



TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI
Fakulta mechatroniky, informatiky
a mezioborových studií ■

DNA origami nanostruktury pro studium radiosenzitizačního efektu nanočástic

Bakalářská práce

M17000119

Studijní program: B3942 – Nanotechnologie
Studijní obor: 3942R002 – Nanomateriály

Autor práce: **Agnes Zerolová**
Vedoucí práce: Mgr. Jaroslav Kočišek, Ph.D.
Konzultant: Ing. Dan Reimitz





TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI
Fakulta mechatroniky, informatiky
a mezioborových studií ■

DNA origami nanostructures for studying the radiosensitizing effect of nanoparticles

Bachelor's thesis

M17000119

Study programme: B3942 – Nanotechnology
Study branch: 3942R002 – Nanomaterials

Author: **Agnes Zerolová**
Supervisor: Mgr. Jaroslav Kočišek, Ph.D.
Consultant: Ing. Dan Reimitz





Zadání bakalářské práce

DNA origami nanostruktury pro studium radiosenzitizačního efektu nanočástic

Jméno a příjmení: **Agnes Zerolová**
Osobní číslo: M17000119
Studijní program: B3942 Nanotechnologie
Studijní obor: Nanomateriály
Zadávací katedra: Katedra chemie
Akademický rok: **2020/2021**

Zásady pro vypracování:

Cílem projektu je příprava DNA origami nanostruktur pro selektivní studium radičního poškození sekvencí DNA v přítomnosti solventu a zlatých nanočástic.

DNA origami nanostruktury jsou připravovány programovaným skládáním dlouhého vlákna DNA. Cílem práce bude příprava nanostruktur s navázanými řetězci DNA a zlatými nanočásticemi v přesně definované vzdálenosti. Tyto dále umožní studium vlivu zlatých nanočástic jako radiosenzitizérů na poškození DNA ionizujícím zářením.

Student

1. Uskuteční rešerši problematiky přípravy kombinovaných (DNA origami – DNA – AuNP) struktur.
2. Připraví čisté origami nanostruktury, origami struktury s navázanými sekvencemi DNA a s navázanými zlatými nanočásticemi samostatně a v kombinaci.
3. Vzorky nanese na Si povrch a zanalyzuje AFM a případně dalšími dostupnými metodami.
4. Zoptimalizuje metodiku přípravy vzorku a jejich analýzy pro další experimenty s radičním poškozením.

Část projektu se uskuteční ve spolupráci s ÚFCH J. Heyrovského AV ČR v Praze, část může být realizována na zahraničních spolupracujících pracovištích v Potsdam (DE) a synchrotronu Elettra v Trieste (IT).

Rozsah grafických prací:
Rozsah pracovní zprávy:
Forma zpracování práce:
Jazyk práce:

dle potřeby dokumentace
min. 35 stran
tištěná/elektronická
Čeština



Seznam odborné literatury:

1. Rothemund, P. W. K., Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns, *Nature*, 440, 297-302. (2006)
2. Chandrasekaran, A.R., Beyond the Fold: Emerging Biological Applications of DNA Origami. *Chembiochem*. 17, 1081-9. (2016)
3. Hartl, C. et al. Position Accuracy of Gold Nanoparticles on DNA Origami Structures Studied with Small-Angle X-ray Scattering. *Nano Letters*. 18(4), 2609-2615. (2018)
4. Small. New Jersey: Wiley Publishing. June 26, 2019. 26/2019, Volume 15, Special Issue: Advances in DNA Nanotechnology. ISSN 1210-5139.

Vedoucí práce:

Mgr. Jaroslav Kočíšek, Ph.D.
Ústav fyzikální chemie J. Heyrovského AV ČR

Datum zadání práce:

9. října 2020

Předpokládaný termín odevzdání:

17. května 2021

prof. Ing. Zdeněk Plíva, Ph.D.
děkan

L.S.

prof. Ing. Josef Šedlbauer, Ph.D.
vedoucí katedry

Prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně jako původní dílo s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím mé bakalářské práce a konzultantem.

Jsem si vědoma toho, že na mou bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

Beru na vědomí, že Technická univerzita v Liberci nezasahuje do mých autorských práv užitím mé bakalářské práce pro vnitřní potřebu Technické univerzity v Liberci.

Užiji-li bakalářskou práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědoma povinnosti informovat o této skutečnosti Technickou univerzitu v Liberci; v tomto případě má Technická univerzita v Liberci právo ode mne požadovat úhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla, až do jejich skutečné výše.

Současně čestně prohlašuji, že text elektronické podoby práce vložený do IS STAG se shoduje s textem tištěné podoby práce.

Beru na vědomí, že má bakalářská práce bude zveřejněna Technickou univerzitou v Liberci v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů.

Jsem si vědoma následků, které podle zákona o vysokých školách mohou vyplývat z porušení tohoto prohlášení.

