

MEASURING OF CONFORMATIONAL PROPERTIES OF NUCLEIC ACIDS

Ivana Hrazdilová

Bachelor Degree Programme (3), FEEC UBMI

E-mail: xhrazd10@stud.feec.vutbr.cz

Supervised by: Denisa Maděránková, Iva Kejnovská

E-mail: maderankova@phd.feec.vutbr.cz, kejnovska@ibp.cz

Abstract: This paper shows computational method, which analyze UV-visible-spectrophotometric data produced during DNA thermal denaturation experiment. This analysis provides useful information about the stability of the secondary structure of a DNA or RNA and aids in the choice of the sequences for antisense oligomers or PCR primes. Denaturation or renaturation of given sample can be followed by recording absorbance from 170 nm to 310 nm.

Keywords: DNA conformation, thermal melting, DNA denaturation, ultraviolet absorbance spectra, automatic analysis, thermodynamics

1. ÚVOD

Nukleové kyseliny se vyznačují značným konformačním polymorfismem. Netvoří jen klasickou B-DNA dvoušroubovici, ale i mnoho dalších forem, které jsou označovány za alternativní. Alternativní konformace mohou být funkčně významné, protože se často uplatňují při genové expresi a rekombinančních dějích. Například konformace G-kvadruplexu se v genomu vyskytuje na biologicky významných místech, jako jsou telomerní sekvence, kde kvadruplexy dokáží blokovat funkci telomerázy, čímž v důsledku zabraňují proliferaci nádorových buněk. Tyto alternativní konformace, jako například guaninové a cytozinové kvadruplexy, DNA triplexy, vlásenky a Z-DNA, také nabízí velký potenciál pro autoregulační funkci DNA. Proto je určení struktury nukleových kyselin, například jakýchkoli jiných molekul, základním krokem nezbytným k porozumění jejich funkci [3].

2. NÁVRH ALGORITMU PRO ANALÝZU UV ABSORPČNÍCH SPEKTER

Pomocí navrženého algoritmu je možné analyzovat data získaná ze spektrofotometru Cary 4000 od firmy Varian. Tento spektrofotometr poskytuje data ve formátu csv. Některé firmy poskytují k spektrofotometru vlastní software. Jako příklad lze uvést nástroj HyTher, nebo KaleidaGraph od firmy Synergy Software. V mnoha případech však tato přímočará analýza není vhodná, protože může vést ke zkreslené interpretaci dat.

