyfuzji jak dana cząsteczka.

Jeśli cząsteczka jest sferyczna, R_h i rzeczywisty promień cząsteczki będą prawie równe, zatem można go wyznaczyć z masy cząsteczkowej, M :

$$R_h = \sqrt[3]{\frac{3M}{4\pi\rho N_A}} \quad \text{Równanie 3}$$

Gdzie, ρ - oznacza średnią gęstość cząsteczki, N_A – liczba Avogadro.

Promień hydrodynamiczny będzie zwykle nieco większy niż rzeczywisty promień kuli, ponieważ bierze również pod uwagę obecność cząsteczek rozpuszczalnika, które są ciągnięte razem z cząsteczką. Należy zauważyć, że zależność D od temperatury nie jest funkcją liniową, ponieważ sam współczynnik lepkości η wykazuje silną zależność temperaturową. Jeśli przyjmiemy, że objętość V_p cząstki rośnie liniowo z jej masą m , otrzymujemy $V_p = \frac{4}{3}\pi R_h^3 \propto m$. Z tego możemy uzyskać zależność współczynnika dyfuzji od masy cząsteczki:

$$D \propto \frac{1}{\sqrt[3]{m}}$$

W przypadku cząsteczek o kształtach znacząco odbiegających od sferycznych (jak np. DNA o kształcie podłużnego pręta), występują odchylenia wartości R_h od rzeczywistego promienia cząsteczki. Współczynnik dyfuzji translacyjnej zależy, zatem w dużej mierze, od kształtu cząsteczki. W przypadku cząsteczek, takich jak DNA, współczynnik dyfuzji można oszacować następująco:

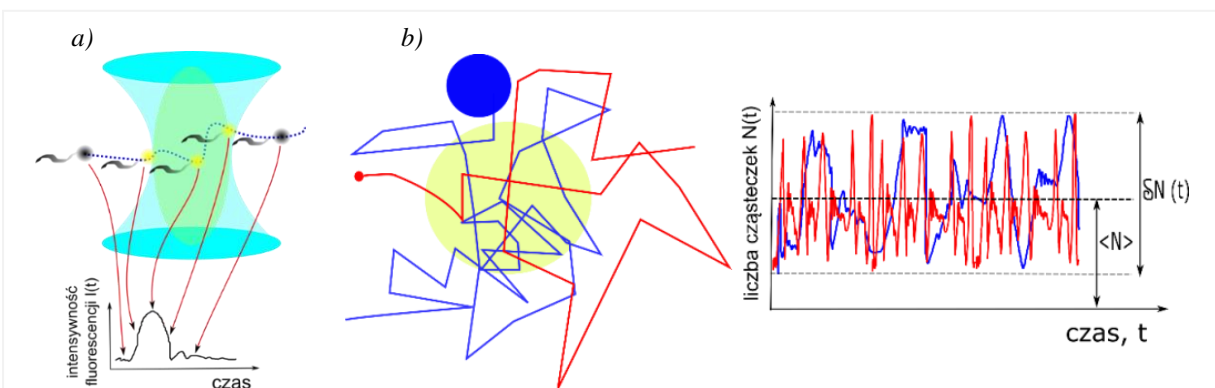
$$D = \frac{A \cdot k_b \cdot T}{3\pi\eta L} \quad \text{Równanie 4}$$

Gdzie L odpowiada długości pręta (dla DNA, to przyrost 0,34nm pomnożony przez liczbę par zasad), d jest średnicą pręta (2,38nm dla DNA), a A oznacza współczynnik korekcji.

$$A = \ln\left(\frac{L}{d}\right) + 0,312 + \frac{0,565}{\frac{L}{d}} - 0,1/\left(\frac{L}{d}\right)^2 \quad \text{Równanie 5}$$

Oznacza to, że współczynnik dyfuzji cząsteczki DNA (1000bp) jest około 5 razy mniejszy, a czas dyfuzji 5 razy większy dla konformacji w kształcie pręta niż dla konformacji kulistej (upakowanej) (Robertson, Laib, & Smith, 2006; Tracy & Pecora, 1992; Mandelkern, Elias, Eden, & Crothers, 1981).

Analizując fluktuacje fluorescencji w obszarze konfokalnym układu pomiarowego FCS, powodowane przez znakowane fluorescencyjnie cząsteczki, uzyskujemy wielkości opisujące własności badanej próbki. Fluktuacje te są spowodowane nieustannym wchodzeniem cząsteczek do, i ich wychodzeniem z, obszaru objętości konfokalnej.



Rysunek 2. a) fluktuacje sygnału fluorescencji w objętości konfokalnej, b) liczba cząstek $N(t) = \langle N \rangle + \delta N(t)$ w objętości konfokalnej dla dwóch grup cząstek (czerwonej, niebieskiej) o różnych współczynnikach dyfuzji ($D_n < D_{cz}$).

Zatem bezpośrednią wielkością mierzoną, są zmiany intensywności fluorescencji w funkcji czasu, $I(t)$ (Rysunek 2a).

Każda wzbudzona cząsteczka znacznika, emituje światło o takim samym natężeniu, jakie pochłonęła. Zatem, sumaryczne natężenie fluorescencji $I(t)$ jest proporcjonalne do liczby cząsteczek, $N(t)$. W metodzie FCS dzielimy całkowitą liczbę cząstek $N(t)$ na sumę dwu: średniej liczby cząstek $\langle N \rangle$ i (małych) odchyłeń liczby cząstek od wartości średniej, $\delta N(t)$.

$$N(t) = \langle N \rangle + \delta N(t) \quad \text{Równanie 6}$$

W FCS analizowane są tylko fluktuacje $\delta N(t)$, średnia $\langle N \rangle$ jest zazwyczaj pomijana podczas przetwarzania danych. Jeśli wiemy, jak długo cząsteczka pozostaje wewnątrz objętości obserwacyjnej, możemy również określić jej współczynnik dyfuzji, który odpowiada jej szybkości poruszania się. Jeśli więc obserwujemy cząstki o dużym D , często będą one wchodzić i opuszczać objętość obserwacji w ustalonym czasie obserwacji, a zatem wykazują szybkie wahania $\delta N(t)$. Z drugiej strony wahania te będą mniejsze dla małych współczynników dyfuzji (Rysunek 2b).

Ponieważ nie jesteśmy w stanie bezpośrednio wyznaczyć liczby cząsteczek wchodzących do i wychodzących z obszaru konfokalnego, a co za tym idzie fluktuacji liczby cząsteczek $N(t) = \langle N \rangle + \delta N(t)$, w konsekwencji mierzymy a następnie analizujemy fluktuacje natężenia sygnału fluorescencji $I(t)$. Jak już wspomniano powyżej, intensywność $I(t)$ zmienia się w taki sam sposób, jak liczba cząstek $N(t)$ i każda własność, którą wyprowadzamy dla $N(t)$ możemy zastosować dla $I(t)$. Zatem **równie 6** możemy zapisać w następującej postaci :

$$I(t) = \langle I \rangle + \delta I(t) \quad \text{Równanie 7}$$

Ze zmierzonego sygnału $I(t)$ musimy wyodrębnić szybkość jego zmian, aby móc uzyskać informacje o tym, jak szybko cząsteczki się poruszają. W tym celu używamy narzędzia matematycznego, zwanego *analizą autokorelacji* (stąd też nazwa *spektroskopia korelacji fluorescencji*, FCS). Wyznaczamy funkcję autokorelacji $G(\tau)$ zmierzonego sygnału natężenia $I(t)$. Funkcja autokorelacji jest matematycznie zdefiniowana jako:

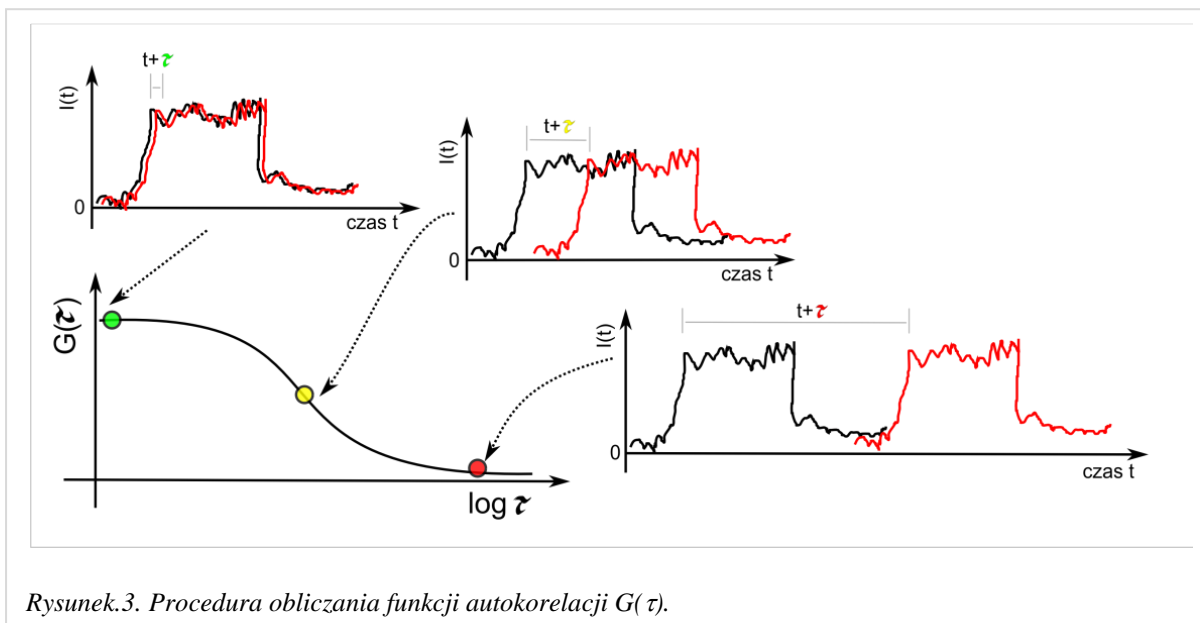
$$G(\tau) = \frac{\langle \delta I(t) \cdot \delta I(t+\tau) \rangle_t}{\langle I(t) \rangle_t^2} \quad \text{Równanie 8}$$

gdzie $\langle \dots \rangle_t$ oznacza średnią czasową w stosunku do zmiennej czasowej t :

$$\langle I(t) \rangle_t = \frac{1}{T} \int_1^T I(t) dt \quad \text{Równanie 9}$$

W konsekwencji funkcja autokorelacji opisuje samopodobieństwo fluktuacji $\delta I(t)$ do siebie samej o czas τ później (czas opóźnienia). Jeśli spojrzymy na fluktuacje $\delta I(t)$ i $\delta I(t+\tau)$ z długim czasem opóźnienia τ (● - punkt na krzywej), nie wykryjemy żadnego samopodobieństwa w sygnale, ponieważ fluktuacje w czasie $t+\tau$ są spowodowane przez różne cząstki, będące od siebie niezależne (Rysunek 3). Wtedy wartość autokorelacji $G(\tau)$ powinna być bliska zeru. Jeżeli zaś czas opóźnienia τ jest tak mały, że te same cząstki tworzą fluktuacje w czasie t i $t+\tau$ (mniejsze niż średni czas pozostawania cząsteczek o obszarze ogniska lasera), będziemy mieli

pewien stopień samopodobieństwa między $\delta I(t)$ i $\delta I(t+\tau)$ (wysoka autokorelacja $G(\tau)$; ● - punkt na krzywej). Funkcja autokorelacji pozwala nam wyodrębnić nieprzypadkowe informacje od losowych fluktuacji intensywności $I(t)$, ponieważ fluktuacja intensywności jest zgodna ze statystyką Poissona (Földes-Papp, 2007). Analiza korelacji przeprowadzona w metodzie FCS wyodrębnia charakterystyczny przedział czasowy fluktuacji fluorescencji, który następnie może zostać przekształcony we współczynnik dyfuzji. Zakres czasowy czułości metody FCS rozciąga się w skali czasu od pikosekund do setek milisekund.



Rysunek 3. Procedura obliczania funkcji autokorelacji $G(\tau)$.

Każdy pomiar FCS daje nam zatem krzywą autokorelacji $G(\tau)$. Następnie by móc uzyskać wartości, takie jak: współczynnik dyfuzji, D oraz liczbę cząstek N , do zmierzonej funkcji autokorelacji $G(\tau)$ badanego procesu dopasowujemy różne modele teoretyczne $G(\tau)$. Dla przykładu, w przypadku jednego rodzaju cząsteczek ze współczynnikiem dyfuzji D i liczbą cząsteczek N w obszarze konfokalnym ogniska, otrzymujemy:

$$G(\tau) = \frac{1}{N} \cdot \left(1 + \frac{4D\tau}{\omega_1^2}\right)^{-1} \cdot \left(1 + \frac{4D\tau}{\omega_2^2}\right)^{-\frac{1}{2}} \quad \text{Równanie 10}$$

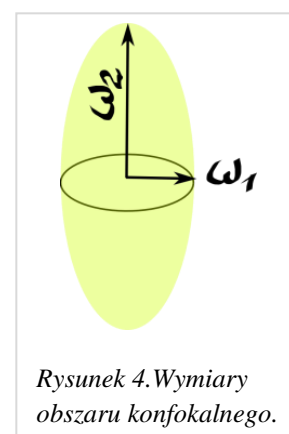
Gdzie ω_1 to szerokość w płaszczyźnie XY, a ω_2 to wysokość (kierunek osi OZ) objętości konfokalnej. Zakłada się, że ognisko ma kształt elipsoidy o dwóch równych osiach i długości $2\omega_2$ (Rysunek 4).

Zazwyczaj, równanie 10 jest wyrażone, jako zależność od średniego czasu dyfuzji $\tau_D = \frac{\omega_1^2}{4D}$ i wygląda następująco:

$$G(\tau) = \frac{1}{N} \cdot \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1} \cdot \left(1 + \frac{\tau}{SP^2 \cdot \tau_D}\right)^{-\frac{1}{2}} \quad \text{Równanie 11}$$

Stąd współczynnik dyfuzji wyrażamy, jako:

$$D = \frac{\omega_1^2}{4\tau_D} \quad \text{Równanie 12}$$



Rysunek 4. Wymiary obszaru konfokalnego.

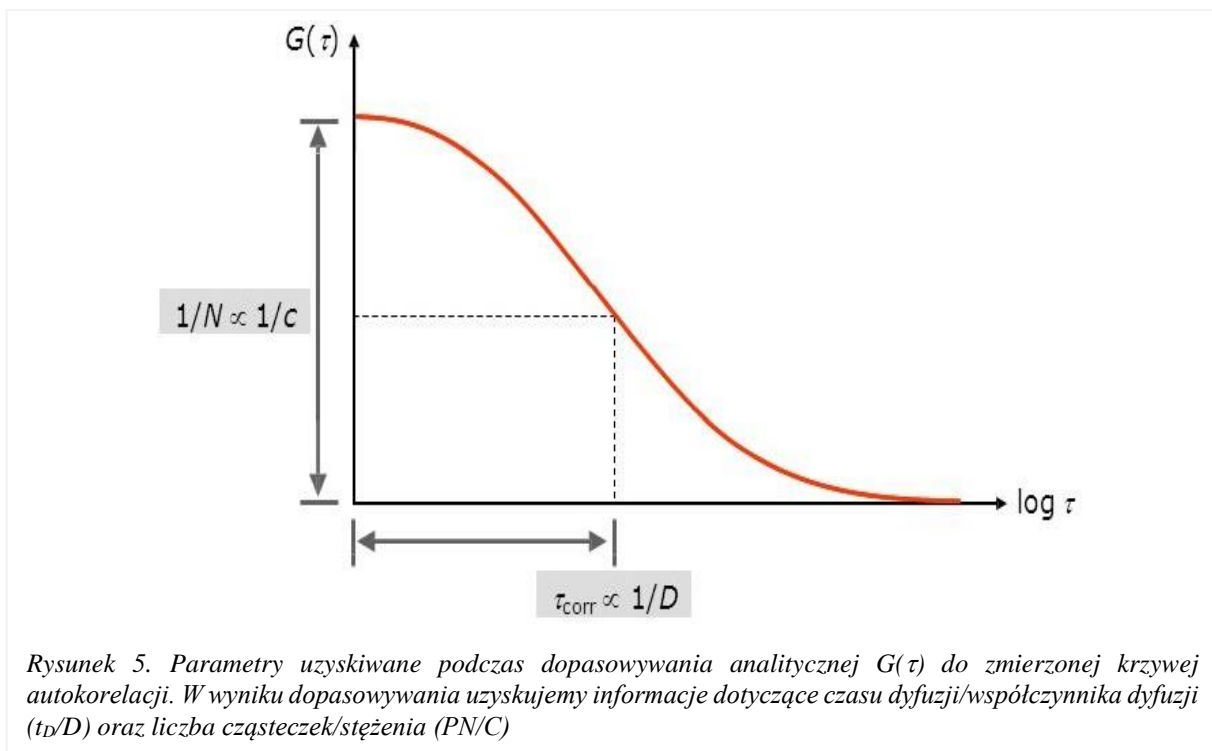
a SP , parameter strukturalny, jako:

$$SP = \frac{\omega_2}{\omega_1} \quad \text{Równanie 13}$$

By móc wyznaczyć współczynnik dyfuzji D , musimy znać poprzeczne wymiary ogniska oraz parametr strukturalny (SP). Parametr SP zazwyczaj wyznacza się poprzez pomiar kalibrujący roztworu znacznika o znanym współczynniku dyfuzji. Znając wymiary obszaru konfokalnego, możemy wyznaczyć jego objętość V , a co za tym idzie stężenie badanej próbki (równanie 14).