13. 5. 2021

Agnes Zerolová

DNA origami nanostruktury pro studium radiosenzitizačního efektu nanočástic

Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá metodou DNA origami. V rešeršní části práce jsou popsány různé přístupy přípravy a analýzy nanostruktur na bázi DNA. Rovněž jsou zmíněny hlavní oblasti využití těchto nanostruktur. Hlavním výsledkem experimentální části je optimalizace přípravy a depozice 2D DNA origami nanostruktur ve tvaru trojúhelníku se stranou ~ 120 nm a její modifikace zlatými nanočásticemi (~ 10 nm) pro další experimenty. Kromě optimalizace přípravy nanostruktur byly také provedeny vlastní experimenty studující poškození těchto nanostruktur ionizujícím zářením a první *in-singulo* experimenty studující radiační poškození DNA fragmentů na těchto nanostrukturách.

Klíčová slova: AuNP; DNA; DNA origami; DNA nanotechnologie; nanočástice; samoskládání; ssDNA; rakovina

DNA origami nanostructures for studying the radiosensitizing effect of nanoparticles

Abstract

The present bachelor's thesis is focused on the method of DNA origami. The literature survey part of the work overviews the main approaches to self-assembled DNA nanostructures and describes the common methods of their visualization and analysis. The main uses of these nanostructures in practice are also mentioned. The main result of the experimental part of the present thesis is optimization of preparation procedures of DNA origami for further experiments with ionizing radiation. Triangular DNA origami were prepared with a side length of ~ 120 nm and their variants modified by gold nanoparticles with a diameter of ~ 10 nm. In addition to the optimization, further individual research were made into the damage of these nanostructures made by ionizing radiation and first *in-singulo* experiments studying radiation damage of DNA fragments on these nanostructures.

Keywords: AuNP; cancer; DNA; DNA origami; DNA nanotechnology; nanoparticles; self-assembly; ssDNA

Poděkování

Děkuji svému školiteli Mgr. Jaroslavu Kočiškovi, Ph.D. za odborné vedení celé práce, jakož i rady a pomoc poskytnuté při jejím vypracování. Taktéž děkuji konzultantům Ing. D. Reimitzovi a L. A. Salovi, Ph.D. za veškerou pomoc a rady. Dále bych chtěla poděkovat Ing. V. Petrákové, Ph.D. Taktéž děkuji Ústavu fyzikální chemie J. Heyrovského AV ČR a Ústavu jaderné fyziky AV ČR za poskytnutí příležitosti. V poslední řadě bych chtěla poděkovat své rodině a svým přátelům za jejich podporu.

Obsah

Seznam zkratek	9
1 Úvod	10
2 Teoretická část	11
2.1 DNA	13
2.1.1 Fyzikální a chemická struktura	14
2.1.2 Konformace	15
2.2 DNA origami	17
2.2.1 Příprava DNA origami	18
2.2.2 Design DNA origami	20
2.2.3 Modifikace	22
2.3 Využití DNA origami	25
2.3.1 Lékařství	25
2.4 Zobrazovací metody	28
2.4.1 AFM	28
2.4.2 Elektroforéza	29
3 Experimentální část	32
3.1 Použité chemikálie a roztoky	32
3.1.1 Použité chemikálie	32
3.1.2 Použité roztoky	32
3.2 Použité přístrojové vybavení	33
3.3 Použitý software	34
3.4 Příprava DNA origami	34
3.5 Příprava DNA origami se zlatými nanočásticemi	34
3.5.1 Příprava zlatých nanočástic funkcionalizovaných DNA	35
3.5.2 Hybridizace DNA origami se zlatými nanočásticemi	35
3.6 Depozice na Si povrch	36
3.7 Záření gama	37
3.8 Agarózová gelová elektroforéza	37
3.9 Výsledky a diskuze	39
4 Závěr	44
Použitá literatura	45

Seznam zkratek

A	adenin
AFM	mikroskopie atomárních sil
AuNP	zlaté nanočástice
BSPP	Bis(p-sulfonatophenyl)phenylphosphine dihydrate dipotassium salt
buffer	pufr
C	cytosin
DDS	cílené dodávání léčiv
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DOX	doxorubicin
dsDNA	dvouvláknová DNA
E. coli	Escherichia coli
EPR	efekt zvýšené permeability a retence
EtBr	ethidium bromid
G	guanin
GE	gelová elektroforéza
Gy	gray
H	vodík
IR	infračervené záření
kb	kilobáze
major groove	velký žlábek
MeV	megaelektronvolt
Mg²⁺	hořečnatý kation
minor groove	malý žlábek
NaCl	chlorid sodný
NK	nukleové kyseliny
nt	nukleotidy
PDT	fotodynamická terapie
RNA	ribonukleová kyselina
s	pevné skupenství
scaffold	základní vlákno
scaffold fragments	úlomky základního vlákna
Si	křemík
SPM	mikroskopie skenující sondou
ssDNA	jednovláknová DNA
staple strands	spojovací vlákna
STM	mikroskopie tunelovacího proudu
T	thymín
TAE	Tris-acetát-EDTA
TBE	Tris-borát-EDTA
U	uracil
UV	ultrafialové světlo
V	volt

1 Úvod

Tato bakalářská práce má blíže seznámit čtenáře s metodou přípravy nanostruktur skládáním řetězce DNA, tzv. DNA origami a možností jejich využití ke studiu radiačního poškození DNA sekvencí v *in-singulo* experimentech.