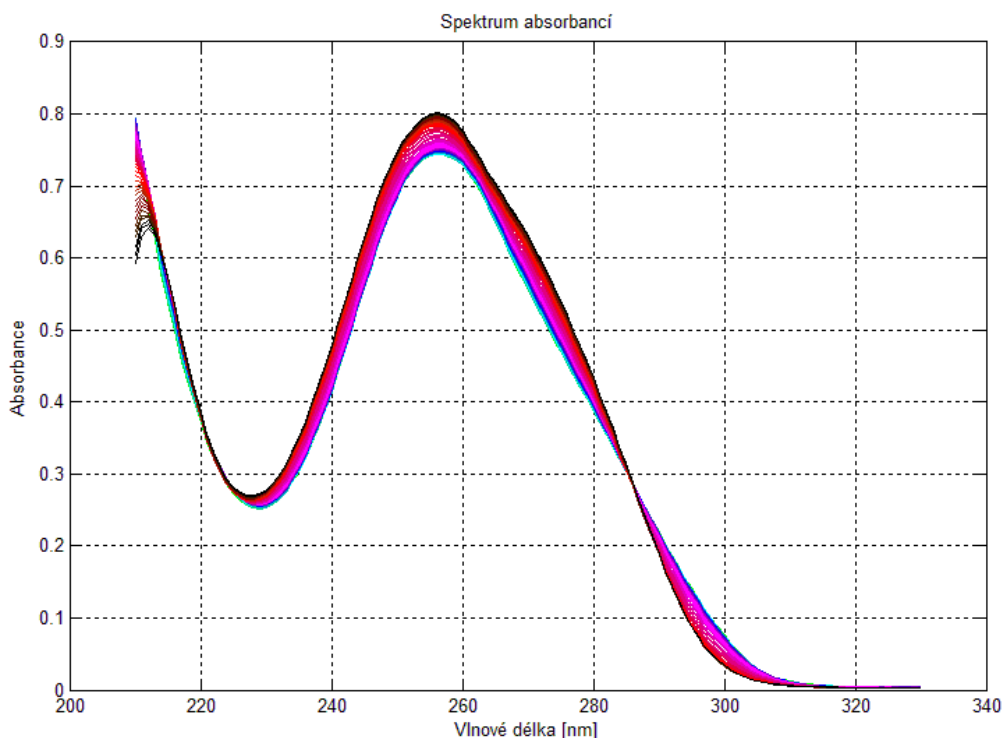
2.1. PRŮBĚH EXPERIMENTU

Měříme-li absorbanci vzorku DNA pro určitou vlnovou délku při současném zahřívání, pozorujeme změny odrážející konformační přechody ve zkoumaném vzorku. Zahříváním vzorku DNA v rozmezí 30 – 100°C dojde k porušení vodíkových vazeb (tzv. denaturace DNA), přičemž vznikají samostatné polynukleotidové řetězce. K denaturaci DNA dochází i v alkalickém prostředí. Nukleové kyseliny jsou výjimečné svojí schopností renaturace, tedy opětovným vytvořením vodíkových vazeb pomalým ochlazováním denaturovaných vláken. Těto vlastnosti se využívá u hybridizace molekul DNA.

Analýzou dat získaných na základě denaturačních experimentů obdržíme termodynamické parametry, ze kterých jsme schopni odvodit stabilitu biologických systémů.

2.2. POPIS ALGORITMU

Na vstup programu přichází soubor generovaný spektrofotometrem, který obsahuje hodnoty absorbancí měřených při měnící se vlnové délce a teplotě. Tato data nejdříve zpracuje cyklus, který je rozdělí podle delimiteru a uloží do vhodných proměnných. Program poté vykreslí spektrum absorbancí, jak ukazuje graf na obrázku 1. Toto spektrum slouží uživateli jako přehled, podle kterého určí vhodnou vlnovou délku. Nejvhodnější jsou ty vlnové délky, u kterých na obrázku 1. pozorujeme velký rozptyl absorbancí. Pro tyto vlnové délky je metoda nejpřesnější a nejcitlivější. Obvykle se používají hodnoty kolem 250 – 260 nm. Pro kvadruplexy je typický výrazný rozptyl v oblasti 295 nm, jak je tomu patrné na obrázku 1. Program uživateli umožňuje, buď aby zadal přímo vlnovou délku, pro kterou chce, aby proběhla analýza, a nebo může zadat rozsah vlnových délek, ve kterém očekává nalezení vhodné vlnové délky. Pro tento rozsah program odečtením křivek s nejvyššími a nejnižšími hodnotami absorbancí vypočítá diferenční spektrum a v maximum tohoto spektra uloží vhodnou vlnovou délku.



Obrázek 1: Spektrum absorbancí.

Program následně vykreslí křivku tání, viz. grafy na obrázku 2 a), které znázorňují postupnou denaturaci vzorku (pokles absorbance) se zvyšující se teplotou. Podle charakteru experimentu může křivka stoupat, nebo naopak klesat. Nyní určíme horní a dolní základny, které poslouží jako referenční hodnoty pro další analýzu. Každá ze základen odpovídá svinuté, nebo rozvinuté formě DNA. Horní i dolní základna je konstantní vůči y ose. Tyto konstanty odpovídají hodnotě maxima a minima křivky tání. Aplikací vzorce

$$\theta_T = [A(T) - A_D(T)] / [A_H(T) - A_D(T)], \quad (1)$$

kde $[A(T) - A_D(T)]$ odpovídá vzdálenosti od dané hodnoty křivky tání k dolní základně a $[A_H(T) - A_D(T)]$ vzdálenosti od horní základny k dané hodnotě křivky tání, přeškálujeme křivku tání na novou křivku, která na y ose nabývá hodnot mezi 0 a 1, viz. obrázek 2 b). Tato křivka je popsána funkcí, která se značí θ a je popsána v rovnici (1) [1, 2]. Program umožňuje zároveň analyzovat data z více denaturačních experimentů a vykreslit do jednoho grafu více průběhů, což uživateli po-

skytne možnost vizuálně porovnat jednotlivé křivky a jejich parametry. Všechny vykreslené průběhy je možné exportovat ve formátu xls pro další zpracování.