$$C = \frac{N}{V \cdot N_A} \quad \text{Równanie 14}$$

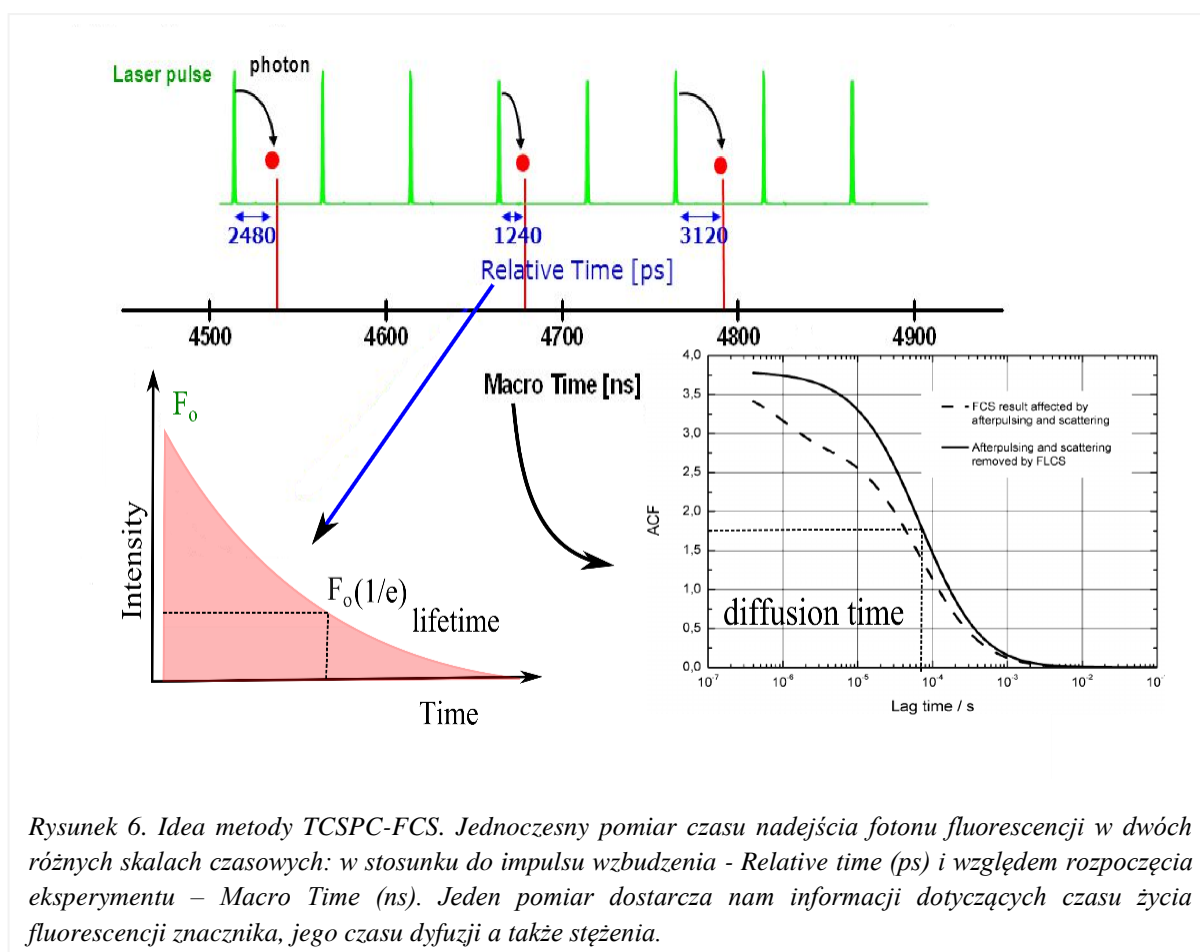
Reasumując, cząsteczki fluorescencyjne dyfundujące do i z, ograniczonej dyfrakcyjnie, objętości konfokalnej, powodują fluktuację sygnału fluorescencji zgodnie ze zmieniającą się liczbą cząsteczek. Analiza fluktuacji pozwala nam na obliczenie krzywych autokorelacji. W zależności od badanego układu, dopasowując najbardziej odpowiedni model, uzyskujemy informacje dotyczące czasu (t_D)/współczynnika dyfuzji (D) oraz stężenia/liczby cząstek (N). Czas dyfuzji jest wprost, a współczynnik dyfuzji odwrotnie proporcjonalny, do szerokości krzywej autokorelacji. Ilość cząsteczek N /stężenie, są natomiast odwrotnie proporcjonalne do amplitudy krzywej $G(\tau)$ (Rysunek 5)



Zaprezentowane założenia teorii FCS są poprawne dla cząsteczek o rozmiarach dużo mniejszych niż wielkość płaszczyzny ogniskowania objętości konfokalnej, tzw. cząsteczek punktowych (*point-like molecules*). Interpretacja danych uzyskanych dzięki metodzie FCS zależy przede wszystkim od zastosowanego modelu teoretycznego funkcji autokorelacji. Funkcja autokorelacji może np. zostać rozszerzona na przypadek, w którym mamy do czynienia z kilkoma rodzajami cząsteczek o różnych czasach dyfuzji a także, gdy mamy do czynienia z

dyfuzją niespecyficzną (Tcherniak, Reznik, Link, & Landes, 2008; Haustein & Schwille, 2007; Tian, Y., Martinez, M. M., Pappas, 2011). Fluktuacje intensywności fluorescencji mogą powstawać także w wyniku innych niż zjawisko dyfuzji procesów, takich jak: wiązanie oraz utrata znaczników w wyniku gaszenia, lub też w wyniku zmian ich efektywności kwantowej (procesy trypletowe) (Davis & Shen, 2006). Wraz z coraz szerszym spektrum zastosowań metody FCS, wyprowadza się analityczne krzywe korelacji uwzględniające nie tylko rozmiar, ale także geometrię badanych cząsteczek. Rozkład znacznika w obrębie cząsteczki, czy też zjawisko rozpraszania z jednoczesnym wiązaniem, także mają wpływ na kształt funkcji korelacji (Wu, Chen, & Müller, 2008; Hołyst, Poniewierski, & Zhang, 2017). Dla cząsteczek typu polimer (DNA), stwierdzono silną zależność funkcji $G(\tau)$ od długości łańcucha DNA, jego długości trwałej oraz gęstości znacznika fluorescencyjnego (Winkler, Keller, & Rädler, 2006).

Zwiększenie czułości metody FCS nastąpiło dzięki zastosowaniu skorelowanego czasowo zliczania pojedynczych fotonów (*time correlated single photon counting*, TCSPC). Połączenie możliwości metody TCSPC i FCS dało w efekcie metodę **czasowo-rozdzielczej spektroskopii korelacji fluorescencji (TCSPC-FCS)**. Podstawowym wymogiem metody TCSPC-FCS jest sub-nanosekundowe wzbudzenie pulsacyjne zamiast wzbudzania ciągłego, jak to ma miejsce w klasycznym pomiarze FCS. Przy okresowym wzbudzaniu możliwe jest rozszerzenie gromadzenia danych przez wiele cykli wzbudzenia i emisji. Następnie z pojedynczych fotonów zebranych w wielu cyklach, można zrekonstruować profil zaniku fluorescencji. Drugim wymogiem jest zdolność do jednoczesnego pomiaru czasu nadejścia



Rysunek 6. Idea metody TCSPC-FCS. Jednoczesny pomiar czasu nadejścia fotonu fluorescencji w dwóch różnych skalach czasowych: w stosunku do impulsu wzbudzenia - Relative time (ps) i względem rozpoczęcia eksperymentu – Macro Time (ns). Jeden pomiar dostarcza nam informacji dotyczących czasu życia fluorescencji znacznika, jego czasu dyfuzji a także stężenia.

fotonu fluorescencji w dwóch różnych skalach czasowych: w stosunku do impulsu wzbudzenia z rozdzielczością pikosekundową (*Relative Time*) i względem rozpoczęcia eksperymentu z dokładnością nanosekundową (*Macro Time*) (*Rysunek 6*). Zastosowanie szybkich detektorów (MCP, SPAD) oraz impulsowych źródeł światła (w trybie TCSPC) umożliwia równoczesny pomiar obu tych czasów (Kapusta, Machan, Benda, & Hof, 2012; Kapusta, Wahl, Benda, Hof, & Enderlein, 2007; Wahl, 2014). Metoda ta daje możliwość wyseparowania czasów życia fluorescencji znaczników i nie wymaga dopasowania wieloparametrowego modelu do złożonej funkcji autokorelacji jak to ma miejsce w klasycznej metodzie FCS. Rdzeniem metody TCSPC-FCS jest statystyczny rozdział poszczególnych składowych fluorescencji dla pojedynczych fotonów. Rozdział ten odbywa się dzięki metodzie statystycznego ważenia każdego fotonu, zgodnie z czasem jego nadejścia od momentu impulsu wzbudzenia. Metoda TCSPC-FCS pełnię swoich możliwości uzyskała w roku 2005 i odtąd jest już nazywana metodą **spektroskopii korelacji czasu życia fluorescencji (FLCS)**. W publikacji (Enderlein & Gregor, 2005) opisane jest najprostsze i jedno z najbardziej użytecznych zastosowań metody FLCS: szybkie i łatwe usuwanie zniekształceń powodowanych przez detektor, co ma duży wpływ na jakość uzyskiwanych parametrów FCS. Podejście to zostało zaakceptowane jako standardowa część analizy danych FCS i jest używane bez wyraźnego odniesienia do metody FLCS. Metoda FLCS jest szczególnie przydatna, gdy stosujemy znaczniki o niedających się rozróżnić widmach, a różniących się czasem życia fluorescencji (mają różne histogramy TCSPC), co praktycznie zawsze ma miejsce. FLCS rozróżnia chromofory o różnym czasie życia (nawet w przypadku jednego rodzaju znacznika), co następnie umożliwia obliczenie funkcji korelacji krzyżowej (*cross-correlation function, CCF*) między dwiema częstkami o różnym czasie życia fluorescencji a tym samym ujawnia relacje między nimi. Obie metody: czasowo-rozdzielcza spektroskopia korelacji fluorescencji (TCSPC-FCS) oraz jej najnowsza odmiana spektroskopia korelacji czasu życia fluorescencji (FLCS), w ramach jednego pomiaru dostarczają informację o bezpośrednim otoczeniu znacznika. Zmiana czasu życia może być skutkiem wielu zjawisk makrocząsteczkowych, takich jak: dyfuzja rotacyjna, przenoszenie energii rezonansowej, czy gaszenie dynamiczne, które mają taką samą skalę czasową jak zanik fluorescencji. W konsekwencji zmiana czasu życia fluorescencji jest czułym reporterem zmian w jego bezpośrednim otoczeniu, w szczególności gdy mamy do czynienia z badaniami na poziomie pojedynczej cząsteczki.

II. Omówienie osiągniętych wyników badań w ramach osiągnięcia naukowego, dotyczących procesu kondensacji plazmidowego DNA przy użyciu metod fluorescencyjnych na poziomie pojedynczej cząsteczki.

Przedstawione poniżej wyniki badań, **po raz pierwszy** analizują proces kondensacji plazmidowego DNA z punktu widzenia spektroskopii korelacji fluorescencji (FCS) czasowo-rozdzielczej spektroskopii korelacji fluorescencji (TCSPC-FCS) oraz spektroskopii korelacji czasu życia fluorescencji (FLCS) (prace **H1-H6**) (Kral, Langner, et al., 2002; Kral, Hof, Jurkiewicz, & Langner, 2002; Kral, Hof, & Langner, 2002; Kral, Langner, & Hof, 2006; Kral, Widerak, Langner, & Hof, 2005; Humpolícková et al., 2008) oraz jednocześnie prezentują możliwość ich praktycznego wykorzystania w badaniach oddziaływania plazmidowego DNA z nowo syntetyzowanymi kompleksami mającymi lub mogącymi mieć zastosowanie w

niewirusowej terapii genowej (NVGT) (prace **H7-H10**) (Kral et al., 2010; Breton et al., 2011; Pembouong et al., 2011; Misiak et al., 2013).

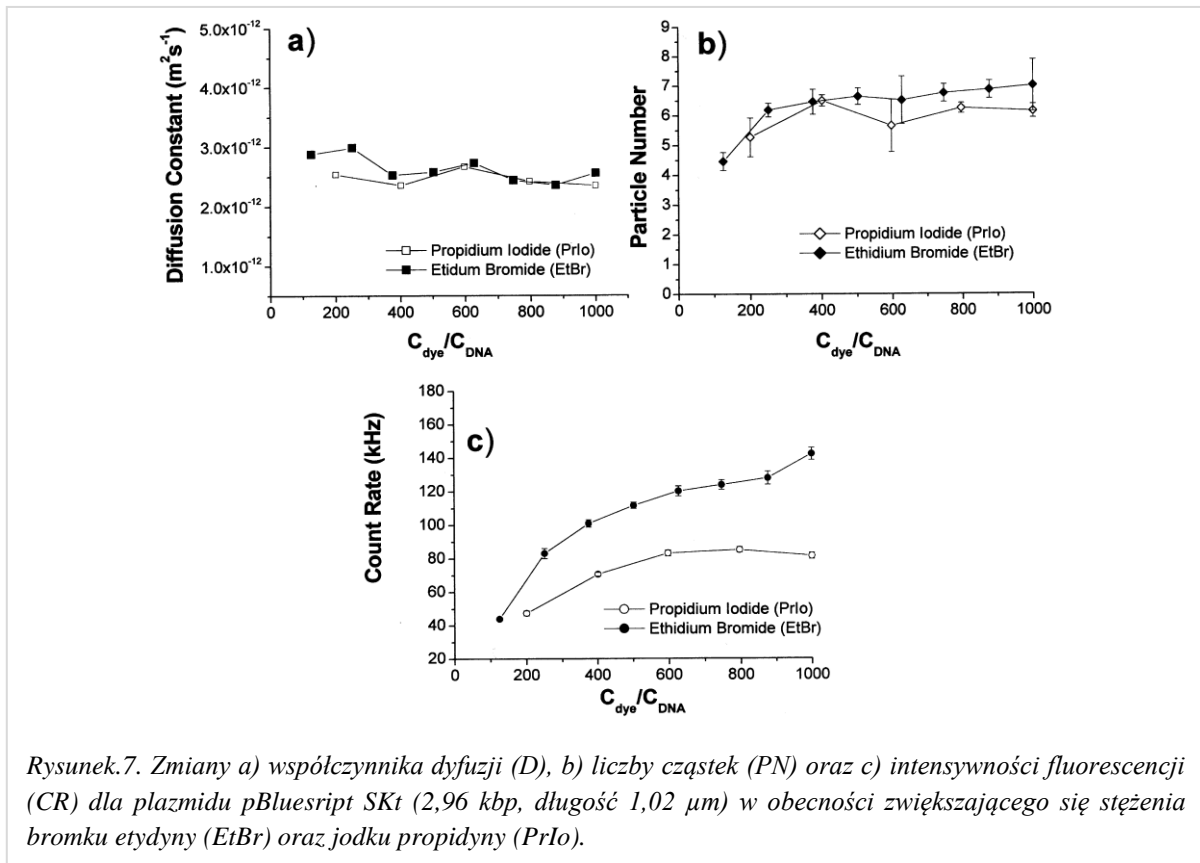
Nowatorskie zastosowanie metod fluorescencyjnych na poziomie pojedynczej cząsteczki (SMF) wymagało określenia optymalnych warunków, identyfikujących przestrzeń fazową procesu kondensacji. W tym celu ustalono zestaw wewnętrznych czynników, mających wpływ na zmiany konformacyjne DNA oraz parametrów SMF, mających wpływ na interpretację uzyskanych danych.

Projekt uwzględniał następujące zagadnienia, które były przedmiotem moich badań:

1. *Rodzaj i ilość znacznika wykorzystanego jako reporter plazmidowego DNA,*
2. *Rodzaj czynnika kondensującego: poliaminy, kationowe i niekationowe związki amfifilowe, formulacje lipidowe (liposomy),*
3. *Punktowe wykrywanie molekuł w procesie kondensacji plazmidowego DNA,*
4. *Zmiany czasu życia fluorescencji w procesie kondensacji DNA,*
5. *Zastosowanie metod SMF w układach DNA-nowosyntetyzowane związki.*

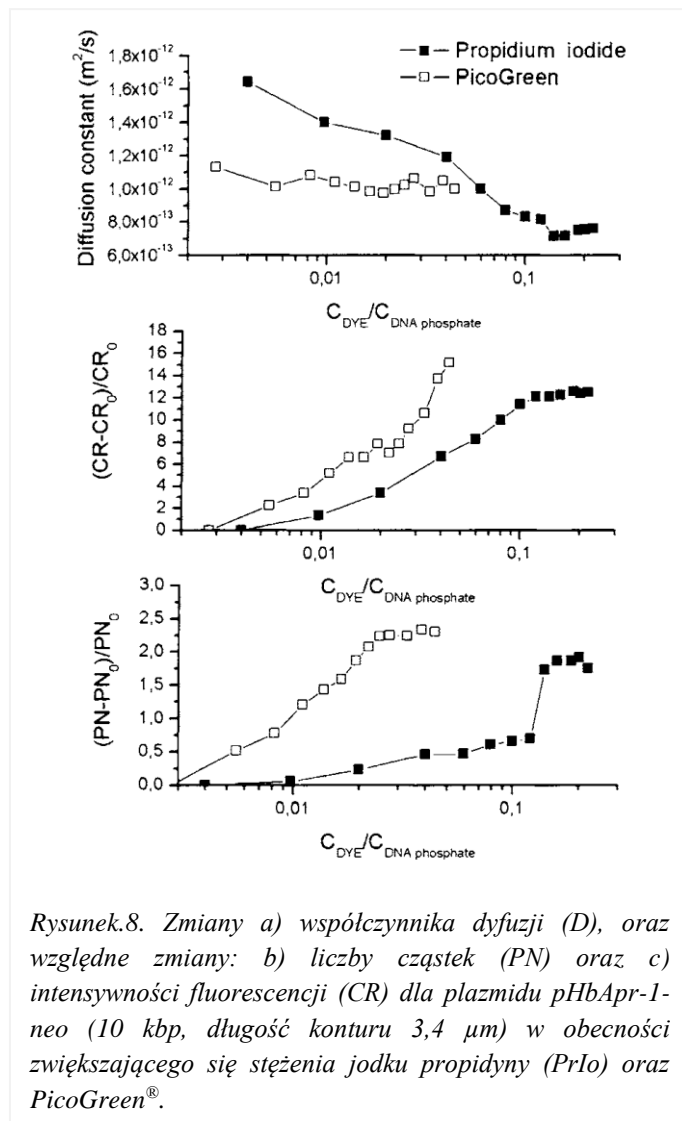
1. *Rodzaj i ilość znacznika wykorzystanego jako reporter plazmidowego DNA.*

Znakowanie fluorescencyjne jest obecnie jedną z wielu technik, powszechnie stosowaną w badaniach zmian konformacyjnych cząsteczek DNA. Znacznik fluorescencyjny będący reporterem, powinien mieć odpowiednie własności optyczne, fotofizyczne i, co najważniejsze, nie powinien zakłócać badanego procesu. W celu uniknięcia modyfikacji chemicznych, znacznik fluorescencyjny powinien być związany z cząsteczką DNA poprzez słabe wiązania niekowalencyjne. Bromek etydyny (EtBr) i jodek propidyny (PrIo) to jedne z najszerzej stosowanych znaczników fluorescencyjnych kwasów nukleinowych. Słabe wiązanie EtBr/PrIo z cząsteczką DNA jest realizowane przez wnikanie (*interkalacja*) cząsteczek znacznika między pary zasad cząsteczki DNA z niewielką preferencją sekwencji (Banerjee et al., 2014; Chou, Marky, Zaunczkowski, & Breslauer, 1987). Stechiometria wiązania dla EtBr/PrIo to jedna cząsteczka znacznika przypadająca na cztery do pięciu par zasad DNA. Stosunkowo słaba wydajność kwantowa fluorescencji obu znaczników, zwiększa się około 10-krotnie, po związaniu z dsDNA (Geall & Blagbrough, 2000). Pierwsze opublikowane przeze mnie wyniki pomiarów z wykorzystaniem spektroskopii korelacji fluorescencji (FCS) dla plazmidowego DNA, znakowanego EtBr/PrIo, pozwoliły na określenie zmian następujących parametrów metody, takich jak: liczba cząstek (PN) oraz czas dyfuzji (t_D) /współczynnik dyfuzji (D). Analizowałam także szybkość zliczania fotonów w jednostce czasu (CR) (*count rate*), która była miarą intensywności sygnału fluorescencji (T. Kral, Langner, et al. 2002). Eksperymentalne funkcje $G(\tau)$ były dopasowane do krzywej teoretycznej, uwzględniającej jeden typ cząstek fluorescencyjnych oraz pewną ilość cząsteczek znacznika w stanie trypletowym (>10%). W badaniach wykorzystano kołowy plazmid pBluescript SKt (2,96 kbp, długość konturu 1,02 μm) (*Rysunek 7*).