V *in-singulo* experimentech slouží DNA origami jako podložka, na kterou lze v předem určených pozicích navázat krátké segmenty DNA. V případě, že sekvence segmentů jsou různé, je možné vyhodnotit relativní odezvu jednotlivých sekvencí na podnět. Výhodou DNA origami je minimální spotřeba vzorku, experimenty probíhají na jednotlivých molekulách. Každá nanostruktura totiž představuje jeden experimentální vzorek, který obsahuje právě zvolený počet studovaných molekul, obvykle 2, 4 nebo 6. Na každý vzorek DNA origami se dá navázat více molekul. Pro porovnání, nejsenzitivnější analytické UV-Vis spektrometry "NanoDrop" dokáží pracovat se vzorky o velikosti kapky (1 μ l) a koncentracemi v nM oblasti, řádově tedy 10^8 molekul na jeden experiment. Spotřeba vzorku při použití DNA origami je tedy až o 8 a víc řádů menší.

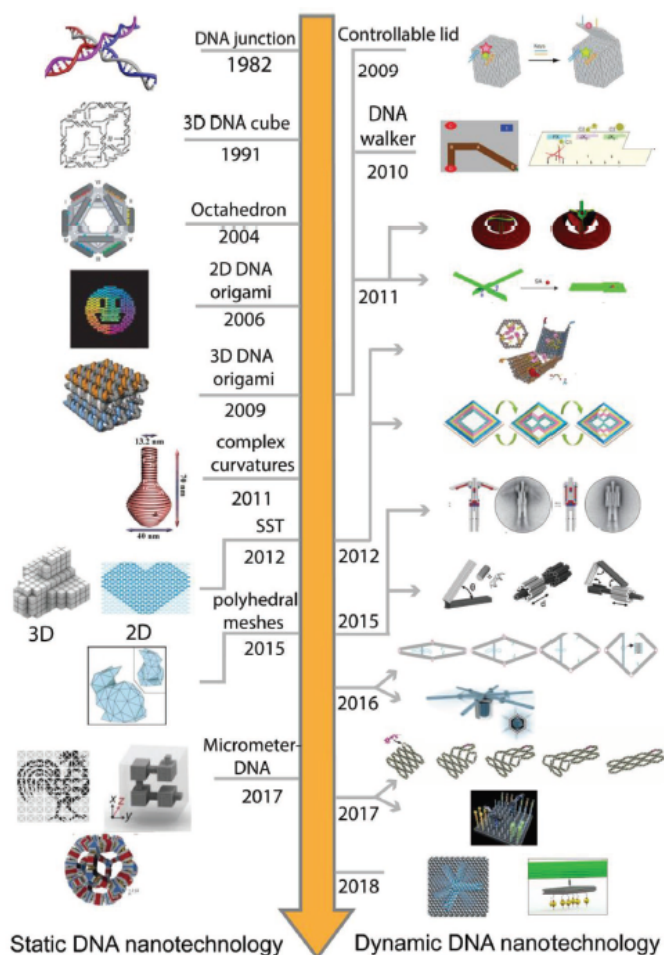
Přístup DNA origami byl již aplikován v mnoha experimentech, včetně experimentů s ionizujícím zářením, kterých je však o poznání méně. Cílem práce proto bylo připravit vhodné DNA origami nanostruktury a vyladit metodiku jejich použití v experimentech s ionizujícím zářením.

Práce se skládá z teoretické části a experimentální části. Teoretická část práce popisuje DNA jako důležitou biologickou molekulu i jako materiál vhodný k přípravě biokompatibilních nanomateriálů. Kapitola 2.1 popisuje vlastnosti DNA, které jsou nezbytné k pochopení přípravy DNA origami. Kapitola 2.2 detailně popisuje přípravu DNA origami trojúhelníků (kapitola 2.2.2) a jejich následnou modifikaci zlatými nanočásticemi (kapitola 2.2.3). Závěr teoretické části se zabývá metodami mikroskopie atomárních sil a gelové elektroforézy, které byly použity k analýze připravených DNA origami. Experimentální část je předmětem 3. kapitoly. V kapitolách 3.1 až 3.8 detailně popisují postupy přípravy a analýzy DNA origami, které jsem uskutečnila. Část 3.9 je pak věnována výsledkům mých experimentů a jejich diskuzi.