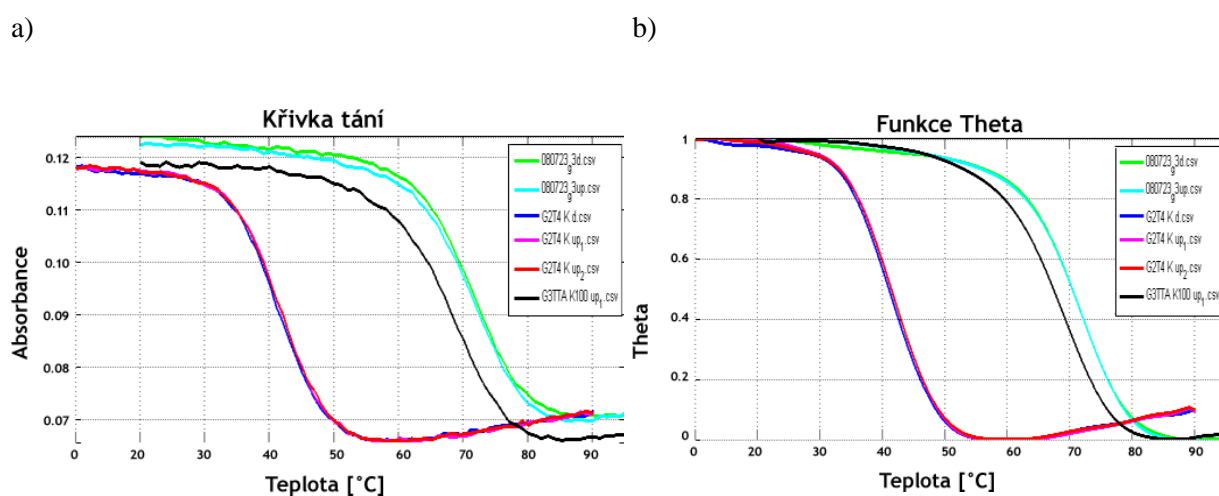
2.3. URČENÍ TERMODYNAMICKÝCH PARAMETRŮ

Hodnotu mezní teploty T_m [°C] určíme z grafu funkce θ , jako teplotu která odpovídá $\theta_T = 0,5$. Tato teplota odpovídá stavu, kdy je přesně 50% vzorku denaturovaných.

Druhým výsledným termodynamickým parametrem je entalpie (ΔH [J]), která popisuje množství tepla vygenerovaného nebo spotřebovaného denaturačním přechodem při konstantním tlaku. Van't Hoffovu entalpii vyjádříme jako

$$\Delta H_{VH} = (2 + 2n)RT_m^2 \left(\frac{\delta\theta}{\delta T} \right)_{T=T_m}, \quad (2)$$

kde n je molekularita a R je rovnovážná plynová konstanta [1, 2].



Obrázek 2: a) Křivky tání. b) Funkcí θ přeškalované křivky tání.

3. ZÁVĚR

Praktickým výstupem této práce je program, který zpracovává genomická data z spektrofotometru užívaného při analýze denaturačních experimentů určujících stabilitu zkoumaných vzorků DNA a RNA. Tento program automatizuje a usnadňuje uživatelem řízenou analýzu výstupních dat, kterou by jinak uživatel ručně a zdlouhavě prováděl v některém z tabulkových editorů.

REFERENCE

- [1] Mergny, J.-L., Lacroix L.: Analysis of Thermal Melting Curves. In Oligonucleotides, Mary Ann Liebert, Inc., 2003, 13:515-575
- [2] Mergny, J.-L., Lacroix L.: UV Melting of G-Quadruplexes. In Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry, Wiley Interscience, 2009, 17.1.1-17.1.15
- [3] Ohyama, T.: DNA Conformation and Transcription. Springer, 2005, 211 s.