Wyznaczone wartości PN wykazywały ponad 2-krotny wzrost a wartości D nieznaczny spadek dla całego prezentowanego zakresu stężenia barwnika fluorescencyjnego C_{dye}/C_{DNA} 0-1000 (w przeliczeniu na parę zasad, $C_{dye}/C_{DNA_{bp}}$ 0-0,34). W przypadku tych dwu parametrów, nie było znaczących różnic między EtBr i PrIo. Intensywność fluorescencji (CR) związana z pojedynczymi cząsteczkami DNA, zmieniała się wraz ze stężeniem znacznika i odnotowano znaczną różnicę w między EtBr i PrIo. Intensywność fluorescencji była prawie 2-razy wyższa dla EtBr, co mogło mieć związek z jego wyższą wydajnością kwantową lub większą liczbą cząsteczek znacznika związanych z DNA. Wyznaczona wartość współczynnika dyfuzji była taka sama w przypadku obu znaczników i wynosiła $D_{2,96kbp} = 2,5 \times 10^{-12} m^2 s^{-1}$. Wartość współczynnika dyfuzji wyznaczonego metodą FCS znajduje się w podobnym zakresie jak jego wartość oszacowana na podstawie modelu (równanie 4 i 5) $D_{2,96kbp_model} = 3,0 \times 10^{-12} m^2 s^{-1}$ (przy założeniu przyrostu 3.4 \AA /parę zasad oraz promienia nici DNA równemu $23,8 \text{ \AA}$). Podobne badania wykonano dla plazmidu prawie 3-razy większego, 10kbp (pHbApr-1-neo o długości konturu $3,4 \mu m$). Wyznaczony metodą FCS współczynnik dyfuzji $D_{10kbp} = 9,6 \times 10^{-13} m^2 s^{-1}$ był znów niezależny od wyboru znacznika i znajdował się w zakresie oszacowanej teoretycznie wartości $D_{10kbp_model} = 1,0 \times 10^{-12} m^2 s^{-1}$. Należy podkreślić, że zastosowany model „sztywnego pręta” reprezentował nadmierne uproszczenie badanych cząsteczek DNA. Oba badane plazmidy DNA to giętkie, kołowo-zamknięte cząsteczki. Odchylenie od sztywnego, prętowego kształtu z pewnością wpływa na współczynnik dyfuzji, jednakże celem moich badań było wykazanie przydatności metody FCS w badaniach procesu kondensacji DNA, a nie teoretyczne modelowanie eksperymentalnie wyznaczonych współczynników dyfuzji. Niemniej jednak uważam, że oszacowane współczynniki dyfuzji mogą być pomocne do wyznaczenia długości konturu plazmidowego DNA.

W obliczu doniesień naukowych postulujących, że ilość znacznika ma wpływa na wyniki ilościowe eksperymentu (Cosa, Focsaneanu, McLean, McNamee, & Scaiano, 2001; Sigmon & Larcom, 1996), wykonano szczegółowe badania dla niższych stężeń jodku propidyny oraz wykorzystano bardziej efektywny znacznik PicoGreen® (Ahn, Costa, & Emanuel, 1996).



Charakter względnych zmian intensywności fluorescencji wraz ze wzrastającym stężeniem znacznika wskazuje, że $PrIo$ kolejno wypełnia wszystkie dostępne miejsca wiązania w obrębie cząsteczki DNA. Wzrostowi intensywności fluorescencji, CR towarzyszy systematyczny spadek współczynnika dyfuzji (*Rysunek 8*). Wartość współczynnika dyfuzji spada z $D_{10kbp} = 1,6 \times 10^{-12} m^2 s^{-1}$ do około $0,7 \times 10^{-13} m^2 s^{-1}$ wraz ze wzrostem stężenia znacznika od 0 do $C_{PrIo}/C_{DNAbp} = 0,15$. Zakres, w jakim zmienia się współczynnik dyfuzji, nie może być tłumaczony prostym wzrostem masy plazmidu, który byłby konsekwencją wiązania się cząsteczek znacznika. Zakładając, że każda cząsteczka $PrIo$ przypada na cztery pary zasad DNA, masa powinna wzrosnąć o mniej niż 25%; większe różnice masy są potrzebne, aby uwzględnić zaobserwowany efekt (Schwille, Bieschke, & Oehlschläger, 1997). Spadek wartości współczynnika dyfuzji można interpretować jako

zmianę konformacyjną i/lub agregację plazmidów indukowaną obecnością znacznika. Należy jednak wykluczyć możliwość powstawania agregatów, bo wraz ze wzrostem stężenia $PrIo$ jednocześnie obserwowano wzrost liczby cząsteczek PN . Proces agregacji dałby efekt przeciwny. Malejący współczynnik dyfuzji, odzwierciedla zatem zmianę konformacji plazmidu po związaniu $PrIo$. Kierunek zmiany współczynnika dyfuzji sugeruje, że rośnie promień hydrodynamiczny plazmidu, co wskazuje, że cząsteczka przyjmuje konformację zrelaksowaną. Wniosek ten był zgodny z teoretycznie przewidywanym wnikaniem cząsteczek znacznika pomiędzy pary zasad kwasu nukleinowego (Reese, 1994). Dodatkowe informacje uzyskano, analizując zależność PN od stężenia $PrIo$. Dla stężenia $C_{PrIo}/C_{DNAbp} = 0,15$ następuje gwałtowny wzrost liczby wykrywanych cząsteczek. Wynik ten może wskazywać, że istnieją dwie różne populacje plazmidu, które oddziałują ze znacznikiem fluorescencyjnym w różny i zależny od

stężenia sposób. Obraz, który wyłania się z przedstawionych danych eksperymentalnych, jest dość skomplikowany. Należy założyć dwie subpopulacje plazmidu. Obie subpopulacje prawdopodobnie mają różne powinowactwo do sondy fluorescencyjnej i różne rozmiary hydrodynamiczne. Przy bardzo niskich stężeniach znacznika jedna populacja w ogóle nie wiąże się ze znacznikiem, druga wiążąc znacznik, zmienia swoją konformację wraz ze wzrostem stężenia, co powoduje zmniejszenie współczynnika dyfuzji. Jednakże tylko ta druga subpopulacja jest wykrywalna. Gdy stężenie znacznika jest wyższe, obie subpopulacje plazmidu stają się widoczne, powodując nagły wzrost liczby cząstek. Wyniki badań pokazują, że jodek propidyny nie jest jakościowo dobrym reporterem zmian konformacyjnych, ponieważ sama jego obecność powoduje takie zmiany. Podobne dane uzyskano w przypadku badań z bromkiem etydyny.

Badania dotyczące oddziaływania PicoGreen® z plazmidowym DNA pokazały, że zależności wszystkich zmierzonych parametrów od stężenia sondy fluorescencyjnej są jakościowo różne od tych dla PrIo/EtBr. Pomimo ciągłego wzrostu intensywności fluorescencji, współczynnik dyfuzji ($D_{10\text{kbp}} = 1,0 \times 10^{-12} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$) pozostawał stały w całym zakresie stężeń ($C_{\text{PicoGreen}}/C_{\text{DNAbp}}$ od 0,02 do 0,05). Zatem znacznik PicoGreen® nie zmieniał konformacji plazmidu, jednocie znakując wszystkie cząsteczki plazmidu. Co więcej badania FCS pokazały, że intensywność fluorescencji praktycznie nie zmienia się w trakcie procesu kondensacji, wskazując, że ewentualne uwalnianie znacznika nie zakłóca procesu kondensacji. W porównaniu do PrIo/EtBr, zastosowanie PicoGreen® w badaniach FCS miało dwie zalety: nie zmieniało własności hydrodynamicznych DNA i nie wpływało na stężenie substancji kondensującej niezbędnej do upakowania plazmidu (Kral et al., 2005). Wysoka wydajność kwantowa pozwala na stosowanie 10-krotnie niższego stężenia PicoGreen® (rzęd 1-5 cząsteczek znacznika na 100 par zasad DNA). W porównaniu z PrIo/EtBr, PicoGreen® ma też wyższe powinowactwo do dsDNA, tworząc stabilne wiązanie dwufazowe (Dragan et al., 2010).

Wnioski dotyczące rodzaju i ilości znacznika, będącego reporterem plazmidowego DNA.

- Obecność cząsteczek znaczników takich jak EtBr/PrIo w strukturze cząsteczki plazmidu znacząco zmienia jego konformację.
- Wraz ze wzrostem stężenia EtBr/PrIo oba te znaczniki selektywnie znakują fragmenty plazmidu i/lub jego subpopulacje.
- PicoGreen®, z punktu widzenia metod SMF, jest znacznikiem bardziej odpowiednim; znakując plazmid DNA równomiernie, bez artefaktów zależnych od stężenia.
- Reasumując, w procesach, w których interesuje nas informacja dotycząca topologii plazmidowego DNA, wybór odpowiedniego znacznika fluorescencyjnego powinien być skrupulatnie analizowany.

2. Rodzaj czynnika kondensującego.

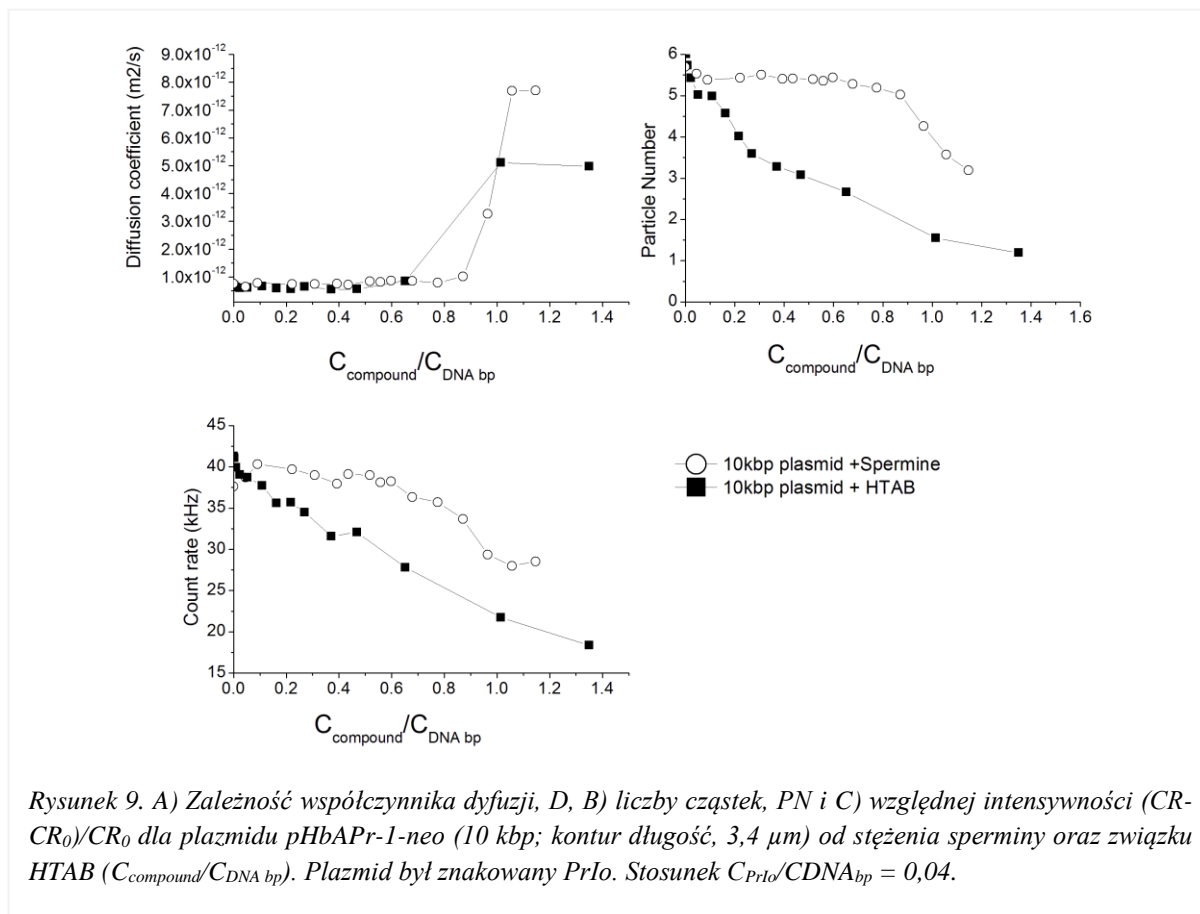
Kondensacja DNA w układach *in vitro* oparta jest na dwóch mechanizmach. Pierwszy z nich to upakowywanie, czyli przyciąganie się poszczególnych segmentów cząsteczki DNA w wyniku związania wielowartościowego jonu. Drugi mechanizm kondensacji zakłada połączenie się różnych części DNA w warunkach zagęszczenia, uwzględniając współdziałanie polimer-sól. Ten drugi rodzaj nazywamy kondensacją Ψ (psi, *polymer-salt-induced*). Siłą

napędową jest proces osłabienia sił wzajemnego odpychania się ujemnie naładowanych segmentów cząsteczki DNA. Obecność soli może neutralizować te ładunki, w konsekwencji zmniejszając opór elektrostatyczny między różnymi częściami DNA. Substancje kondensujące cząsteczki DNA wykorzystują zazwyczaj oba te mechanizmy bądź neutralizując ładunek grupy fosforanowej i/lub reorientując dipole wodne w obrębie cząsteczki DNA powodując, że oddziaływanie DNA – rozpuszczalnik będą mniej korzystne. Środki kondensujące DNA, w zależności od mechanizmu kondensacji, można podzielić na dwa typy: pierwszy - środki kationowe, w tym wielowartościowe kationy, różne białka kationowe i kationowe środki powierzchniowo czynne, drugi - neutralne słabe rozpuszczalniki lub „zagęszczające” polimery, takie jak np. etanol, dekstran i glikol polietylenowy. Przeciwny, takie jak np. Na^+ , mogą odgrywać różne role w obu mechanizmach kondensacji. W szczególności zwiększenie stężenia Na^+ sprzyja kondensacji, podczas gdy w kondensacji DNA wywołanej jonami kationowymi ma działanie hamujące (Ran & Jia, 2015). Wielowartościowe kationy mogą powodować lokalne ugięcia lub zaburzenia w obrębie cząsteczki DNA, ułatwiając tym samym proces upakowania. W roztworach wodnych, proces kondensacji zwykle wymaga obecności wielowartościowych kationów posiadających ładunki 3^+ lub więcej (Bloomfield, 1997). Te najczęściej stosowane w badaniach kondensacji, to naturalnie występujące poliaminy, takie jak spermidyna $^{3+}$ i spermina $^{4+}$. Spermina była pierwszym związkiem, który wykorzystałam w badaniach, analizując proces kondensacji plazmidowego DNA z punktu widzenia metod SMF (T. Kral, Langner, et al., 2002; T. Kral, Hof, & Langner, 2002; Humpolicková, Benda, et al., 2008).

2.1 Poliamina- spermina $^{4+}$

W badaniach wykorzystano plazmid pBluescript SKt (2,96 kbp, długość konturu 1,02 μm) oraz plazmid pHbApr-1-neo (10 kbp, o długości konturu 3,4 μm). W początkowej fazie badań oba plazmidy były znakowane jodkiem propidyny oraz bromkiem etydyny (Kral, Langner, et al., 2002, Kral, Hof, & Langner, 2002). W dalszej fazie badań, uwzględniając przewagę PicoGreen[®], korzystałam już tylko z tego znacznika (Kral, Langner, & Hof, 2006a, Humpolicková, Benda, et al., 2008). Przy okazji wstępnych badań zaobserwowałam, że stężenie czynnika kondensującego, wymagane do kondensacji plazmidowego DNA, zależy od stężenia znacznika fluorescencyjnego. Możliwe są co najmniej dwa wyjaśnienia tego zjawiska: 1) znacznik i związek kondensujący oddziałują ze sobą, co zmniejsza ich zdolność do wiązania z cząsteczką DNA, lub (co bardziej prawdopodobne) 2) znacznik fluorescencyjny i czynnik kondensujący współzawodniczą o miejsca wiązania w obrębie plazmidu. W rzeczywistości zaobserwowano, że zaadsorbowany znacznik fluorescencyjny pozostaje częściowo przyłączony do cząsteczki DNA nawet po zakończeniu procesu kondensacji. Potwierdzają to również wartości sygnału intensywności fluorescencji (CR) i liczby cząstek fluorescencyjnych (PN), które nigdy całkowicie nie zanikają. Dla stężeń sperminy $C_{\text{spermina}}/C_{\text{DNAbp}} < 0,5$ współczynnik dyfuzji plazmidu (10 kbp) nie zmieniał się znacząco i wynosił $D_{10\text{kbp}} = 0,96 \times 10^{-13} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ (Rysunek 9, krzywe dla punktów \bigcirc). Dalszy wzrost stężenia sperminy powodował wzrost współczynnika dyfuzji przy jednoczesnym spadku wartości PN (przedział stężeń: $0,5 < C_{\text{spermina}}/C_{\text{DNAbp}} < 1,1$), co wskazywało na zmianę konformacyjną pojedynczych plazmidów i sukcesywnego przechodzenia w stan globularny. Dla stężeń $C_{\text{spermina}}/C_{\text{DNAbp}} > 1,1$ obserwowano stabilny stan globularny a współczynnik dyfuzji wynosił $D_{10\text{kbp}} = 8,0 \times 10^{-12} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$.

W przypadku plazmidu (2,96 kbp) (*dane te nie są prezentowane*), wzrost współczynnika dyfuzji z $D_{2,96\text{kbp}} = 2,5 \times 10^{-12} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$, dla swobodnego DNA, i $D_{2,96\text{kbp}} = 9,2 \times 10^{-12} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$, dla jego skondensowanej formy, miał miejsce dla tych samych przedziałów stężeń sperminy jak w przypadku plazmidu 10 kbp. Uzyskane różnice między współczynnikami dyfuzji przed i po kondensacji były bezdyskusyjnie znaczące. W wyżej wymienionych zakresach stężeń sperminy funkcja autokorelacji była zadowalająco dopasowana przez model przyjmujący pojedynczą populację cząsteczek DNA. Gdy zastosowano model przyjmujący dwie odrębne populacje, uzyskane czasy dyfuzji t_{d1} i t_{d2} były identyczne. Dla przejściowego zakresu stężeń sperminy, dla których następuje proces rekonformacji plazmidów, czyli przedział $0,5 < C_{\text{spermina}}/C_{\text{DNAbp}} < 1,1$ uzyskane funkcje autokorelacji można było ponownie w zadowalający sposób dopasować za pomocą modelu jednoskładnikowego. Zastosowanie modelu dwuskładnikowego prowadziło do nieznaczącej poprawy dopasowania, ale w przeciwieństwie do omówionych powyżej przedziałów stężeń sperminy, dało dwie różne wartości czasów dyfuzji. Uzyskane wyniki wstępnie zinterpretowano w kategoriach obecności dwóch populacji. Otrzymane wartości dwóch stałych dyfuzji prawdopodobnie odzwierciedlają współistnienie wydłużonych i globularnych form plazmidów. Parametry klasycznych pomiarów FCS, takie jak zmiany czasu dyfuzji (t_D) /współczynnika dyfuzji (D), liczby cząstek (PN) oraz zmian natężenia fluorescencji (CR) nie dały jasnej odpowiedzi na istnienie tych dwu populacji. Problem ten dopiero wtedy udało się zadowalająco wyjaśnić, gdy w tym celu wykorzystano czasowo-rozdzielczą spektroskopię korelacji fluorescencji (TCSPC-FCS) oraz spektroskopię korelacji czasu życia fluorescencji (FLCS), uwzględniając w dyskusji charakterystykę zmian czasu życia fluorescencji (Humpolícková, Stepánek, et al., 2008).



Szczegółowa interpretacja zmian czasu życia fluorescencji w trakcie procesu kondensacji DNA jest omówiona w rozdziale 2.4.