2 Teoretická část

Ačkoliv je DNA origami metodou 21. století, první myšlenky o využití DNA jakožto konstrukčního materiálu se objevily již v 80. letech minulého století.

Jak je znázorněno na obrázku 2.1, DNA nanotechnologie byla založena na konceptu N. Seemana, který v roce 1982 poprvé navrhnul použití DNA jako konstrukčního materiálu pro sestavení geometricky definovaných objektů v nanoměřítku [1][2]. Tato myšlenka byla zcela revoluční na danou dobu, protože polymer nukleové kyseliny byl výhradně konstrukčním materiálem v molekulární genetice [1].



Obrázek 2.1: Časová osa vývoje statické a dynamické DNA nanotechnologie [3].

Díky komplementaritě bází tvořící DNA, kterou popisují Watson-Crickova pravidla, mohly být vyvinuty pevné rozvětvené útvary skládající se ze čtyř jednovlákněných oligonukleotidů [2][3]. Výsledné struktury, často nazývané DNA dlaždice, lze použít jako stavební materiál pro sestavení složitých a vícerozměrných objektů nebo nekonečně se opakujících mříží prostřednictvím soudržnosti přilnavých konců [1][2][3].

Později Seeman a jeho spolupracovníci vytvořili různé nanostruktury DNA založené na rozvětvených tvarech s více rameny. Avšak kvůli nízké pevnosti rozvětvených spojení DNA docházelo k velmi častému výskytu nežádoucích nepravidelných struktur. Aby se předešlo tomuto problému, tak modifikované rozvětvené spojení DNA bylo vytvořeno tak, aby vytvářelo pevné a definované nanostruktury podle návrhu P. Rothemunda [3][4].

DNA nanotechnologie se posléze vyvinula v rozmanitý obor a s vývojem nových technik v oblasti DNA nanotechnologie dochází ke snadnému zhotovení různých vzorů z různých složek, které mají velký potenciál pro využití [1][5]. Od té doby se DNA používá jako konstrukční materiál v oblasti nanotechnologie pro výrobu 2D a 3D mříží, nanozařízení, biosenzorů, DNA origami, optických senzorů, nanofotonických zařízení, nanorobotiky, atd. [5][6]. Vzhledem ke snadné přípravě DNA origami se tato metoda hojně využívá v oblasti výzkumu [6]. DNA origami je vhodná pro *in-singulo* experimenty, jelikož se skládá do přesně definovaných struktur. Každé vlákno může sloužit k navázání různých nanoobjektů a léčiv. Proto je tedy vhodná pro přesné navazování a k jednomolekulové analýze [7].

2.1 DNA

Nukleové kyseliny jsou nositeli genetických informací a dělí se na dva typy - DNA a RNA. V souvislosti s tématem této práce je pozornost věnována deoxyribonukleové kyselině, neboli DNA [8].

Roku 1869 Friedrich Miescher izoloval z jádra buněk látku, kterou nazval nuklein. Na něho navázal Albrecht Kossel, který zjistil, že se nuklein skládá ze čtyř bází a molekul cukru. Za tento objev Kossel získal Nobelovu cenu (1910). Avšak dlouho po Miescherově smrti byli vědci přesvědčeni, že jen složité bílkoviny jsou nositeli genetické informace. Až v roce 1944 Oswald T. Avery prokázal, že DNA je nositelem genetické informace. Na tento objev následně v roce 1953 navázali James Watson a Francis Crick, kdy v časopise *Nature* publikovali práci popisující strukturu DNA jako pravotočivou dvoušroubovici, jak je znázorněno na obr. 2.2. [9][10][11].



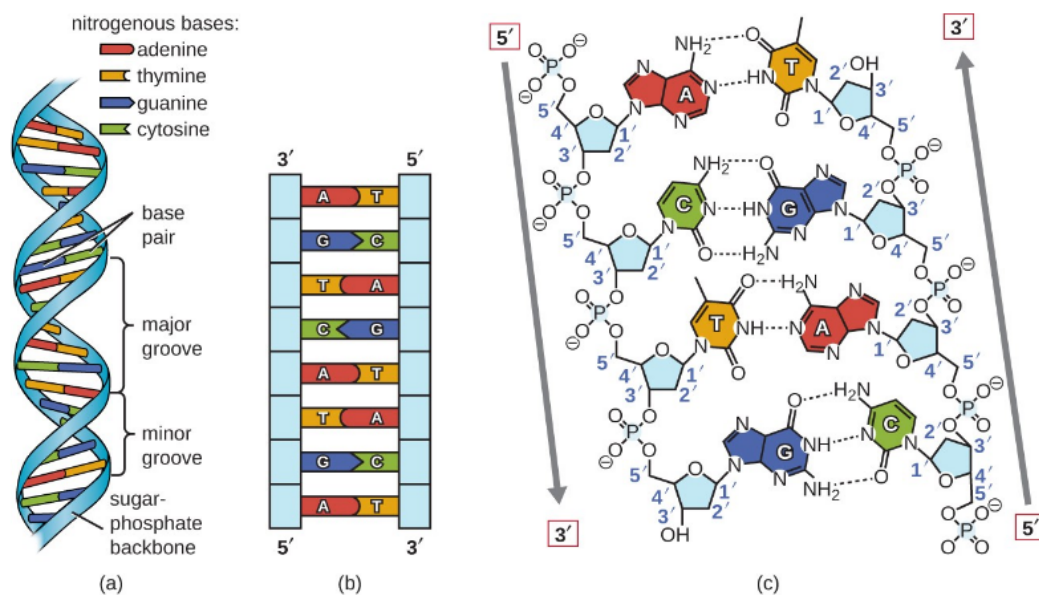
Obrázek 2.2: Schéma struktury DNA podle Watsona a Cricka [11].