2.2. *Kationowy związek amfifilowy – bromek heksadecylotrimetylo amonowy (HTAB)*

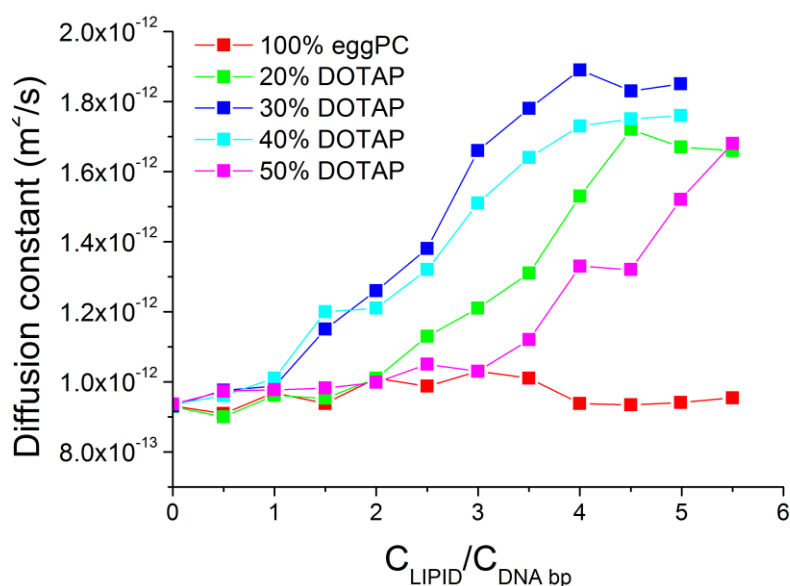
Oddziaływania między DNA i kationowymi środkami powierzchniowo czynnymi od dawna cieszą się dużym zainteresowaniem nauk biomedycznych i są przedmiotem wielu badań (Ainalem et al., 2014; Grueso, Cerrillos, Hidalgo, & Lopez-Cornejo, 2012; Dias, Lindman, & Miguel, 2001; Dias, Innerlohinger, Glatter, Miguel, & Lindman, 2005; Gaweda et al., 2008). Część polarna większości surfaktantów kationowych jest jednowartościowa, co w konsekwencji powoduje, że pojedyncze cząsteczki tych związków nie są w stanie spowodować kondensacji DNA. Jednak ze względu na ich własności amfifilowe, surfaktanty same tworzą kompleksy w pobliżu cząsteczek DNA, co z kolei prowadzi do kondensacji DNA (Cheng & Ran, 2014). W badaniach układu: kationowy związek amfifilowy-DNA, wykorzystałam bromek heksadecylotrimetylo amonowy (HTAB) oraz dwa, wcześniej już wspomniane, plazmidy DNA: pBluescript SKt (2,96 kbp) oraz plazmid pHbApr-1-neo (10 kbp). Plazmidy były znakowane jodkiem propidyny oraz bromkiem etydyny (Kral, Langner, et al., 2002; Kral, Hof, Jurkiewicz, et al., 2002). Dla stężenia $C_{HTAB}/C_{DNA} < 0,5$ współczynnik dyfuzji plazmidu 10kbp wynosił $D_{10kbp} = 0,96 \times 10^{-13} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$. Dla stężeń $C_{HTAB}/C_{DNA} > 0,5$ współczynnik dyfuzji rósł, odzwierciedlając zmniejszanie się rozmiarów hydrodynamicznych plazmidu, ostatecznie osiągając wartość $D_{10kbp} = 4,5 \times 10^{-13} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ dla stężenia $C_{HTAB}/C_{DNA} \approx 1$ (Rysunek 9, krzywe dla punktów ■, plazmid 10kbp). W przypadku plazmidu (2,96 kbp) (dane te nie są prezentowane na wykresie), wzrost współczynnika dyfuzji z $D_{2,96kbp} = 2,5 \times 10^{-12} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$, dla swobodnego DNA, i $D_{2,96kbp} = 8,0 \times 10^{-12} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$, dla jego skondensowanej formy, miał miejsce dla tych samych przedziałów stężeń związku HTAB jak w przypadku plazmidu 10 kbp. Zależność współczynnika dyfuzji od stężenia HTAB miała dla obu plazmidów przebieg sigmoidalny, co wskazuje na wysoką kooperatywność procesu kondensacji. Jednocześnie liczba obserwowanych cząsteczek (PN) zmniejszała się stale wraz ze wzrostem stężenia środka związku HTAB. Oznaczało to, że ewentualna dysocjacja znacznika fluorescencyjnego nie koreluje dobrze z kondensacją DNA, wskazaną przez rosnący współczynnik dyfuzji. Liczba cząstek posiadających wykrywalną fluorescencję zmniejszała się pomimo faktu, że współczynnik dyfuzji pozostawał stały i podążał za malejącą intensywnością fluorescencji. Interpretacja uzyskanych wyników nie była jednoznaczna w porównaniu z wynikami uzyskanymi dla sperminy (akapit 2.1) gdzie istniała bardzo dobra korelacja między PN , charakterystyką zmian CR i współczynnikiem dyfuzji. Wiadomo, że kationowy związek jest znacznie słabszym związkiem kondensującym niż spermina, zatem HTAB oddziałuje inaczej z DNA (Gani, Chattoraj, & Mukherjee, 1999). Rutynowo zdolność związku do kondensacji DNA była oceniana na podstawie stężenia wymaganego do zakończenia procesu (odzwierciedlanego przez zmniejszającą się fluorescencję) (Geall & Blagbrough, 2000). Jednakże takie pomiary nie uwzględniają innych czynników, takich jak możliwa interakcja samego znacznika fluorescencyjnego. Sytuacja jest jeszcze bardziej skomplikowana, ponieważ zastosowane plazmidy nie tworzą jednorodnej próbki już na starcie. Naturalnie występują dwie różne konformacje plazmidu: super-skręcony (*supercoiled*) i zrelaksowany (*relaxed*) (Kral, Widerak, et al., 2005). Gdy związek silnie oddziałuje z DNA, jak to miało miejsce w przypadku sperminy,

różnice konformacyjne prawdopodobnie będą miały bardzo ograniczony wpływ na sam proces kondensacji. Jednakże, gdy stosuje się słaby związek kondensujący, początkowe różnice konformacyjne DNA mogą stać się istotne. Prezentowane dane można wyjaśnić zakładając, że próbka składa się z dwóch populacji plazmidów, które oddziałują z cząsteczkami HTAB w różny sposób. Fakt, że intensywność fluorescencji zmniejsza się tylko o połowę, może oznaczać znaczny udział wolnego znacznika w całkowitej intensywności i zwiększoną fluorescencję pochodzącą z jeszcze nieskondensowanego plazmidu. Różnice poziomu kondensacji, dla różnych populacji plazmidów, mogą wyjaśniać wyraźną rozbieżność między liczbą cząstek (PN) a zależnością współczynnika dyfuzji od stężenia HTAB. Założyłam, że wzrost współczynnika dyfuzji odzwierciedla zachowanie tylko jednej frakcji plazmidu, podczas gdy druga kondensuje stopniowo wraz ze wzrostem stężenia kationowego związku. Prześladowano także kinetykę procesu kondensacji. Liczba cząstek i czas dyfuzji/współczynnik dyfuzji pozostają stałe, co potwierdza wniosek dotyczący kompletności kondensacji plazmidów. Zmienia się jedynie intensywność fluorescencji, co pokazuje, że dysocjacja znacznika trwa długo i wskazuje na jego uwięzienie w skondensowanych agregatach plazmid-HTAB. Spadkowi intensywności fluorescencji nie towarzyszy zmiana (PN) ani (D). Taki wynik był poparty dostępnymi danymi literaturowymi wskazującymi, że PrI_o/EtBr może pozostać w pułapce w obrębie zwiniętych cząsteczek DNA (Vardevanyan et al., 2003). Podsumowując, możemy precyzyjnie określić graniczne stężenie związku HTAB dla którego wartość współczynnika dyfuzji gwałtownie rośnie, co oznacza, że ma miejsce proces kondensacji. Zmiana intensywności fluorescencji (CR) oraz liczby cząstek (PN) w funkcji stężenia związku była inna dla HTAB i dla sperminy, co oznaczało, że metoda FCS wykrywa różnicę między różnymi czynnikami kondensującymi.

2.3. *Formulacje lipidowe; liposomy kationowe.*

Liposomy kationowe skompleksowane z DNA były i są szeroko stosowane jako niewirusowe wektory do wewnątrzkomórkowego dostarczania genów reporterowych lub terapeutycznych (de Lima et al., 1999). Związek między cechami kompleksów lipid-DNA ("lipopleksów") a ich sposobem oddziaływania z komórkami, wydajnością transferu genów i ekspresją genów jest ciągle przedmiotem intensywnych badań (Madeira, Loura, Aires-Barros, & Prieto, 2011). Motywacją zastosowania spektroskopii korelacji fluorescencji do badań lipopleksów było znalezienie korelacji pomiędzy własnościami lipidów a topologią agregatów zawierających DNA. Dalszym celem była próba określenia jednolitości próbek lipopleksów oraz skorelowanie ze skutecznością transfekcji. Gdy cząsteczka DNA oddziałuje z agregatem lipidowym, należy dokonać oceny szeregu czynników takich jak całkowita ilość lipidu kationowego, a także procentowy udział naładowanych lipidów w liposomach. Na podstawie wcześniejszych badań ustalono, że oligonukleotydy w pełni wiążą się z agregatami lipidowymi w obecności co najmniej 30% molowej zawartości lipidów kationowych (Jurkiewicz, Okruszek, Hof, & Langner, 2003). Celem moich badań było zbadanie czy podobną zależność można znaleźć dla plazmidowego DNA. W tym celu plazmid pHbApr-1-neo (10kbp, długość konturu 3,4 μ m), znakowany PicoGreen[®], miareczkowano liposomami o ustalonych rozmiarach, ale o zróżnicowanej frakcji lipidu kationowego. Liposomy były formowane z fosfatydylocholinyl jajecznej (egg PC) i różniły się udziałem procentowym lipidu kationowego N-(1-(2,3-

dioleoyloxy) propyl)-N,N,N-trimethyl ammonium methylsulfate (DOTAP) (Kral et al., 2006). Miareczkowanie plazmidu liposomami neutralnymi (bez udziału DOTAP) nie skutkowało zmianą współczynnika dyfuzji w całym badanym zakresie stosowanego stężenia lipidów ($C_{\text{eggPC}}/C_{\text{DNA bp}}$ 0-3,2) (Rysunek 10). Podobne wyniki uzyskano, gdy ilość kationowego lipidu w liposomach była mniejsza niż 15mol% i, co zaskakujące, dla stężeń powyżej 60mol%. W pierwszym przypadku gęstość ładunku na powierzchni lipidów jest zbyt niska, aby zapewnić trwale wiązanie dużych cząsteczek DNA. Pozorny brak oddziaływania w przypadku wyższych stężeń DOTAP, może być wynikiem udziału innych czynników, takich jak agregacja silnie naładowanych liposomów z dużym, pozytywnie naładowanym plazmidem. Podobny efekt zaobserwowano w przypadku małych oligonukleotydów (Jurkiewicz et al., 2003). W zakresie pośrednich stężeń lipidu kationowego ($20\text{mol}\% < C_{\text{egg PC}}/C_{\text{DNA bp}} < 50\text{mol}\%$) istnieje wyraźna zależność współczynnika dyfuzji DNA od stężenia lipidów. W przypadku kationowej frakcji lipidowej poniżej 30mol% ilość liposomów potrzebna do zwiększenia współczynnika dyfuzji agregatów maleje nieznacznie wraz z rosnącą frakcją DOTAP. Wyniki te pokazują, że kondensacja plazmidu zależy raczej od gęstości dodatniego ładunku liposomów, a nie od ilości kationowego lipidu w próbce. Obserwowana maksymalna efektywność asocjacji w przypadku 30 mol% DOTAP (tj. minimalne stężenie lipidów kationowych, dające maksymalny wzrost współczynnika dyfuzji) może wynikać z nakładania się rosnącej efektywności kondensacji plazmidu i wywołanej nadmiarem ładunku agregacji liposomów, spowodowanej nadmiarem ładunku kationowego (Kennedy, Pozharski, Rakhmanova, & Macdonald, 2000). Uzyskane wyniki wskazują, że metoda FCS dostarcza informacji dotyczących tworzenia się agregatów lipidowych z plazmidowym DNA. Obserwowane profile różnią się jednak w badanym zakresie stężeń, wskazując na tworzenie agregatów o różnych rozmiarach, ale same w sobie nie są wystarczające, by móc precyzyjnie scharakteryzować ich topologię i jednolitość. Stosując metodę FCS do badań układów DNA-lipid, podobnie jak w przypadku poliaminy i kationowego



Rysunek 10. Zależność współczynnika dyfuzji od stężenia $C_{\text{lipid}}/C_{\text{DNA bp}}$, dla plazmidu pHBAPr-1-neo (10 kbp; kontur długość, 3,4 μm). Plazmid był oznakowany jodkiem propidyny. Stosunek $C_{\text{Prtd}}/C_{\text{DNA bp}} = 0,04$.

związku amfifilowego, należy mieć świadomość, że rodzaj i ilość znacznika fluorescencyjnego może przyczyniać się do zmian konformacji DNA i/lub wpływać na proces tworzenia supramolekuł.

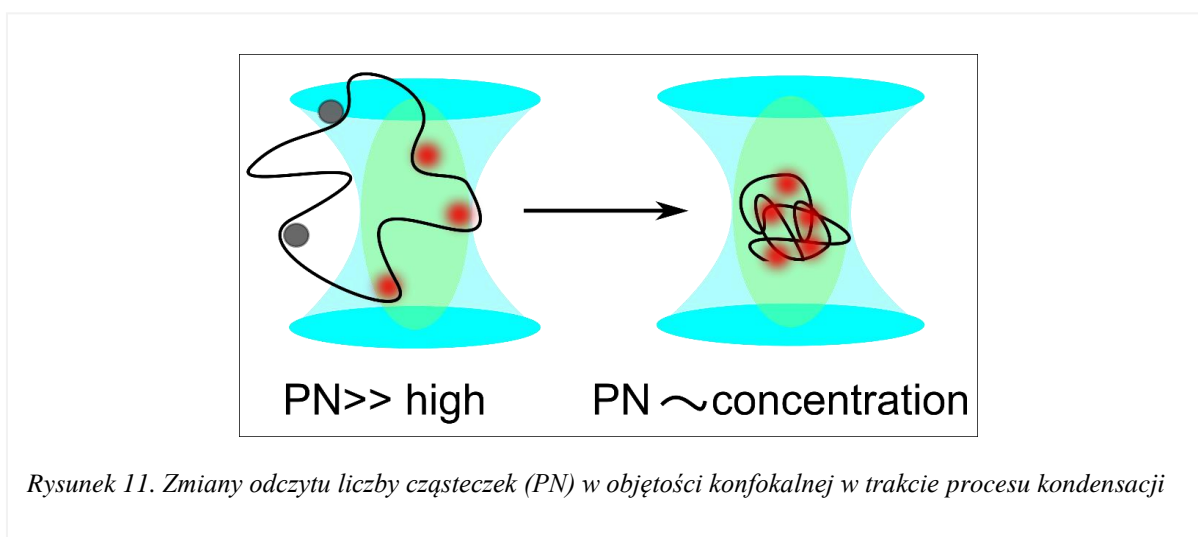
Wnioski dotyczące rodzaju czynników kondensujących.

- Dla każdego z badanych przeze mnie związków, bądź układu związków (liposomy), powodujących zmiany konformacyjne DNA, udało ustalić czy miał miejsce proces zupełnej kondensacji DNA, czy też nastąpiła częściowa lub żadna zmiana konformacji badanego plazmidu.
- Zmiany czasu dyfuzji(t_d) /współczynnika dyfuzji (D), liczby cząstek (PN) oraz czasu życia fluorescencji były precyzyjnymi indykatorami rekonformacji DNA.
- Jeśli miał miejsce proces całkowitej kondensacji, precyzyjnie udało się określić graniczne stężenia związków, dla których obserwowano gwałtowny wzrost współczynnika dyfuzji (lub spadek czasu dyfuzji). Jednocześnie wartości PN oraz czasu życia fluorescencji gwałtownie maleją, jeśli mamy do czynienia z procesem zupełnego upakowania plazmidu.
- Zmiany intensywności fluorescencji (CR), PN , czasu życia oraz t_d/D w funkcji stężenia były różne dla każdego z badanych związków/układów związków, co oznaczało, że metody SMF są w stanie wykryć różnice między różnymi czynnikami kondensującymi.

3. Punktowe wykrywanie molekuł w interpretacji kondensacji DNA.

Liczba cząstek, PN , jest bezpośrednim parametrem uzyskiwanym w trakcie klasycznych pomiarów FCS, odpowiadającym liczbie „zdarzeń” fluorescencyjnych w obszarze objętości konfokalnej. W przedstawionych badaniach parametr PN powinien zatem być proporcjonalny do stężenia cząsteczek DNA. Jak już wspomniałam, u podstaw klasycznej metody FCS leży założenie, że dyfundujące cząsteczki są cząsteczkami punktowymi (*point-like molecule*). Oznacza to, że rozmiary badanych cząsteczek są znacznie mniejsze niż wymiary liniowe objętości konfokalnej. Istnieje jednak wiele potencjalnych zastosowań FCS, w tym badania przedstawione przeze mnie, w których wielkość cząstek jest porównywalna z objętością konfokalną gdzie przybliżenie cząstek punktowych nie jest spełnione. Dodatkowo, cząsteczki porównywalne z rozmiarami objętości konfokalnej są zazwyczaj wielokrotnie znakowane, co skutkuje wieloma „zdarzeniami” fluorescencyjnymi, pochodzącymi *de facto* od tej samej cząsteczki (Bahns, Liu, & Chen, 2004). W przedstawionych przeze mnie pomiarach FCS, TCSPC-FCS oraz FLCS cząsteczki DNA były wielokrotnie znakowane, a ich wielkość była porównywalna z objętością konfokalną. Dodatkowym utrudnieniem był fakt, że kształt funkcji autokorelacji nie różni się na tyle, aby odróżnić cząstki o tych samych rozmiarach, ale jest znacząco różny dla różnych rozkładów znacznika w obrębie cząsteczki (Wu et al., 2008). W konsekwencji w prawie wszystkich uzyskanych pomiarach miało miejsce pozorne oszacowanie (zazwyczaj zawyżone) liczby cząstek (PN), a co za tym idzie i stężenia (C). Przekształcając równanie 14 uzyskujemy równanie określające liczbę cząstek PN ; $PN = C \times V \times N_A$, gdzie C – molowe stężenie badanych cząsteczek, V – objętość konfokalna i N_A – liczba Avogadro. Stosując to równanie dla stężeń cząsteczek DNA stosowanych w prezentowanych przeze mnie wynikach, które były utrzymywane na stałym poziomie 1 nM, teoretyczne PN , które należało

uzyskać, wynosiło 0,7. Wartości PN dla nieskondensowanych plazmidów, w zależności od rozmiaru plazmidu, były zawsze ok. 5-10-krotnie zawyżone, zatem różniły się znacznie od rzeczywistego stężenia. Dla skondensowanych lub podlegających transformacji plazmidów, zmieniająca się wartość PN była dobrym indykatorem zmian konformacyjnych w obrębie cząsteczki DNA. Dla stężeń związków kondensujących, gdzie jednocześnie obserwowany był dramatyczny spadek czasu dyfuzji, wartości PN wynosiły $0,7 \pm 0,1$, spełniając tym samym założenia metod SMF. Efektywny proces kondensacji cząsteczki DNA to upakowywanie jej do rozmiarów cząsteczki punktowej (*Rysunek 11*). Zmiany parametru PN , obok zmian czasu dyfuzji, okazały się jednym z najdokładniejszych parametrów klasycznego FCS, podając informację ilościową o gęstości upakowania agregatów DNA-kondenser (Kral, Langner, et al., 2002; Kral, Benda, Hof, & Langner, 2005; Kral, Hof, Jurkiewicz, et al., 2002; Kral, Hof, & Langner, 2002; Kral et al., 2006; Kral, Widerak, et al., 2005). Wynik ten był i jest zgodny z innymi fizycznymi badaniami, dotyczącymi wielkości całkowicie skondensowanych cząsteczek DNA na poziomie nanoskali (Conwell, Vilfan, & Hud, 2003; Motta et al., 2013; Shokeen, Issa, & Mukhopadhyay, 2017).