DNA je polymer skládající se ze čtyř různých nukleotidů. Každý nukleotid se skládá ze tří základních jednotek: β -D-2-deoxyribózy (pěti-uhlíkatý cukr), nukleové báze (dusíkatá heterocyklická báze připojená k prvnímu uhlíku v deoxyribóze) a fosfátové skupiny (připojené k pátému uhlíku v deoxyribóze) [8]. Nukleotid se od nukleosidu liší přítomností fosfátové skupiny [12].

Dusíkaté báze se dělí na pyrimidinové a purinové. Mezi pyrimidinové báze patří C a T, zatímco A a G jsou báze purinové [12]. Každá molekula DNA obsahuje stejné množství purinů a pyrimidinů [8].

2.1.1 Fyzikální a chemická struktura

Watson a Crick v roce 1953 sepsali soubor pravidel pro párování bází. A tvrdili, že nejstabilnější páry jsou A-T a G-C, jak je vidět na obr. 2.3 [13]. Tyto báze drží pospolu díky vodíkovým můstkům, které jsou krátké a nekovalentní. Tyto vodíkové můstky vznikají mezi atomem H (donor) a parciálním nábojem (akceptor), ať už kladně nebo záporně nabitým. Nejčastěji tyto parciální náboje najdeme u karbonylových sloučenin (—C=O) nebo dusíku (N:) [12].



Obrázek 2.3: Detailní schéma DNA. a) Hlavní řetězce jsou tvořeny vazebným zbytkem od kyseliny fosforečné navázaným na deoxyribózu. Spárované nukleové báze drží řetězce pohromadě. b) Tyto dva řetězce jsou navzájem antiparalelní. c) Směr každého řetězce je očíslován podle počtu uhlíků (1 až 5) v každé molekule deoxyribózy. Na uhlík označený jako 5' na konci řetězce 5' není navázán žádný nukleotid. Totéž platí pro uhlík označený jako 3' na konci řetězce 3' [14].

Jedinečnou strukturu DNA charakterizují - dvoušroubovice, antiparalelní řetězce, párování bází a vodíkové můstky mezi vlákny DNA. Dva paralelní řetězce drží pospolu díky vodíkovým můstkům, které se vytvoří při párování bází. Také hydrofobní charakter bází a hydrofilní charakter hlavního řetězce (fosfodiesterová vazba) pomáhá ke stabilizaci dvoušroubovice. Tyto hydrofilní skupiny jsou umístěny vně hlavního řetězce DNA a hydrofobní uvnitř. Díky antiparalelnímu natočení řetězců se vinou doprava, z toho vyplývá zavedení pojmu pravotočivá dvoušroubovice. Jelikož N-glykosidické vazby řetězců mezi deoxyribózou a bázemi nejsou naproti sobě, pak spárované báze vytvoří tzv. malý (minor groove) a velký (major groove) žlábek na druhé straně šroubovice (viz obr. 2.3). Malý žlábek je důležitý pro navazování léčiv na DNA při cílené terapii [8][15].

2.1.2 Konformace

V přírodě existují tři typy forem DNA - A, B a Z forma, jejichž schéma je znázorněno na obr. 2.4 [8][12].

A forma

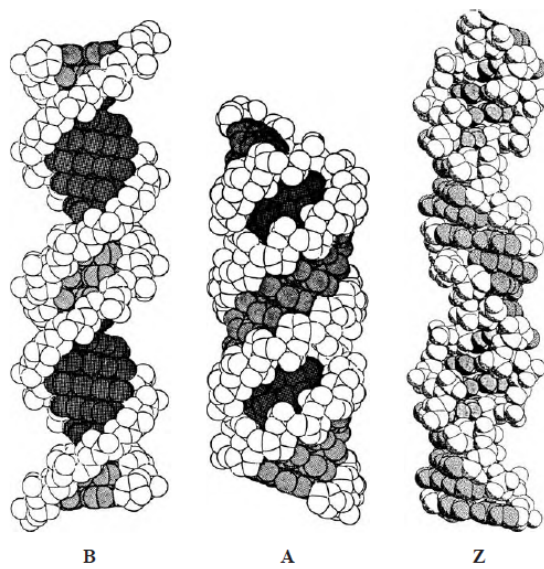
Struktura A formy byla původně stanovena rentgenovou difrakční analýzou ve vláknech DNA za relativní vlhkosti 75 %. V této formě se vyskytuje 11 párů bází v závitě pravotočivé dvoušroubovice a vzdálenost mezi dvěma přilehlými bázemi je 0,23 nm (2,3 Å). Báze jsou vůči vertikální ose nakloněny v úhlu 20°, a díky tomu je A forma mnohem kompaktnější než B forma. Velký žlábek je užší a malý žlábek je širší než u B formy.

B forma

Struktura B formy byla stanovena rentgenovou difrakční analýzou ve vláknech DNA za relativní vlhkosti 92 %. V této formě se vyskytuje 10 párů bází v závitě pravotočivé dvoušroubovice. Skutečná pravotočivá DNA má v roztoku průměrně 10,5 párů bází v závitě. Vzdálenost mezi dvěma přilehlými bázemi je 0,34 nm (3,4 Å). Hlavním rysem této formy je existence velkého a malého žlábků, jehož funkce je popsána v odstavci výše. B forma může přecházet do A formy v prostředí s vysokou koncentrací soli nebo v alkoholovém roztoku.

Z forma

Z forma je od předchozích dvou forem odlišná ve směru rotace, tedy se jedná o levotočivou dvoušroubovici. Je součástí buněk bakterií a vyskytuje se i v lidském těle (DNA). V této formě se vyskytuje 12 párů bází v závitě levotočivé dvoušroubovice a vzdálenost mezi dvěma přilehlými bázemi je 0,38 nm (3,8 Å). Dalším rozdílem je hloubka a šířka velkého a malého žlábků. Z forma může vzniknout například střídáním sekvencí purinových a pyrimidových bází (5'-pCGCGCGCGCG-3'OH), která upřednostňuje tuto opakující se sekvenci bází. Díky objevení této konformace se v budoucnosti tato forma DNA může využít na replikaci, rekombinaci či transkripci DNA. Formuje se v prostředí s vysokou koncentrací soli nebo v roztoku dvojmocných kationtů.



Obrázek 2.4: Schéma konformace DNA. Zleva B forma (pravotočivá), A forma (pravotočivá) a Z forma (levotočivá) [13].

2.2 DNA origami

DNA origami, název převzatý od papírové origami, je používanou technikou pro sestavování přesně definovaných struktur v nanoměřítku, které lze následně funkcionalizovat [1][16][17]. Rozměry těchto struktur jsou omezeny délkou základního vlákna (scaffold), dosahují rozměrů desítek až stovek nanometrů [18][19].

DNA může vytvářet pevné rozvětvené tvary, které lze dále spojovat pomocí přílnavých konců a vytvářet tak mechanicky tuhé struktury a mřížky vyšších řádů [19][20]. Znalost vlastností DNA je proto nesmírně důležitá nejen pro efektivní konstrukci DNA origami struktur, ale především pro lepší pochopení složitých genetických mechanismů DNA [21].

Technika výroby DNA origami zahrnuje skládání dlouhého základního vlákna, které je navrženo tak, aby se složilo do požadovaného tvaru a drželo pohromadě pomocí spojovacích vláken (staple strands) [22][23].

Typickým základním vláknem je dlouhá jednovláknová DNA (ssDNA), ke které se při výrobě DNA origami přidá 120 - 200 syntetických oligonukleotidů (spojovacích vláken) dlouhých 15 - 60 nt, aby se základní vlákno ohnulo do požadovaného tvaru [16][20][22].

Výroba ssDNA

Od objevu bakteriofága M13, v roce 1963 Hofschneiderem, se jeho varianty ssDNA používají jako základní vlákno na přípravu DNA origami. Běžně používaným základním vláknem je purifikovaná ssDNA M13mp18, která je komerčně dostupná, a jejíž délka je 7249 nt [24][25][26]. Nevýhodou M13mp18 je vysoká pravděpodobnost štěpení vlákna, což znesnadňuje analýzu na molekulární úrovni [22].