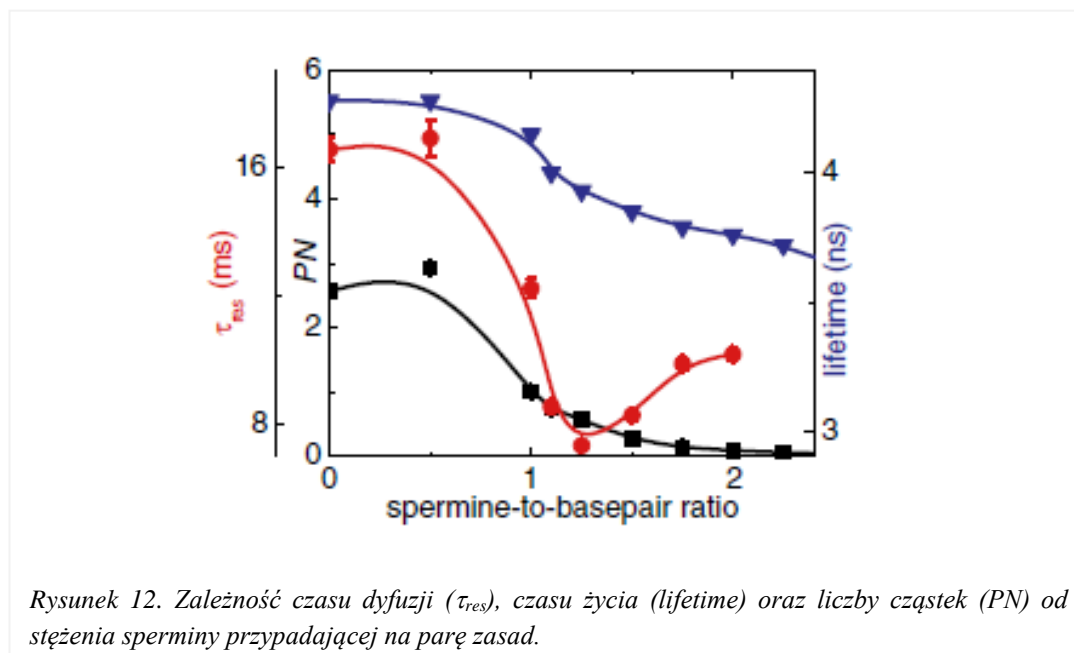


Wnioski dotyczące punktowego wykrywania cząsteczek w procesie kondensacji DNA.

W przedstawionych przeze mnie pomiarach FCS, TCSPC-FCS oraz FLCS, cząsteczki DNA były wielokrotnie znakowane, a ich wielkość była porównywalna z objętością konfokalną. Badane cząsteczki plazmidowego DNA, ze względu na swoje rozmiary, nie spełniały założenia cząstek punktowych (*point-like-molecules*). Wartości PN dla nieskondensowanych plazmidów, w zależności od rozmiaru plazmidu, były zawsze zawyżone. W przypadku efektywnej kondensacji plazmidu, uzyskane wartości PN były w pełni zgodne z teoretycznymi założeniami metod SMF. W przedstawionych wynikach badań, zmiany wartości PN odnosiły się raczej do gęstości upakowania plazmidowego DNA niż do rzeczywistych stężeń. Co więcej śledząc zmiany parametru PN , można uzyskać bezpośrednią informację o jakości związku kondensującego.

4. Zmiany czasu życia fluorescencji w interpretacji kondensacji DNA.

Badania FCS dotyczące miareczkowania substancjami kondensującymi, dostarczyły informacji o zmianach w zachowaniu dyfuzyjnym w trakcie zmian konformacyjnych plazmidowego DNA. Zmianom konformacyjnym całej cząsteczki DNA mogą towarzyszyć zmiany w bezpośrednim otoczeniu chromoforu znacznika, co może mieć odzwierciedlenie w zmianach jego czasu życia fluorescencji. Jednoczesne monitorowanie zmian czasu życia fluorescencji znacznika oraz zmian dyfuzyjnych plazmidu było możliwe dzięki zastosowaniu czasowo-rozdzielczej spektroskopii fluorescencji (TCSPC-FCS).

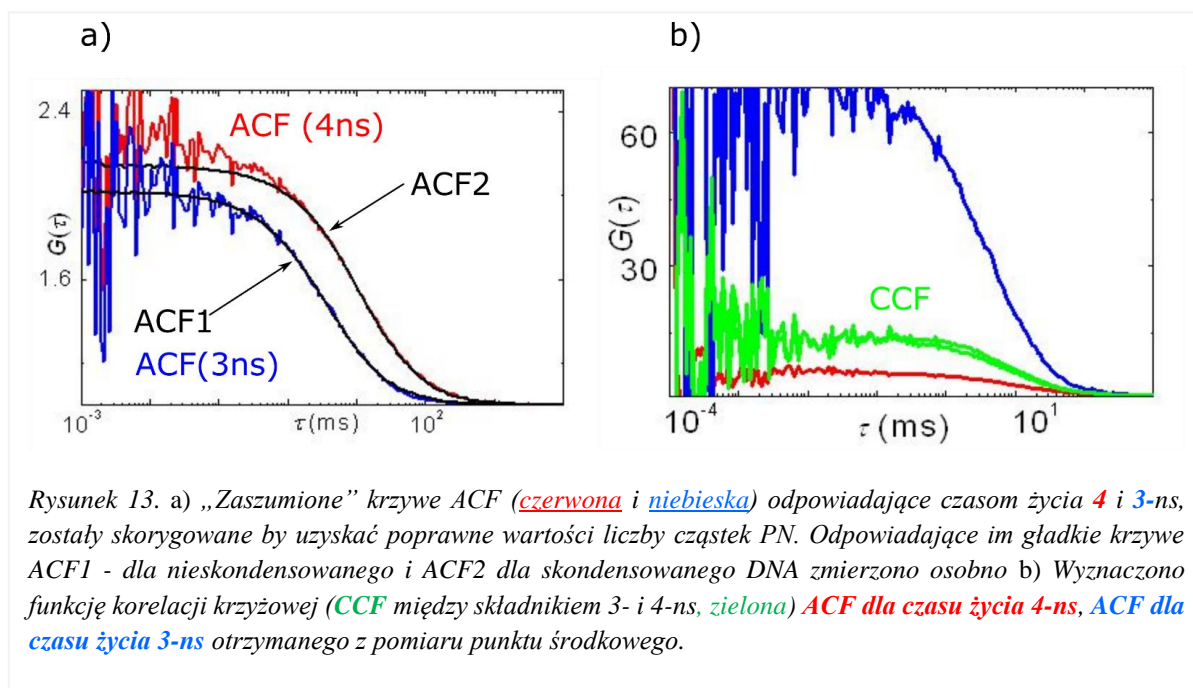


Czas życia fluorescencji dał szczegółowy wgląd w mechanizm i ramy czasowe procesu kondensacji (Humpolícková, Benda, et al., 2008; Humpolícková, Stepánek, et al., 2008). Badania te wykonano dla plazmidu 10kbp znakowanego PicoGreen[®] (PG). I tak dla stężeń $C_{spermina}/C_{DNAbp}$ bliskich 1,0 obserwowano spadek wartości czasu: dyfuzji (τ_{res}), liczby cząstek PN i czasu życia fluorescencji (Rysunek 12). Zmniejszająca się wartość PN pokazuje, że cząsteczka DNA przypomina sztywną, punktową cząsteczkę o rozmiarach wiele mniejszych niż wielkość obszaru konfokalnego (jak na rysunku 11). Zmiana czasu życia fluorescencji odnosi się do zmienionego mikrośrodowiska PicoGreen[®] w trakcie rekonformacji cząsteczki plazmidu. W wyniku akumulacji skondensowane cząsteczki DNA zaczynają agregować, co powoduje wzrost czasów dyfuzji i dalsze obniżanie PN . Czas życia fluorescencji zmienia się już w niewielkim stopniu, ponieważ agregacja nie zmienia bezpośredniego mikrośrodowiska PG. Podsumowując, wszystkie trzy parametry (t_{res} , PN i czas życia) opisują proces kondensacji DNA, przy czym zmiany czasu życia fluorescencji odpowiadają zmianom gęstości upakowania plazmidu. Pełniejszy obraz samego procesu kondensacji plazmidowego DNA miareczkowanego sperminą, udało się uzyskać dzięki zastosowaniu spektroskopii korelacji czasu życia fluorescencji (FLCS). Metoda FLCS pozwoliła odpowiedzieć na pytanie, czy proces kondensacji w obecności sperminy zachodzi w sposób ciągły, czy dyskretny. Tym samym udało się przedstawić nową interpretację dotychczas nierozwiązanego problemu.

Badania dotyczyły przejściowych stężeń sperminy ($0,8 < C_{\text{spermina}}/C_{\text{DNAbp}} < 1,1$), czyli stężeń zanim nastąpi całkowity stan równowagi, tzn. wszystkie cząsteczki ulegną kondensacji. Stan przejściowy jest liniową kombinacją funkcji autokorelacyjnych (ACF) skondensowanego i nieskondensowanego DNA.

Założono dwa scenariusze:

- 1) Upakowywanie DNA jest procesem ciągłym: wszystkie cząsteczki DNA wykazują obecność skondensowanych regionów, w obrębie których obserwujemy spadek czasu życia fluorescencji PG, tj. DNA zawiera zarówno 4,2-ns (4-ns w skrócie) i 3,5-ns (3-ns w skrócie) czasy życia znacznika. W tym przypadku czas dyfuzji komponentu o czasie życia 4-ns jest krótszym niż czas dyfuzji wolnego DNA i na odwrót, czas dyfuzji 3-ns składnika czasu życia, jest większy niż dla całkowicie skondensowanego DNA. Pojawiają się funkcja korelacji krzyżowej stanów pośrednich (*non-one CCF*).
- 2) Upakowywanie DNA jest dyskretnym procesem „wszystko albo nic”, tzn. cząsteczki DNA współistnieją w nieskondensowanej i skondensowanej formie. W tym przypadku czas dyfuzji komponentu 4-ns czasu życia pasuje do czasu dyfuzji wolnego DNA, a czas dyfuzji 3-ns składowej czasu życia do czasu dyfuzji skondensowanego DNA. Nie ma możliwości wyznaczenia korelacji krzyżowej.



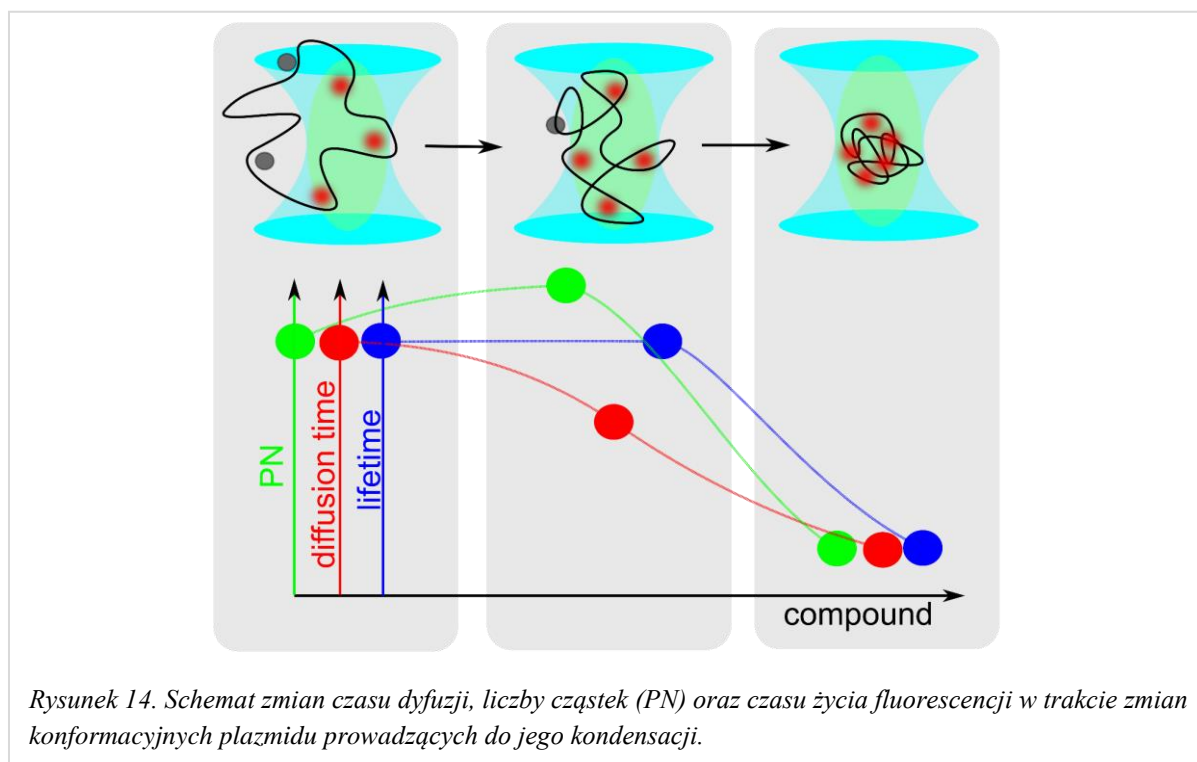
Porównanie krzywych autokorelacyjnych (ACF) przedstawionych na rysunku 13 pokazuje, że ma miejsce drugi scenariusz, tj. zagęszczenie jest przejściem dyskretnym. Jednakże istnienie krzywej autokorelacji krzyżowej (CCF) sugeruje, że oprócz większości cząsteczek znajdujących się w jednym ze stanów, występuje ułamek cząsteczek zawierających zarówno 3-ns jak i 4-ns składniki czasu życia. W oparciu o fakt, że amplitudy CCF są pomiędzy amplitudami krzywych ACF, można wywnioskować, że istnieje nie tylko statyczna koegzystencja domen, ale dynamiczne przejście równowagowe między nimi. Reasumując, metoda FCS, TCSPC-FCS są dobrymi narzędziami do badania procesu upakowywania pojedynczych cząsteczek DNA. Oba podejścia wykazują istotne zmiany parametrów odczytu,

odpowiadających zmianie konformacji cząsteczek DNA. Niemniej jednak, ani FCS ani TCSPC-FCS nie dają jednak dokładniejszego wglądu w mechanizm kondensacji, tzn. nie dają odpowiedzi czy zagęszczanie jest procesem ciągłym czy dyskretnym. Dzięki zastosowaniu metody FLCS udało się uzyskać odpowiedź i stwierdzono, że upakowanie plazmidu DNA przebiega wg schematu „wszystko albo nic”, czyli jest procesem dyskretnym. Co więcej istnienie krzywej korelacji krzyżowej sugeruje nie tylko statyczną koegzystencję domen w obrębie cząsteczek, ale także równowagę pomiędzy upakowanymi i nierozwiniętymi cząsteczkami DNA. FLCS pokazał również, że wcześniej diskutowany związek HTAB skutkuje stopniowym zagęszczaniem cząsteczki DNA.

Wnioski dotyczące uwzględnienia czasu życia fluorescencji w interpretacji kondensacji DNA.

W przypadku pierwszych badań dotyczących procesu kondensacji, gdzie znacznikami były EtBr/PrIo, nie miałam możliwości śledzenia zmian czasu życia fluorescencji. Badania z wykorzystaniem zarówno metody TCSPC-FCS oraz FLCS dotyczyły układów gdzie znacznikiem był PicoGreen® (PG). Czas życia fluorescencji dla PG ulegał zmianie wraz ze zmianą konformacji badanych plazmidów. Znacząca zmiana czasu życia (z 4,2 ns na ok 3,2 ns) odnosiła się do zmienionego mikrośrodowiska chromoforu znacznika PG w obrębie cząsteczki plazmidu podlegającej ścisłemu upakowaniu.

Czas życia fluorescencji PG nie zmieniał, jeśli cząsteczka plazmidu ulegała globalnemu pofaldowaniu bez obecności silnie upakowanych domen. Podobnie, proces agregacji już skondensowanych cząsteczek nie powodował dalszych zmian czasu życia PG, ponieważ nie zmieniło się bezpośrednio mikrośrodowisko PG. Podsumowując, wszystkie trzy parametry (t_d , PN i czas życia) opisują proces kondensacji DNA a zmiany czasu życia fluorescencji odpowiadają jakości upakowania plazmidu (Rysunek 14).



5. Zastosowanie metod SMF w badaniach układów DNA-nowo syntetyzowane związki.

Jak już wspomniałam wcześniej, wyniki badań przedstawione w pracach **H1-H6** wchodzących w skład osiągnięcia naukowego, **po raz pierwszy** interpretują proces kondensacji plazmidowego DNA z punktu widzenia metod fluorescencji pojedynczych cząsteczek, takich jak: FCS, TCSPC-FCS oraz FLCS (Kral, Langner, et al., 2002; Kral, Hof, Jurkiewicz, & Langner, 2002; Kral, Hof, & Langner, 2002; Kral, Langner, & Hof, 2006; Kral, Widerak, Langner, & Hof, 2005; Humpolícková et al., 2008). Pionierskie wykorzystanie tych metod oraz uzyskane wyniki pozwoliły na praktyczne ich zastosowanie w badaniach oddziaływań nowosyntetyzowanych związków i/lub układów związków, mającymi lub mogącymi mieć zastosowanie w niewirusowej terapii genowej (NVGT) (prace **H7-H10**) (Kral et al., 2010; Breton et al., 2011; Pembouong et al., 2011; Misiak et al., 2013). W wyniku współpracy nawiązanej z dr Nathalie Mignet (zespół „Nanowektory w terapii celowanej i obrazowania molekularnego”, Unité de Technologies Chimiques et Biologiques pour la Santé (UTCBS), Paris) rozpoczęłam badania oddziaływania lipidowych pochodnych tiomocznika (LPT) z plazmidowym DNA. Niekationowe lipidy na bazie mocznika mogą stanowić alternatywę dla dotychczas stosowanych lipidów kationowych. Wysoka wydajność transfekcji z wykorzystaniem związków LPT skłoniła mnie do zbadania ich własności biofizycznych, w szczególności, w jaki sposób lipidy tiomocznikowe wchodzą w interakcję z DNA. Przeanalizowano różne długości łańcucha lipidowego, typy łącznika i struktury części „głowy”, by móc zoptymalizować własności formulacji i transfekcji. Wiadomo było, że tiomocznik tworzy silne wiązania wodorowe z anionami, a zwłaszcza z grupami fosforanowymi DNA (Takemoto, 2005). Testowano trzy lipidy o rozgałęzionej strukturze „głowy”, składającej się z pochodnych tiomocznika (tiomocznik tetraolu, tiomocznik tetraolu z dodatkowym ugrupowaniem izopropylenowym oraz tiomocznik metylu). Dodatkowo, badane lipidy różniły się długością łańcuchów lipidowych C₁₀, C₁₂ i C₁₄. Wyniki badań uzyskane dzięki metodzie FCS wskazywały na silne oddziaływanie między LPTs a DNA. Po pierwsze zauważono, że wraz ze wzrostem stosunku $C_{LPT}/C_{DNA\ phosphate\ group}$ zmniejszał się zarówno czas dyfuzji DNA jak i wartość liczby cząstek (PN), co oznaczało upakowywanie się cząsteczki plazmidu w nanocząstkach tiomocznika. Zmniejszający się czas dyfuzji, był także funkcją długości łańcucha węglowodorowego łańcucha lipidowego. Zmniejszająca się długość części hydrofobowej LPT, prowadziła do najściślejszego upakowania supramolekuł LPT/DNA. Wyniki FCS były zgodne z wcześniejszymi doniesieniami dotyczącymi własności transfekcyjnych tej rodziny lipopolytomerów, gdzie wydajność transfekcji rosła, gdy długość łańcucha lipidowego zmniejszała się. Wyniki FCS dostarczyły także bardziej szczegółowych informacji o oddziaływaniach LPT-DNA w porównaniu z dotychczas stosowanymi testami intensywności fluorescencji, takimi jak elektroforeza żelowa. Na podstawie wyników FCS stwierdzono, że wartości stężeń, dla których obserwowano kondensację DNA w wyniku oddziaływań z LPT, okazały się znacznie niższe. Interakcje pomiędzy LPT a DNA, skutkujące kondensacją plazmidu, obserwowano już dla $C_{LPT}/C_{DNA\ phosphate\ group} = 1$, a osiągały plateau dla $C_{LPT}/C_{DNA\ phosphate\ group} = 4$. Stwierdzono także, że bardziej wydajnym lipidem do wewnątrzkomórkowego transferu genów jest ten oparty na tiomoczniku tetraolu, powodując najsilniejsze upakowanie supracząsteczki LPT/DNA (Kral et al., 2010).