Řada DNA origami vyžaduje gramové výtěžky, a tak bylo vyvinuto mnoho metod, jak proces výroby optimalizovat [27]. Hojně využívanou je produkce ssDNA využívající bakteriofágy a rychle rostoucí bakterie *E. coli* jako hostitele [27]. Výroba pomocí bakteriofágů byla doposud prováděna jednoduchým procesem postupného dávkování do Erlenmeyerovy baňky. Výtěžky purifikované ssDNA se pohybovaly v rozmezí 1 - 14 mg na jeden litr fermentovaného objemu. Ve skutečnosti se výtěžky nejčastěji pohybovaly okolo 4 mg na jeden litr fermentovaného objemu. Produkce jednoho gramu ssDNA tímto způsobem je velice obtížná, a proto Kick a spol. zefektivnili její výrobní proces. Ten je založen na vysoko-hustotní fermentaci bakterií *E. coli* infikovaných bakteriofágy v bioreaktoru za stálého míchání, kontrolovaného pH a s dodávkami rozpuštěného kyslíku a substrátu. Výtěžky vyráběné v bioreaktoru byly řádově v gramech na jeden litr fermentovaného objemu [27].

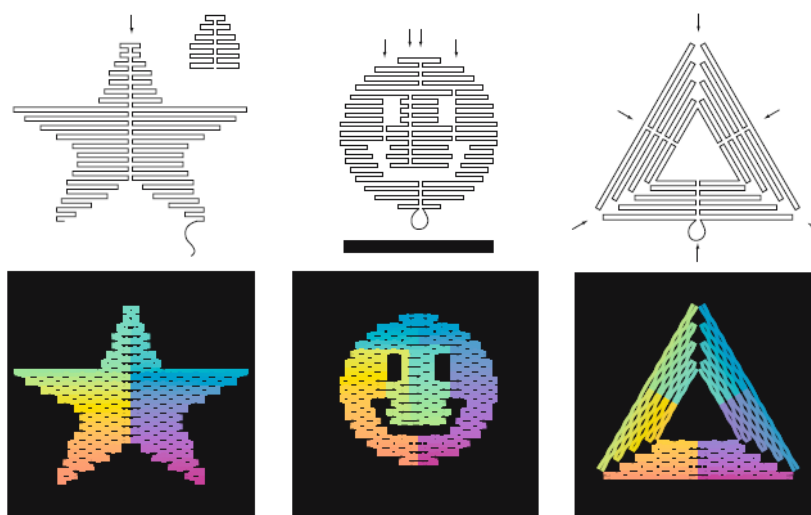
O dva roky později přišli s předpoklady pro produkci ssDNA o vysokých koncentracích pro průmyslové využití v nanotechnologii. Byla studována produkce fágů s vysokou hustotou *E. coli* s ohledem na složení média, dobu infekce, její multiplicitu a specifickou rychlost růstu. Specifická rychlost růstu buněk a multiplicita infekce

byly definovány jako klíčové proměnné, které ovlivňují rychlost amplifikace fágu na jedné straně a koncentraci produkované ssDNA na straně druhé [24].

I když bylo dosaženo významného pokroku s ohledem na optimalizaci výtěžků, dostupnost surovin (zejména kvalita a kvantita ssDNA) nakonec omezuje množství DNA origami, které lze vyprodukovat a následně využít [24][27]. Primárními oblastmi využití DNA origami nanostruktur proto zůstává farmacie s malou spotřebou materiálu a vysokou přidanou hodnotou, nanorobotika nebo *in-singulo* experimenty, kterými se věnuje i předložená práce [7][28].

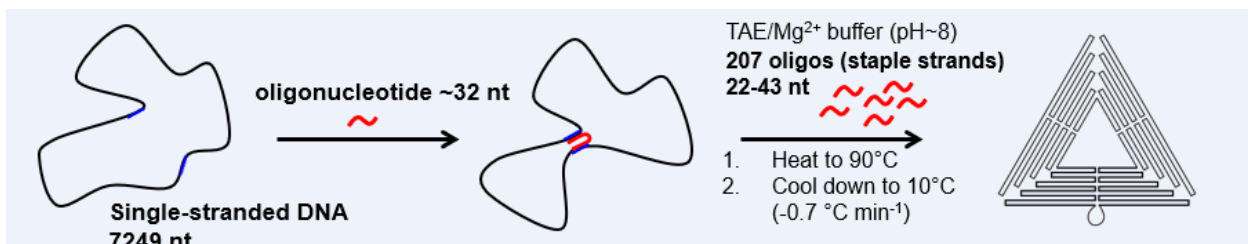
2.2.1 Příprava DNA origami

V roce 2006 Rothemund objasnil metodiku výroby DNA origami, která využívá ssDNA. Rothemund zkonstruoval několik různých tvarů DNA origami (viz obr. 2.5) o rozměrech přibližně 100 nm x 100 nm [4][29].