Kontynuacją badań z grupą lipidów tiomocznikowych były badania dotyczące amfifilowych związków lipopolytiomocznikowych. Różnica w budowie dotyczyła ich części hydrofilowej, była to albo obojętna „głowa” tiomocznika lub „głowa” będąca mieszaniną trzech pochodnych funkcyjnych tiomocznika: tiomocznika samego, iminotiolu i naładowanego iminotiolu. Badania z wykorzystaniem metody FCS wykazały, że różnice w strukturze chemicznej związków amfifilowych wpływały na siłę upakowania plazmidu, co znalazło potwierdzenie w znaczących różnicach zmian czasu dyfuzji dla poszczególnych układów lipid-DNA. Wyniki FCS potwierdzały, że powstałe struktury różnią się zarówno wielkością jak i polidispersyjnością w zależności od stosunku lipid/DNA. Wreszcie, wyniki transfekcji i internalizacji potwierdziły, że różnice w strukturze agregatów lipidowych w pełni wpływają na własności biologiczne związków lipopolytiomocznikowych. Lipid zawierający w mieszaninie trzy pochodne funkcyjne, był lepszym środkiem do transfekcji genów niż lipid, który zawiera tylko jedno ugrupowanie tiomocznika (Breton et al., 2011).

Metoda TCSPC-FCS okazała się także niezwykle przydatna w przypadku badań dotyczących oddziaływania kopolimerów trójblokowych (poloksamerów) z plazmidowym DNA. Wcześniejsze badania wykazały, że obecność poloksamerów usprawnia przenoszenie genów w obszar tkanki mięśniowej (Lemieux et al., 2000), a zatem współpodawanie polimerów i DNA wydawało się kluczowe dla uzyskania tego efektu. Co więcej wątpliwym było, czy zachodzi jakakolwiek interakcja między polimerami a DNA. Wyniki badań TCSPC-FCS pokazały, że w obecności kopolimeru triblokowego L64 zarówno czas dyfuzji pojedynczej cząsteczki DNA jak i czas życia PicoGreen[®] nie zmieniały się. Oznaczało to, że nie było zauważalnych oddziaływań między cząsteczką DNA a L64, które mogłyby zmienić dynamikę plazmidu. Zmiana konformacji indukowana obecnością L64 powodowałaby, że kompleksy L64/DNA byłyby mniej ograniczone rotacyjnie niż pojedyncza, swobodna cząsteczka DNA, a znacznik PicoGreen[®] wykazywałoby zmianę czasu życia fluorescencji. Brak znaczących zmian w czasie życia PicoGreen[®] oznaczał, że obecność kopolimeru L64, nie powodowała zmian konformacyjnych w obrębie cząsteczki DNA (Pembouong et al., 2011). Metoda TCSPC-FCS została także zastosowana w przypadku nowo syntetyzowanych związków z grupy powierzchniowo-czynnych (bromki 2- (alkilodimetyloamonio) etyloglukonamid, oznaczone jako C_nGAB, n = 10, 12, 14 i 16). Badania miały na celu ustalenie ich potencjału jako środków NVGT w układach o zmniejszonej toksyczności (*green chemistry*). Moje badania w tym projekcie dotyczyły określenia zdolności związków C_nGAB do interakcji z cząsteczkami plazmidowego DNA. W szczególności należało określić zdolność związków C_nGAB do pełnej kondensacji DNA a także zbadanie wpływu długości łańcucha alkilowego na interakcje C_nGAB-DNA. Wyniki badań eksperymentalnie uzyskanych parametrów (czas dyfuzji, liczba cząstek, PN oraz czas życia fluorescencji) pokazały, że C₁₂GAB, C₁₄GAB oraz C₁₆GAB są w stanie w pełni skondensować DNA. Co nie miało miejsca, nawet dla wysokich stężeń, w przypadku związku C₁₀GAB. Uzyskane dane wskazują, że niskie stężenia C₁₀GAB prowadzą do rekonformacji plazmidu, która ma inny charakter niż proces kondensacji. Dalszy wzrost stężenia nie powoduje przekształcenia tego supramolekularnego układu w skondensowaną nanocząstkę DNA. Ustalono następnie szereg zdolności interakcji związków C_nGAB z DNA, który wyglądał następująco: C₁₆GAB > C₁₄GAB > C₁₂GAB. Co ciekawe związek C₁₂GAB, przy niższych stężeniach (przed kondensacją DNA) indukował zmiany konformacyjne DNA,

podobne do tych obserwowanych dla związku dla C₁₀GAB. Wnioskowano, że C₁₆GAB i C₁₄GAB oddziałując z cząsteczką DNA, podlegają silnemu wiązaniu kooperacyjnemu ze względu na hydrofobowe przyciąganie łańcuchów alkilowych surfaktantów. Lokalny wzrost stężenia cząsteczek związków amfifilowych powodował inwersję ładunku segmentów DNA i prowadził do częściowego zagęszczenia plazmidu. Innymi słowy, gdy liczba sąsiednich zneutralizowanych segmentów była wystarczająca, oddziaływanie hydrofobowe łańcuchów alkilowych powodują lokalne upakowywanie się zneutralizowanej domeny niezależnie od reszty cząsteczki DNA. Wraz ze wzrostem stężenia C₁₆GAB i C₁₄GAB coraz więcej domen ulega zwinięciu, a ostatecznie cała cząsteczka DNA ulega kondensacji. Reasumując, uzyskane wyniki pokazały, że zdolność związków C_nGAB do kondensacji plazmidowego DNA wzrasta wykładniczo wraz ze wzrostem długości łańcucha alkilowego. Najefektywniejszym związkiem był C₁₆GAB, dla którego stężenie $C_{C_{16}GAB}/C_{DNA \text{ bp}} = 1$ jest wystarczające, aby całkowicie skondensować cząsteczkę plazmidu. Związek ten jest dość skuteczny prawdopodobnie dzięki dużej części polarnej oraz odpowiedniej długości części hydrofobowej. Podczas oddziaływań z plazmidem oba te elementy mają znaczenie, część polarna prawie w pełni neutralizuje ujemny ładunek cząsteczki DNA, ale też prawdopodobnie częściowo oddziałuje z grupą hydrofilową DNA, podczas gdy długie łańcuchy hydrofobowe promują kooperatywne wiązanie się, powodując kondensację (Misiak et al., 2013).

6. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych.

6.1. Tematyka badań realizowanych przed uzyskaniem stopnia doktora.

Pracę naukową rozpoczęłam w listopadzie 1990 roku po uzyskaniu tytułu magistra fizyki, specjalność fizyka jądrowa, na Uniwersytecie Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie. W ramach współpracy pomagisterskiej z laboratorium Prof. Hałasa, w roku 1992 odbyłam dwutygodniowy staż naukowy w Tajlandii. Celem stażu była kolekcja próbek torfu do badań porównawczych z próbkami torfu z terenów Polski w celu ustalenia różnic składu izotopowego wynikającego z różnic klimatycznych. Jednakże w latach 1990-1994, zajmowałam się głównie badaniami oddziaływania nowo zsyntetyzowanych związków z grupy czwartorzędowych soli amoniowych (QAS) z modelowymi błonami lipidowymi. Celem było zaprojektowanie cząsteczek QAS, które mogą łączyć się z błonami biologicznymi bez ich niszczenia, oraz by ich część przeciwutleniająca znajdowała się na powierzchni błony membrany lipidowej lub ponad nią. Nowo syntetyzowane związki QAS, z co najmniej jednym długołańcuchowym podstawnikiem alkilowym, potencjalnie mogłyby oddziaływać z fosfolipidową częścią błon biologicznych, modyfikując lub zakłócając fizjologiczne procesy wolnorodnikowe, wykazując własności antyoksydacyjne. W tym celu przeprowadzone zostały badania wpływu wybranych związków QAS na własności transportowe, wytrzymałościowe modelowych błon oraz ich wpływ na hemolizę, w przypadku błon biologicznych. W badaniach wpływu związków z grupy QAS wykorzystywano małe liposomy jednowarstwowe (SUV), formowane metodą dializy. Uzyskana zależność czasowa procesu desorpcji jonów wapnia ⁴⁵Ca wskazywała na różnice w oddziaływaniu z modelową błoną liposomów, co prawdopodobnie było wynikiem różnic części polarnych badanych związków QAS. (Witek et al., 1994; Sarapuk et al., 1994). Przedmiotem moich kolejnych badań były związki z grupy kationowych związków amfifilowych. Badania

obejmowały w sumie cztery związki, z których dwa były nowo zsyntetyzowane w ramach współpracy z Instytutem Chemii Organicznej i Technologii Polimerowej Politechniki Wrocławskiej. Badano proces uwalniania jonów wapnia, wyznaczono stałe desorpcji, badano kinetykę procesu desorpcji oraz wykonano kwantowe obliczenia chemiczne mające na celu określenie mechanizmu oddziaływania związków z powierzchnią modelowych błon liposomów. Na podstawie uzyskanych wyników wnioskowano, że różnice w efektywności poszczególnych związków na procesie desorpcji wapnia wynikają nie tylko z wartości momentów dipolowych części polarnych, ale także z różnic wartości ładunków punktowych na niektórych atomach oraz ich własności sterycznych (Kuczera, Chojnacki, Kral, & Przystalski, 1996). Kolejną grupą związków mających znacznie biologiczne były badane przeze mnie związki „lizosomotropowe”. Substancjami lizosomotropowymi określa się związki chemiczne, mogące wnikać do komórki i gromadzić się w obszarach komórkowych o niskim pH, takich jak lizosomy komórek zwierzęcych, czy wakuole komórek roślinnych lub grzybowych. Badane przeze mnie związki były związane z poszukiwaniem nowych substancji biologicznie czynnych, charakteryzujących się z jednej strony zdolnością do wbudowywania się w błony biologiczne, z drugiej zaś do przenikania przez te błony i wnikania w kolejne przedziały komórkowe. Testy biologiczne prowadzono na komórkach modelowych drożdży piekarniczych *Saccharomyces cerevisiae*, erytrocytach oraz protoplastach drożdży w celu porównania układu erytrocyty-drożdże. Uzyskane wyniki pozwoliły na ustalenie zależności między strukturą badanych związków a ich aktywnością biologiczną (Lachowicz et al., 1996). W latach 1996-1999 kontynuowałam badania dotyczące oddziaływania wpływu amfifilowych związków kationowych na modelowe błony lipidowe. W szczególności badałam wpływ czterech związków, różniących się własnościami części polarnych. Badanymi związkami były: chlorek N-benzyl-N, N-dimetylo-N-tetradecyloamoniowy (BDTA), bromek N-metylo-N-tetradecylomorfoliny (MTM), chlorek N-metylo-N-dodecyloksymetylenomorfoliniowy (MDOM) i bromek N, N, N-trimetylo-N-cykloheksyloamoniowy (TMTA). Stałe kinetyczne procesu desorpcji jonów wapnia określono z wykorzystaniem metody trójprzedziałowej analizy radioizotopu wapnia. Dla wyżej wymienionych związków wykonano obliczenia struktury elektronowej oraz wyznaczono ładunki punktowe i momenty dipolowe cząsteczek za pomocą metod chemii kwantowej. Stwierdzono, że szybkość desorpcji wzrasta wraz ze wzrostem stężenia badanych związków, a relacje skuteczności poszczególnych związków przebiegała następująco: BDTA > MTM > TMTA > MDOM. W przypadku momentów dipolowych uzyskana sekwencja była nieco inna, a mianowicie: BDTA > MTM > MDOM > TMTA. Wnioskowano, że różnice w skuteczności działania związków w procesie desorpcji wapnia wynikają nie tylko z wartości momentów dipolowych ich części polarnych, ale także z wartości ładunków punktowych na niektórych atomach i ich własności sterycznych (Kuczera et al., 1996). Z uwagi na fakt, że środki powierzchniowo czynne oraz związki metaloorganiczne stanowiły i stanowią potencjalne zagrożenie dla środowiska, rozpoczęłam badania dotyczące wpływu obecności obu tych grup związków jednocześnie. Modelowe błony liposomów (SUV) modyfikowano kationowym surfaktantem, bromkiem trimetylo-dodecylo-amoniowym lub anionowym środkiem powierzchniowo czynnym dodecylo-sulfonianem sodu a następnie badano wpływ chlorku tripropylocyny na proces desorpcji wapnia (Ca^{2+}) i prazeodymu (Pr^{3+}). Uzyskane wyniki pozwoliły stwierdzić, że trimetylocyna, trietylocyna i tripropylocyna powodowały zwiększoną desorpcję jonów wapnia i prazeodymu z błon liposomowych przy

rosnącym stężeniu związków i długości łańcucha alkilowego. W obu badanych procesach kationowy środek powierzchniowo czynny powodował obniżenie skuteczności, a anionowy związek powierzchniowo czynny zapewniał większą skuteczność tripropylocyny. Obserwowany efekt można było wytłumaczyć zmianami ładunku powierzchniowego błony, indukowanymi przez związek powierzchniowo czynny i towarzyszącą zmianę współczynnika podziału organocyny. Uzyskane wyniki wskazywały na sumaryczne: ochronne lub szkodliwe działanie stosowanych surfaktantów (Kuczera, Gabrielska, Kral, & Przystalski, 1997; Przystalski et al., 1997). Powyższe wyniki sugerowały o modyfikacyjnym znaczeniu obecności mieszanin kationowych i anionowych związków amfifilowych we współdziałaniu z grupą związków metaloorganicznych. W konsekwencji, celem kolejnej pracy było określenie synergizmu i antagonizmu mieszanin kationowych związków amfifilowych. W badaniach wykorzystano chlorek N-benzyl-N, N-dimetylo-N-tetradecyloamoniowy (BDTA), N-benzyl-N, N-dimetylo-N- chlorek dodecyloamoniowy (BDDA), bromek N-metylo-N-tert-tetradecylo-morfoliniowy (MTM), bromek N, N, N-trimetylo-N-tetradecyloamoniowy (TMTA) i chlorek tripropylocyny w mieszaninie z amfifilowymi związkami anionowymi (homologiczna seria alkilosulfonianów sodu o $n = 2, 4, 6, 8, 10, 12$ i 14 atomach węgla w łańcuchu alkilowym). Wszystkie badane związki powodowały wzrost prędkości kinetycznej desorpcji jonów wapnia z błon liposomowych przy rosnącym stężeniu. W przypadku mieszanin zawierających związki kationowe i anionowe zaobserwowano zarówno synergizm, jak i antagonizm. Wykazano, że efekt regulacyjny zależy od własności związków kationowych i anionowych. Mieszanina najskuteczniejszego związku kationowego (BDTA) z każdym ze związków anionowych zmniejszała efekt. Mieszaniny pozostałych związków amonowych z alkilosulfonianami sodu powodowały zarówno synergizm, jak i antagonizm. Związki anionowe o krótkich łańcuchach powodowały wzrost, a przy dłuższych łańcuchach zmniejszały skuteczność, podczas gdy związki o porównywalnych łańcuchach całkowicie blokowały proces desorpcji jonów wapnia. Mieszanina związku metaloorganicznego, mającego trzy krótkie łańcuchy, ze związkami anionowymi dała odwrotny efekt: związki krótkołańcuchowe spowodowały spadek, a związki o długich łańcuchach wzrost skuteczności chlorku tripropylocyny (Kuczera, Kral, Podolak, & Przystalski, 1999; Kuczera, Kral, & Przystalski, 1999).

Podsumowanie bibliometryczne osiągnięć przed doktoratem.

Sumaryczny Impact Factor (według roku publikacji) wynosi $\sum IF = 4.618$

Sumaryczna liczba punktów MNiSW z roku wydania wynosi $\sum p.MNiSW = 104$

Sumaryczna liczba cytowań wynosi $\sum WoS = 72$ (na dzień 15.05.2018)

6.2. Tematyka badań realizowanych po uzyskaniu stopnia doktora.

Moja działalność naukowa po uzyskaniu tytułu doktora w początkowych dwu latach (1999-2001), to kontynuacja badań dotyczących wpływu związków metaloorganicznych jak i ich mieszanin ze związkami z grupy QAS na modelowe błony lipidowe. Wyniki badań wskazywały, że dwie pochodne: difenylocyna i trifenylocyna wykazywały ograniczenia przestrzenne podczas interakcji z dwuwarstwą lipidową. Wykazano, że związki te są ułożone w różnych miejscach w obrębie modelowej dwuwarstwy lipidowej. Obie pochodne fenylocyny ułatwiały transport jonów $S_2O_4^{2-}$ przez dwuwarstwą lipidową, ale zależność

stężeniowa była różna dla każdego ze związków. Trifenyllocyna ułatwiała transport jonów $S_2O_4^{2-}$ w o wiele większym stopniu zaburzając równowagę jonową błony plazmatycznej. Z kolei difenyllocyna nie powodowała dużych zmian przy powierzchni, ale dużo większe w obszarze hydrofobowym dwuwarstwy lipidowej (Gabrielska, Kral, Langner, & Przystalski, 2000). Wyniki badań dotyczących modyfikacyjnego wpływu mieszanin związków metaloorganicznych i czwartorzędowych soli amonowych wskazywały zarówno na synergizm jak i antagonizm w działaniu obu grup związków. Skuteczność mieszanin zależała bardziej od długości łańcucha związków QAS niż od wielkości i polarności ich części hydrofilowej. Najskuteczniejszym ze wszystkich badanych układów była mieszanina chlorku benzyldimetyloamoniowego w mieszaninie z tripropyllocyną. Co więcej poprzez odpowiedni dobór związku metaloorganicznego i czwartorzędowej soli amoniowej można było uzyskać zwiększenie lub zmniejszenie stałej szybkości desorpcji jonów wapnia, co sugerowało efekt regulacyjny (Kral, Kuczera, & Przystalski, 2001). Ostatnimi z badań dotyczących wpływu badanych związków na proces desorpcji wapnia z powierzchni modelowych błon były moje badania dotyczące wpływu halogenków dodecylotrimetyloamoniowych (DTAX) i halogenków N-dodecylo-N, N-dimetylo-N-benzyloamoniowych (DBeAX). DBeAX okazały się bardziej skuteczne w desorpcji wapnia niż DTAX. Jodki tych związków wzmacniały ten proces bardziej niż bromki i chlorki (Roszak, Żyłka, Kral, & Przyczyna, 2001).

Mając na uwadze zgromadzone doświadczenie w dziedzinie oddziaływania kilku grup związków z modelowymi błonami biologicznymi i chcąc rozwijać i poszerzać swoje umiejętności, jeszcze w roku uzyskania tytułu doktora opublikowana została praca przeglądowa dotycząca liposomowych nośników leków (Langner & Kral, 1999). W następnym roku (2000), w ramach uzyskanego stypendium Fundacji Batorego, odbyłam trzymiesięczny staż naukowy w Instytucie Chemii Fizycznej im. J. Herovskega w Pradze, który pozwolił mi na rozpoczęcie badań dotyczących niewirusowych nośników leków. Pierwsze badania dotyczyły oddziaływania liposomów kationowych z oligonukleotydami (ODN) z wykorzystaniem technik: spektroskopii korelacji fluorescencji (FCS) oraz spektroskopii fluorescencyjnej w stanie ustalonym (steady state). FCS zapewniła unikatową zdolność pomiaru statystycznego rozkładu wielkości cząstek w oparciu o wykrywanie pojedynczych cząsteczek. Dokonano pomiaru interakcji fluorescencyjnie znakowanego ODN z powierzchnią liposomów kationowych. Zmianę intensywności fluorescencji zastosowano do oceny stopnia wiązania ODN. Przy 25% obecności metylosiarczanu N-[1-(2,3-dioleoiloksy)propylo]-N,N,N-trimetyloamoniowego (DOTAP) w błonie PE wiązanie ODN było maksymalne i pozostawało stałe dla wyższych stężeń. Gdy PE został zastąpiony przez PC, względna zmiana fluorescencji zależała od ilości DOTAP. Wyniki te zostały również potwierdzone przez pomiary FCS, które dostarczyły więcej informacji dotyczących procesu agregacji (Jurkiewicz, Kral, Okruszek, Hof, & Langner, 2002).

Badania prowadzone przeze mnie w kolejnych latach (2002-2012) dostarczyły wyników, które między innymi wchodzi w skład prezentowanego powyżej osiągnięcia naukowego (prace **H1-H10**), a dotyczyły śledzenia procesu kondensacji plazmidowego DNA w warunkach pomiarowych w fizjologicznie istotnej skali z wykorzystaniem technik fluorescencyjnych na poziomie pojedynczej cząsteczki (**SMT**). Badania te w dużej części powstały dzięki wsparciu finansowemu w ramach grantu przyznanego mi przez Agencję

Grantową Czeskiej Akademii Nauk (lata 2005-2010 – „*DNA condensation with application of the Monte-Carlo simulations, light dispersion and fluorescence correlation spectroscopy in vitro and in vivo*”).

W roku 2004, w ramach współpracy z dr Ian'em Blagbrough (University of Bath, Department of Pharmacy & Pharmacology) prowadziłam badania dotyczące oddziaływania liniowego DNA (ctDNA) z lipopoliaminami. Lipopoliaminy są potencjalnie bardziej efektywniejszymi wektorami genów dzięki zdolności ściślejszego upakowania DNA. Częsteczki te zawierają ugrupowanie lipofilowe (głównie długołańcuchowe węglowodory lub steroidowe lipidy) i dodatnio naładowane grupy aminowe, takie jak spermidyna lub spermina. Przedmiotem moich badań były dwie nowosyntetyzowane lipopoliaminy: 1) N4,N9-dioleoylspermine i 2) N1-cholesteryl spermine carbamate. Pierwsza lipopoliamina o wiele efektywniej kondensowała cząsteczki linowego ctDNA do punktowych supramolekuł, powodując prawie 3-krotny wzrost współczynnika dyfuzji z $D = 0,71 \times 10^{-12} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ do $D = 1,8 \times 10^{-12} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ dla stężeń $C_{\text{compound}}/C_{\text{DNAbp}} = 1-1,5$. Wzrost współczynnika dyfuzji w wyniku oddziaływań z drugą lipopoliaminą był mniejszy, z $D = 0,71 \times 10^{-12} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ do $D = 1,4 \times 10^{-12} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ i zachodził dla dużo wyższych stężeń związku $C_{\text{compound}}/C_{\text{DNAbp}} = 1,5-2,5$. Zmiany liczby cząstek także potwierdziły przewagę pierwszej z badanych poliamin, dla której wartość PN osiągnęła 0,6 (*point-like molecule*), co nie miało miejsca w przypadku drugiej badanej lipopoliaminy (Adjimatera, Kral, Hof, & Blagbrough, 2006). Obie poliaminy zostały także szczegółowo przebadane w układach z plazmidowym DNA o różnych rozmiarach z wykorzystaniem metody TCSPC-FCS, gdzie uwzględniono także zmiany czasu życia PicoGreen[®]. Wyniki tych badań były opublikowane w postaci rozdziału monografii pt. „*Fluorescence Correlation Spectroscopic Studies of a Single Lipopolyamine–DNA Nanoparticle*”, którego jestem autorem korespondencyjnym (Adjimatera et al., 2008).

W roku 2005 odbyłam dwutygodniowy staż w grupie prof. Yves Mely (Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie, Université de Strasbourg, Francja). Celem stażu było zapoznanie się z metodą dwu-fotonowego FCS oraz wykorzystanie tej metody w badaniach kondensacji plazmidowego DNA w obecności sperminy.

Także w roku 2005 w trakcie wstępnych badań z wykorzystaniem metody FCS nawiązałam współpracę z dr Nathalie Mignet (zespół: „*Design, synthesis and validation of vectors for targeted therapy and imaging Unité de Pharmacologie Chimique génétique et d'Imagerie Université Paris Descartes, Paryż, Francja*”). Współpraca ta pozwoliła mi na badania układów kondenser/DNA, mających realne zastosowanie w badaniach *in vitro*. W roku 2011, w ramach miesięcznego stypendium przyznanego mi przez Ambasadę Francji w Polsce prowadziłam badania nowosyntetyzowanych pochodnych cukrowych w warunkach *in vitro* (komórki HeLa) w laboratorium Dr Mignet. Owocem współpracy są trzy publikacje (**H7-H9**). Lata 2010 do chwili obecnej to kontynuacja badań dotyczących ewolucji układu czynnik kondensujący/DNA z wykorzystaniem metod zaprezentowanych w ramach osiągnięcia naukowego (FCS, TCSPC-FCS, FLCS). W ramach współpracy z Dr Hanną Pruchnik (Katedra Fizyki i Biofizyki, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu), wykonałam serię pomiarów dotyczących charakterystyki zmian konformacyjnych plazmidowego DNA w wyniku oddziaływania nowosyntetyzowanych pochodnych związków metaloorganicznych. Badanymi związkami były: kompleks dibutylocyny z kwasem cytrynowym (DBTC), który silnie i w pełni

powodował kondensację badanego plazmidu DNA. W trakcie tych badań poza standardowym znacznikiem PicoGreen[®] zastosowałam także znacznik Hoechst 33258. I podobnie jak w przypadku badań przedstawionych w ramach osiągnięcia naukowego, rodzaj znacznika miał wpływ na wartości stężeń, przy których obserwowano pełną kondensację DNA. Plazmid znaczoney Hoechst 33258, był efektywniej kondensowany już w przypadku stężeń $C_{DBTC}/C_{DNAbp} = 5$. W przypadku znaczenia PicoGreen[®], stężenie związku DBTC powodujące kondensację było wyższe, co sugerowało interkalacyjny tryb wiązania się związku DBTC z DNA, powodując możliwe równoczesne oddziaływania elektrostatyczne lub chemiczne między centrum Sn (IV) i szkieletem fosforanowym helisy DNA (Pruchnik, Kral, & Hof, 2014). Kolejną grupą związków były kompleksy butylocyny z kwasem 2-sulfobenzoesowym (TBTsbz, DBTsbz and DTBTsbz). Spadek intensywności fluorescencji, liczby cząstek i czasu życia fluorescencji wskazywał, że w obecności każdego z badanych związków nastąpiła rekonformacja cząsteczek DNA. Czas dyfuzji, czas życia fluorescencji i liczba cząstek zmieniały się wraz ze wzrostem stosunku C_{comp}/C_{DNAbp} wg następującej kolejności skuteczności: DBTsbz > TBTsbz > DTBTsbz. Wszystkie te trzy związki oddziałują z cząsteczką DNA, ale nie prowadzą do ścisłego jej upakowania, prawdopodobnie z powodu ekranowania anionu cyny przez dibutyłowe (DBTsbz), tributylowe (TBTsbz) fragmenty struktury tych związków (Pruchnik et al., 2016). Cisplatyna cis-[Pt (NH₃)₂Cl₂] (cis-DDP) oraz jej nowo syntetyzowana pochodna cis-[PtCl₂ {P (CH₂CH₂COOH)₃}₂] (cis-DTCEP) w układzie z plazmidowym DNA były przedmiotem moich kolejnych badań z wykorzystaniem metody TCSPC-FCS. Znacznie większe spadki wartości czasu życia fluorescencji, liczby cząstek *PN*, oraz intensywności fluorescencji wskazują, że interakcja cis-DTCEP powodowała więcej globalnych zmian w konformacji DNA, co nie miało miejsca w przypadku cis-DDP (Pruchnik, Kral, & Hof, 2017).

Od roku 2015, równoległe do opisanych, prowadzę badania wpływu wyżej wymienionych pochodnych związków metali na własności dynamiczne dwuwarstwy lipidowej wykorzystując technikę spektroskopii korelacji fluorescencji w trakcie skanowania wzdłuż osi Z (Z-scan FCS) w układach planarnych (2D). Metoda Z-scan FCS pozwala na śledzenie zmian współczynnika dyfuzji lateralnej (np. lipidów w dwuwarstwie lipidowej liposomów). W ramach tych badań wykorzystywane są olbrzymie liposomy jednowarstwowe (GUVs) formowane metodą elektroformacji. W badaniach wykorzystuję także metodę spektroskopii korelacji obrazu rastrowego (RICS). Dzięki czasowo-przestrzennej korelacji sygnału fluorescencji metoda RICS pozwala na pomiary w układach *in vitro*, gdzie np. skanowanie obszaru komórki ogranicza efekt gaszenia fluorescencji (*photobleaching*). Znaczniki fluorescencyjne, będąc reporterami zachodzących procesów, a także żywe komórki jako takie, są więc dzięki metodzie RICS w dużo mniejszym stopniu narażone na destrukcyjny wpływ światła wzbudzenia lasera. Metoda RICS, dzięki jednoczesnemu stosowaniu trybu TCSPC a także Z-scan, pozwala na uzyskanie przestrzennego rozkładu czasów życia fluorescencji poszczególnych znaczników w obrębie komórki, tworząc mapę zmieniających się warunków środowiskowych w obszarze przebywania chromoforu znacznika. Obecnie w ramach kontynuacji współpracy z dr Mignet prowadzę badania, mające na celu określenie wpływu obecności serum na proces internalizacji oraz transfekcji lipopleksów w poszczególne obszary komórek HeLa.

7. Podsumowanie dorobku naukowego.

Na mój dotychczasowy dorobek naukowy składają się 32 publikacje, z czego 26 ukazało się w czasopiśmie z bazy JCR, natomiast pozostałe sześć są to prace z punktacją MNiSW. Spośród tych wszystkich publikacji 10 wchodzi w skład osiągnięcia naukowego i stanowi rozprawę habilitacyjną. Oprócz publikacji, w moim dorobku znajduje się 30 komunikatów konferencyjnych, 19 na konferencjach krajowych i 11 na konferencjach międzynarodowych.

Podsumowanie bibliometryczne dorobku naukowego.

Przed doktoratem:

Sumaryczny Impact Factor (według roku publikacji) wynosi $\sum IF = 4.618$

Sumaryczna liczba punktów MNiSW z roku wydania wynosi $\sum p.MNiSW = 104$

Sumaryczna liczba cytowań Web of Science wynosi $\sum WoS = 72_{(15.05.2018)}$

Publikacji stanowiących osiągnięcie:

Sumaryczny Impact Factor (według roku publikacji) wynosi $\sum IF_{H1-H10} = 28.037$

Sumaryczna liczba punktów MNiSW z roku wydania wynosi $\sum p.MNiSW_{H1-H10} = 236$

Sumaryczna liczba cytowań Web of Science wynosi $\sum WoS_{H1-H10} = 148_{(15.05.2018)}$

Po doktoracie (bez uwzględnienia publikacji stanowiących osiągnięcie)

Sumaryczny Impact Factor (według roku publikacji) wynosi $\sum IF = 20.79$

Sumaryczna liczba punktów MNiSW z roku wydania wynosi $\sum p.MNiSW = 257$

Sumaryczna liczba cytowań Web of Science wynosi $\sum WoS = 58_{(15.05.2018)}$

Wszystkie (z uwzględnieniem publikacji stanowiących osiągnięcie)

Sumaryczny Impact Factor (według roku publikacji) wynosi $\sum IF = 53.445$

Sumaryczna liczba punktów MNiSW z roku wydania wynosi $\sum p.MNiSW = 602$

Sumaryczna liczba cytowań Web of Science wynosi $\sum WoS = 282$ (226 bez autocytaowań)

(15.05.2018)

Indeks Hirscha 10

Wrocław, dnia 22.05.2018

Teresa Kral

8. Bibliografia

- Adjimatera, N., Benda, A., Blagbrough, I. S., Langner, M., Hof, M., & Kral, T. (2008). Fluorescence Correlation Spectroscopic Studies of a Single Lipopolyamine – DNA Nanoparticle. In *Fluorescence of Supramolecules, Polymers, and Nanosystems* (Vol. 4, pp. 381–413). <https://doi.org/10.1007/4243>
- Adjimatera, N., Kral, T., Hof, M., & Blagbrough, I. S. (2006). Lipopolyamine-mediated single nanoparticle formation of calf thymus DNA analyzed by fluorescence correlation spectroscopy. *Pharmaceutical Research*, 23(7), 1564–1573. <https://doi.org/10.1007/s11095-006-0278-6>
- Ahn, S. J., Costa, J., & Emanuel, J. R. (1996). PicoGreen quantitation of DNA: Effective evaluation of samples pre- or post-PCR. *Nucleic Acids Research*, 24(13), 2623–2625. <https://doi.org/10.1093/nar/24.13.2623>
- Ainalem, M. L., Bartles, A., Muck, J., Dias, R. S., Carnerup, A. M., Zink, D., & Nylander, T. (2014). DNA compaction induced by a cationic polymer or surfactant impact gene expression and DNA degradation. *PLoS ONE*, 9(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092692>
- Anselmetti, D., Fritz, J., Smith, B., & Fernandez-Busquets, X. (2000). Single molecule DNA biophysics with atomic force microscopy. *Single Molecules*, 1(1), 53–58. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1438-5171\(200004\)1:1<53::AID-SIMO53>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1438-5171(200004)1:1<53::AID-SIMO53>3.0.CO;2-U)
- Bahns, J. T., Liu, C., & Chen, L. (2004). Characterizing specific phage – protein interactions by fluorescence correlation spectroscopy. *Protein Science*, 13(630), 2578–2587. <https://doi.org/10.1110/ps.04695704.2578>
- Banerjee, A., Majumder, P., Sanyal, S., Singh, J., Jana, K., Das, C., & Dasgupta, D. (2014). The DNA intercalators ethidium bromide and propidium iodide also bind to core histones. *FEBS Open Bio*, 4, 251–259. <https://doi.org/10.1016/j.fob.2014.02.006>
- Bloomfield, V. A. (1997). DNA condensation by multivalent cations. *Biopolymers*, 44(3), 269–282. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0282\(1997\)44:3<269::AID-BIP6>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0282(1997)44:3<269::AID-BIP6>3.0.CO;2-T)
- Böhmer, M., & Enderlein, J. (2003). Fluorescence spectroscopy of single molecules under ambient conditions: Methodology and technology. *ChemPhysChem*, 4(8), 792–808. <https://doi.org/10.1002/cphc.200200565>
- Breton, M., Berret, J.-F., Bourgaux, C., Kral, T., Hof, M., Pichon, C., ... Mignet, N. (2011). Protonation of lipids impacts the supramolecular and biological properties of their self-assembly. *Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids*, 27(20), 12336–45. <https://doi.org/10.1021/la202439s>
- Chen, Y., Müller, J. D., Berland, K. M., & Gratton, E. (1999). Fluorescence Fluctuation Spectroscopy. *Methods*, 19(2), 234–252. <https://doi.org/10.1006/meth.1999.0854>
- Cheng, C., Jia, J.-L., & Ran, S.-Y. (2015). Polyethylene glycol and divalent salt-induced DNA reentrant condensation revealed by single molecule measurements. *Soft Matter*, 11(19), 3927–3935. <https://doi.org/10.1039/C5SM00619H>
- Cheng, C., & Ran, S. Y. (2014). Interaction between DNA and trimethyl-ammonium bromides with different alkyl chain lengths. *The Scientific World Journal*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/863049>
- Chou, W. Y., Marky, L. A., Zaunczkowski, D., & Breslauer, K. J. (1987). The thermodynamics of drug-dna interactions: Ethidium bromide and propidium iodide. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 5(2), 345–362. <https://doi.org/10.1080/07391102.1987.10506399>
- Conwell, C. C., Vilfan, I. D., & Hud, N. V. (2003). Controlling the size of nanoscale toroidal DNA condensates with static curvature and ionic strength. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(16), 9296–9301. <https://doi.org/10.1073/pnas.1533135100>
- Cosa, G., Focsaneanu, K. S., McLean, J. R., McNamee, J. P., & Scaiano, J. C. (2001). Photophysical properties of fluorescent DNA-dyes bound to single- and double-stranded DNA in aqueous buffered solution. *Photochemistry and Photobiology*, 73(6), 585–599. [https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2001\)0730585ppofdd2.0.co2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2001)0730585ppofdd2.0.co2)
- Davis, L. M., & Shen, G. (2006). Accounting for triplet and saturation effects in FCS measurements. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 7(4), 287–301. <https://doi.org/10.2174/138920106777950843>
- de Lima, M. C., Simoes, S., Pires, P., Gaspar, R., Slepishkin, V., & Duzgunes, N. (1999). Gene delivery mediated by cationic liposomes: from biophysical aspects to enhancement of transfection. *Mol Membr Biol*, 16(1), 103–109. <https://doi.org/10.1080/096876899294823>
- Dias, R. S., Innerlohinger, J., Glatter, O., Miguel, M. G., & Lindman, B. (2005). Coil–Globule Transition of DNA Molecules Induced by Cationic Surfactants: A Dynamic Light Scattering Study. *The Journal of Physical Chemistry B*, 109(20), 10458–10463.
- Dias, R. S., Lindman, B., & Miguel, M. G. (2001). Interactions between DNA and surfactants. *Trends in Colloid and Interface Science XV*, 163–167. https://doi.org/10.1007/3-540-45725-9_37
- Dragan, A. I., Bishop, E. S., Casas-Finet, J. R., Strouse, R. J., Schenerman, M. A., & Geddes, C. D. (2010). Metal-enhanced PicoGreen® fluorescence: Application to fast and ultra-sensitive pg/ml DNA quantitation. *Journal of Immunological Methods*, 362(1–2), 95–100. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2010.09.011>
- Edman, L. (2000). Theory of fluorescence correlation spectroscopy on single molecules. *Journal of Physical Chemistry A*, 104(26), 6165–6170. <https://doi.org/10.1021/jp000100r>

- Elson, E. (1974). Fluorescence correlation spectroscopy. I. Conceptual basis and theory. *Biopolymers*, *13*, 1–27. <https://doi.org/10.1002/bip.1974.360130102>
- Elson, E. L. (2011). Fluorescence correlation spectroscopy: Past, present, future. *Biophysical Journal*, *101*(12), 2855–2870. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.11.012>
- Enderlein, J., & Gregor, I. (2005). Using fluorescence lifetime for discriminating detector afterpulsing in fluorescence-correlation spectroscopy. *Review of Scientific Instruments*, *76*(3), 1–5. <https://doi.org/10.1063/1.1863399>
- Földes-Papp, Z. (2007). “True” single-molecule observations by fluorescence correlation spectroscopy and two-color fluorescence cross-correlation spectroscopy. *Experimental and Molecular Pathology*, *82*(2), 147–155. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2006.12.002>
- Gabrielska, J., Kral, T., Langner, M., & Przystalski, S. (2000). Different Effects of Di- and Triphenyltin Compounds on Lipid Bilayer Dithionite Permeabilization. *Zeitschrift Für Naturforschung*, *55c*, 758–763.
- Gani, S. A., Chatteraj, D. K., & Mukherjee, D. C. (1999). Binding of cationic surfactants to DNA, protein and DNA-protein mixtures. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, *36*(3), 165–176.
- Gaweda, S., Morán, M. C., Pais, A. A. C. C., Dias, R. S., Schillén, K., Lindman, B., & Miguel, M. G. (2008). Cationic agents for DNA compaction. *Journal of Colloid and Interface Science*, *323*(1), 75–83. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2008.04.006>
- Geall, A. J., & Blagbrough, I. S. (2000). Rapid and sensitive ethidium bromide fluorescence quenching assay of polyamine conjugate-DNA interactions for the analysis of lipoplex formation in gene therapy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *22*(5), 849–859. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(00\)00250-8](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(00)00250-8)
- Grueso, E., Cerrillos, C., Hidalgo, J., & Lopez-Cornejo, P. (2012). Compaction and decompaction of DNA induced by the cationic surfactant CTAB. *Langmuir*, *28*(30), 10968–10979. <https://doi.org/10.1021/la302373m>
- Grunwell, J. R., Glass, J. L., Lacoste, T. D., Deniz, A. A., Chemla, D. S., & Schultz, P. G. (2001). Monitoring the conformational fluctuations of DNA hairpins using single-pair fluorescence resonance energy transfer. *Journal of the American Chemical Society*, *123*(18), 4295–4303. <https://doi.org/10.1021/ja0027620>
- Haustein, E., & Schwille, P. (2007). Fluorescence Correlation Spectroscopy: Novel Variations of an Established Technique. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, *36*(1), 151–169. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.36.040306.132612>
- Hess, S. T., & Webb, W. W. (2002). Focal volume optics and experimental artifacts in confocal fluorescence correlation spectroscopy. *Biophysical Journal*, *83*(4), 2300–2317. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(02\)73990-8](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(02)73990-8)
- Holyst, R., Poniewierski, A., & Zhang, X. (2017). Analytical form of the autocorrelation function for the fluorescence correlation spectroscopy. *Soft Matter*, *13*(6), 1267–1275. <https://doi.org/10.1039/C6SM02643E>
- Humpolícková, J., Benda, A., Sýkora, J., Machán, R., Kral, T., Gasinska, B., ... Hof, M. (2008). Equilibrium dynamics of spermine-induced plasmid DNA condensation revealed by fluorescence lifetime correlation spectroscopy. *Biophysical Journal*, *94*(3), L17-9. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.122408>
- Humpolícková, J., Stepánek, M., Kral, T., Benda, A., Procházka, K., & Hof, M. (2008). On mechanism of intermediate-sized circular DNA compaction mediated by spermine: contribution of fluorescence lifetime correlation spectroscopy. *Journal of Fluorescence*, *18*(3–4), 679–84. <https://doi.org/10.1007/s10895-008-0345-y>
- Husale, S., Grange, W., Karle, M., B?rgi, S., & Hegner, M. (2008). Interaction of cationic surfactants with DNA: A single-molecule study. *Nucleic Acids Research*, *36*(5), 1443–1449. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm1146>
- Jorge, A. F., Nunes, S. C. C., Cova, T. F. G. G., & Pais, A. A. C. C. (2016). Cooperative action in DNA condensation. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, *26*, 66–74. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2016.09.014>
- Jurkiewicz, P., Kral, T., Okruszek, A., Hof, M., & Langner, M. (2002). Interaction of oligonucleotides with positively charged liposomes using fluorescence techniques. *Cellular & Molecular Biology Letters*, *7*(2).
- Jurkiewicz, P., Okruszek, A., Hof, M., & Langner, M. (2003). ASSOCIATING OLIGONUCLEOTIDES WITH POSITIVELY CHARGED LIPOSOMES. *CELLULAR & MOLECULAR BIOLOGY LETTERS*, *8*, 77–84.
- Kapusta, P., Machan, R., Benda, A., & Hof, M. (2012). Fluorescence lifetime correlation spectroscopy (FLCS): Concepts, applications and outlook. *International Journal of Molecular Sciences*, *13*(10), 12890–12910. <https://doi.org/10.3390/ijms131012890>
- Kapusta, P., Wahl, M., Benda, A., Hof, M., & Enderlein, J. (2007). Fluorescence lifetime correlation spectroscopy. *Journal of Fluorescence*, *17*(1), 43–48. <https://doi.org/10.1007/s10895-006-0145-1>
- Kennedy, M. T., Pozharski, E. V., Rakhmanova, V. A., & Macdonald, R. C. (2000). Factors Governing the Assembly of Cationic Phospholipid-DNA Complexes. *Biophysical Journal*, *78*(March), 1620–1633.
- Kral, T., Benda, A., Hof, M., & Langner, M. (2005). Some aspects of DNA condensation observed by fluorescence correlation spectroscopy. In C. D. Geddes & J. R. Lakowicz (Eds.), *Reviews in Fluorescence 2005* (Vol.

- 2005, pp. 109–124). Springer US. https://doi.org/10.1007/0-387-23690-2_5
- Kral, T. E., Kuczera, J., & Przystalski, S. (2001). Organometallics and Quaternary Ammonium Salts Affect Calcium Ion Desorption from Lecithin Liposome Membranes. *Zeitschrift Für Naturforschung*, *56c*, 395–401.
- Kral, T., Hof, M., Jurkiewicz, P., & Langner, M. (2002). Fluorescence correlation spectroscopy (FCS) as a tool to study DNA condensation with hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB). *Cellular and Molecular Biology Letters*, *7*(2).
- Kral, T., Hof, M., & Langner, M. (2002). The effect of spermine on plasmid condensation and dye release observed by fluorescence correlation spectroscopy. *Biological Chemistry*, *383*(2), 331–5. <https://doi.org/10.1515/BC.2002.036>
- Kral, T., Langner, M., Beneš, M., Baczyńska, D., Ugorski, M., & Hof, M. (2002). The application of fluorescence correlation spectroscopy in detecting DNA condensation. *Biophysical Chemistry*, *95*(2), 135–144. [https://doi.org/10.1016/S0301-4622\(01\)00253-8](https://doi.org/10.1016/S0301-4622(01)00253-8)
- Kral, T., Langner, M., & Hof, M. (2006). DNA-spermine and DNA-lipid aggregate formation visualized by fluorescence correlation spectroscopy. *Chemotherapy*, *52*(4), 196–199. <https://doi.org/10.1159/000093270>
- Kral, T., Leblond, J., Hof, M., Scherman, D., Herscovici, J., & Mignet, N. (2010). Lipopolythiourea/DNA interaction: A biophysical study. *Biophysical Chemistry*, *148*(1–3), 68–73. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2010.02.011>
- Kral, T., Widerak, K., Langner, M., & Hof, M. (2005). Propidium iodide and PicoGreen as dyes for the DNA fluorescence correlation spectroscopy measurements. *Journal of Fluorescence*, *15*(2), 179–183. <https://doi.org/10.1007/s10895-005-2526-2>
- Krichevsky, O., & Bonnet, G. (2002). Fluorescence correlation spectroscopy : the technique. *Reports on Progress in Physics*, *65*, 251–297. <https://doi.org/10.1088/0034-4885/65/2/203>
- Kuczera, J., Chojnacki, H., Kral, T. E., & Przystalski, S. (1996). Effect of Amphiphilic Cationic Compounds on Calcium Ion Desorption from Lecithin Liposome Membranes . Kinetic Studies and Quantum Chemical Calculations. *Zeitschrift Für Naturforschung*, *51c*, 219–225.
- Kuczera, J., Gabrielska, J., Kral, T. E., & Przystalski, S. (1997). A Synergistic Effect of Select Organotin Compounds and Ionic Surfactants on Liposome Membranes. *Applied Organometallic Chemistry*, *11*(7), 591–600. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0739\(199707\)11:7<591::AID-AOC615>3.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0739(199707)11:7<591::AID-AOC615>3.0.CO;2-Z)
- Kuczera, J., Kral, T., Podolak, M., & Przystalski, S. (1999). A joint effect of cationic and anionic amphiphilic compounds on the desorption of calcium ions from lecithin liposome membranes. *Zeitschrift Fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, *54*(5–6).
- Kuczera, J., Kral, T., & Przystalski, S. (1999). Dezaktywacja działania mieszaniny związków metaloorganicznych i anionowych związków amfifilowych. *Ochrona Środowiska I Zasobów Naturalnych*, *18*, 373–382.
- Lachowicz, T. M., Witek, S., Luczyński, J., Witkowska, R., Bałakuszew, a, Kleszczyńska, H., ... Przystalski, S. (1996). Aminoethyl esters of fatty acids as model lysosomotropic substances. *Folia Microbiologica*, *41*(1), 102–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9090841>
- Langner, M., & Kral, T. (1999). Liposome-based drug delivery systems. *Polish Journal of Pharmacology*, *51*(3), 211–222.
- Lemieux, P., Guérin, N., Paradis, G., Proulx, R., Chistyakova, L., Kabanov, A., & Alakhov, V. (2000). A combination of poloxamers increases gene expression of plasmid DNA in skeletal muscle. *Gene Ther*, *7*(11), 986–991. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3301189>
- Macháň, R., & Wohland, T. (2014). Recent applications of fluorescence correlation spectroscopy in live systems. *FEBS Letters*, *588*(19), 3571–3584. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.03.056>
- Madeira, C., Loura, L. M. S., Aires-Barros, M. R., & Prieto, M. (2011). Fluorescence methods for lipoplex characterization. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, *1808*(11), 2694–2705. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.07.020>
- Magde, D., Elson, E., & Webb, W. W. (1972). Thermodynamic fluctuations in a reacting system measurement by fluorescence correlation spectroscopy. *Physical Review Letters*, *29*(11), 705–708. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.29.705>
- Mandelkern, M., Elias, J. G., Eden, D., & Crothers, D. M. (1981). The dimensions of DNA in solution. *Journal of Molecular Biology*, *152*(1), 153–161. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(81\)90099-1](https://doi.org/10.1016/0022-2836(81)90099-1)
- Meseth, U., Wohland, T., Rigler, R., & Vogel, H. (1999). Resolution of Fluorescence Correlation Measurements. *Biophys. J.*, *76*(3), 1619–1631. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)77321-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77321-2)
- Misiak, P., Wilk, K. A., Kral, T., Woźniak, E., Pruchnik, H., Frackowiak, R., Rózycka-Roszak, B. (2013). New gluconamide-type cationic surfactants: Interactions with DNA and lipid membranes. *Biophysical Chemistry*, *180–181*, 44–54. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2013.06.010>
- Motta, S., Brocca, P., Del Favero, E., Rondelli, V., Cantù, L., Amici, A., ... Caracciolo, G. (2013). Nanoscale structure of protamine/DNA complexes for gene delivery. *Applied Physics Letters*, *102*(5), 1–5. <https://doi.org/10.1063/1.4790588>

- Pemboung, G., Morellet, N., Kral, T., Hof, M., Scherman, D., Bureau, M. F., & Mignet, N. (2011). A comprehensive study in triblock copolymer membrane interaction. *Journal of Controlled Release*, *151*(1), 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.01.007>
- Pruchnik, H., Kral, T., & Hof, M. (2014). Interaction of new butyltin citrate complex with lipid model membrane and DNA. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, *118*(2), 967–975. <https://doi.org/10.1007/s10973-014-3805-4>
- Pruchnik, H., Kral, T., & Hof, M. (2017). Interaction of Newly Platinum(II) with Tris(2-carboxyethyl)phosphine Complex with DNA and Model Lipid Membrane. *Journal of Membrane Biology*, pp. 1–10. <https://doi.org/10.1007/s00232-017-9972-z>
- Pruchnik, H., Kral, T., Poradowski, D., Pawlak, A., Drynda, A., Obmińska-Mrukowicz, B., & Hof, M. (2016). New cytotoxic butyltin complexes with 2-sulfobenzoic acid: Molecular interaction with lipid bilayers and DNA as well as in vitro anticancer activity. *Chemico-Biological Interactions*, *243*, 107–118. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2015.11.007>
- Przestalski, S., Kuczera, J., Kleszczyńska, H., Gabrielska, J., Sarapuk, J., Hładyszowski, J., ... Trela, Z. (1997). Wpływ organicznych związków cyny i ołowiu na błony biologiczne i modelowe. *Kosmos*, *46*(1 (234)), 165–172.
- Ran, S. Y., & Jia, J. L. (2015). A multi-field approach to DNA condensation. *Chinese Physics B*, *24*(12), 1–10. <https://doi.org/10.1088/1674-1056/24/12/128702>
- Reese, H. R. (1994). Effects of DNA charge and length on the electrophoretic mobility of intercalated DNA. *Biopolymers*, *34*(10), 1349–1358. <https://doi.org/10.1002/bip.360341007>
- Ries, J., Weidemann, T., & Schwille, P. (2012). *Fluorescence correlation spectroscopy*. *Comprehensive Biophysics* (Vol. 2). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374920-8.00219-8>
- Rigler, R., Grasselli, P., & Ehrenberg, M. (1979). Fluorescence correlation spectroscopy and applications to the study of Brownian motion of biopolymers. *Phys. Scr.*, *19*, 486–490.
- Ritort, F. (2006). Single-molecule experiments in biological physics: Methods and applications. *Journal of Physics Condensed Matter*, *18*(32). <https://doi.org/10.1088/0953-8984/18/32/R01>
- Robertson, R. M., Laib, S., & Smith, D. E. (2006). Diffusion of isolated DNA molecules: Dependence on length and topology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(19), 7310–7314. <https://doi.org/10.1073/pnas.0601903103>
- Rozsak, B., Żyłka, R., Kral, T., & Przyczyna, A. (2001). Counterion Effects on Interaction of Amphiphilic Quaternary Ammonium Salts with Model Membranes. *Zeitschrift Für Naturforschung*, *56c*, 407–412.
- Rudiuk, S., Yoshikawa, K., & Baigl, D. (2011). Enhancement of DNA compaction by negatively charged nanoparticles. Application to reversible photocontrol of DNA higher-order structure. *Soft Matter*, *7*(12), 5854. <https://doi.org/10.1039/c1sm05314k>
- Sarapuk, J., Kleszczyńska, H., Hładyszowski, J., Gabrielska, J., Kral, T. E., Trela, Z., ... Witek, S. (1994). INTERACTION BETWEEN MEMBRANES AND A NEW CLASS OF MEMBRANE ACTIVE COMPOUNDS WITH ANTIOXIDANT GROUP. THE HYDROPHYLIC PROPERTIES. In *TWELFTH SCHOOL ON BIOPHYSICS OF MEMBRANE TRANSPORT* (pp. 189–193). School proceedings.
- Schwille, P., Bieschke, J., & Oehlenschläger, F. (1997). Kinetic investigations by fluorescence correlation spectroscopy: The analytical and diagnostic potential of diffusion studies. *Biophysical Chemistry*, *66*(2–3), 211–228. [https://doi.org/10.1016/S0301-4622\(97\)00061-6](https://doi.org/10.1016/S0301-4622(97)00061-6)
- Shokeen, N., Issa, C., & Mukhopadhyay, A. (2017). Comparison of nanoparticle diffusion using fluorescence correlation spectroscopy and differential dynamic microscopy within concentrated polymer solutions. *APPLIED PHYSICS LETTERS*, *111*(263703).
- Sigmon, J., & Larcom, L. L. (1996). The effect of ethidium bromide on mobility of DNA fragments in agarose gel electrophoresis. *Electrophoresis*, *17*(10), 1524–1527. <https://doi.org/10.1002/elps.1150171003>
- Takemoto, Y. (2005). Recognition and activation by ureas and thioureas: stereoselective reactions using ureas and thioureas as hydrogen-bonding donors. *Organic & Biomolecular Chemistry*, *3*(24), 4299–4306. <https://doi.org/10.1039/b511216h>
- Tcherniak, A., Reznik, C., Link, S., & Landes, C. F. (2008). Fluorescence Correlation Spectroscopy : Criteria for Analysis in Complex Systems. *Electronics*, *81*(2), 3–5.
- Teif, V. B., & Bohinc, K. (2011). Condensed DNA: Condensing the concepts. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, *105*(3), 208–222. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2010.07.002>
- Tian, Y., Martinez, M. M., Pappas, D. (2011). Fluorescence Correlation Spectroscopy: A review of Biochemical and Microfluidic Applications. *Applied Spectroscopy*, *65*(4), 115–124. <https://doi.org/10.1366/10-06224.Fluorescence>
- Tracy, M. A., & Pecora, R. (1992). Dynamics of Rigid and Semirigid Rodlike Polymers. *Annual Review of Physical Chemistry*, *43*(1), 525–557. <https://doi.org/10.1146/annurev.pc.43.100192.002521>
- Vardevanyan, P. O., Antonyan, A. P., Parsadanyan, M. A., Davtyan, H. G., & Karapetyan, A. T. (2003). The binding of ethidium bromide with DNA: Interaction with single- and double-stranded structures.

- Experimental and Molecular Medicine*, 35(6), 527–533. <https://doi.org/10.1038/emm.2003.68>
- Wahl, M. (PicoQuant G. (2014). Time-correlated single photon counting. *Technical Note*, 1–14. [https://doi.org/10.1016/0022-2313\(89\)90051-3](https://doi.org/10.1016/0022-2313(89)90051-3)
- Whitley, K. D., Comstock, M. J., & Chemla, Y. R. (2017). High-Resolution “Fleezers”: Dual-Trap Optical Tweezers Combined with Single-Molecule Fluorescence Detection. In *Optical Tweezers: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. (Vol. 1486, pp. 183–256). <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6421-5>
- Winkler, R. G., Keller, S., & Rädler, J. O. (2006). Intramolecular dynamics of linear macromolecules by fluorescence correlation spectroscopy. *Physical Review E - Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics*, 73(4), 1–14. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.73.041919>
- Witek, S., Oświęcimska, M., Lachowicz, T. M., Bałakuszew, A., Przystalski, S., Kuczera, J., ... Podolak, M. (1994). General Biological Properties of Antioxidant Permeatoxins and Their Influence on Natural and Model Membranes. *Folia Microbiologica*, (Table I), 559–560.
- Wu, B., Chen, Y., & Müller, J. D. (2008). Fluorescence Correlation Spectroscopy of Finite-Sized Particles. *Biophysical Journal*, 94(7), 2800–2808. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.112789>
- Xin, Q., Li, P., He, Y., Shi, C., Qiao, Y., Bian, X., ... Zhong, J. (2017). Magnetic tweezers for the mechanical research of DNA at the single molecule level. *Anal. Methods*, 9(39), 5720–5730. <https://doi.org/10.1039/C7AY01495C>
- Yoo, J., & Aksimentiev, A. (2016). The structure and intermolecular forces of DNA condensates. *Nucleic Acids Research*, 44(5), 2036–2046. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw081>
- Zinchenko, A. (2016). DNA conformational behavior and compaction in biomimetic systems: Toward better understanding of DNA packaging in cell. *Advances in Colloid and Interface Science*, 232, 70–79. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2016.02.005>