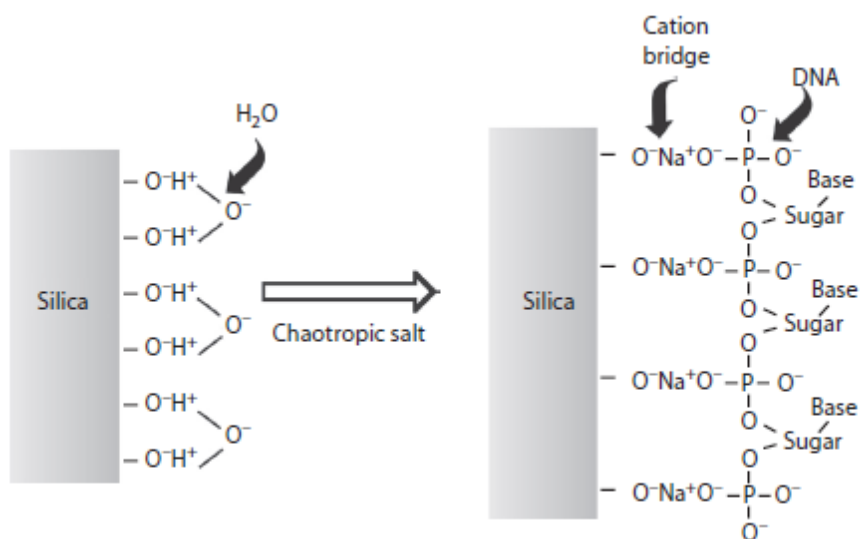
Obrázek 2.5: DNA origami vytvořené Rothemundem. Zleva hvězda, "smajlík" a trojúhelník [4].

DNA origami jsou vytvořena v jednom kroku, jak je znázorněno na obr. 2.6. ssDNA je smíchána se spojovacími vlákny v pufru TAE s vysokou koncentrací Mg^{2+} . Tato směs je následně zahřívána na 90 °C, dochází k tepelné denaturaci DNA, a později ochlazována na 10 °C v průběhu dvou hodin [30][31][32]. Interakce důležité v procesu samoskládání jsou obecně slabé a nekovalentní interakce, jako jsou vodíkové vazby, hydrofobní interakce, van der Waalsovy interakce, atd. [20].



Obrázek 2.6: Schéma přípravy DNA origami podle Rothemunda [4].

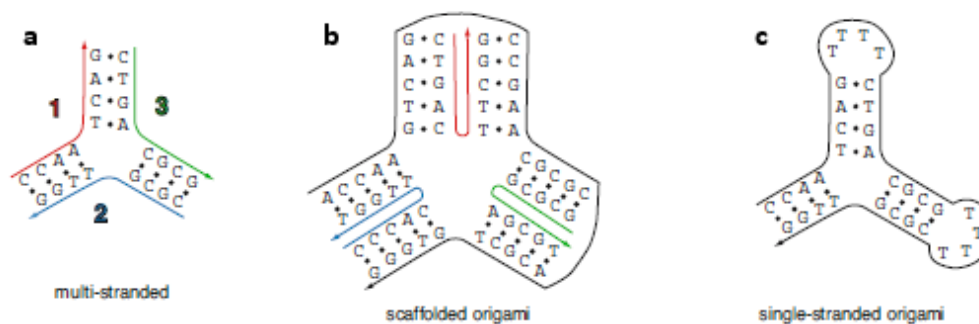
Pro zobrazení výsledného tvaru origami se používá mikroskopie atomárních sil, která vyžaduje depozici DNA origami na povrch. Na obr. 2.7 je znázorněna depozice DNA (origami) na čistý křemíkový povrch. Jelikož jsou DNA origami i Si povrch záporně nabitý, tak se k uchycení DNA k povrchu používá pufr TAE s vysokou koncentrací kladných iontů [4][32].



Obrázek 2.7: Depozice DNA (origami) na Si povrch [33].

2.2.2 Design DNA origami

Podle způsobu samoskládání Rothemund klasifikoval design DNA origami do tří kategorií (viz obr. 2.8): a) "více-vláknenný" (multi-stranded) design, složen pouze z oligonukleotidů b) "složený" (scaffolded) design, složen z jednoho dlouhého základního vlákna (černá) a spojovacích vláken (barevná) a c) "jedno-vláknenný" (single-stranded) design, složen z jednoho dlouhého základního vlákna a několika nebo žádného spojovacího vlákna. Poslední dva zmíněné designy jsou označovány jako DNA origami, protože základní vlákno je složeno ať už za pomoci spojovacích vláken nebo vzájemnými interakcemi (bez spojovacích vláken). Proto tyto dva designy se zdají býti dobrými kandidáty na vytvoření velkých a složitých struktur [30].



Obrázek 2.8: Přístupy k designu DNA nanostruktur [30].

Za účelem návrhu DNA origami byly vytvořeny různé programy. Prvotní myšlenkou bylo navrhnout strukturální osnovu s dostupným softwarem, jako je Adobe Illustrator a poté vygenerovat sekvence pomocí specifických programů, které by nahrály sekvenci M13. Tato metoda byla časově náročná, a proto bylo vyvinuto několik obecnějších softwarových programů [29].

Pro návrh 2D struktur se používají programy Tiamat a SARSE. V Tiamatu lze přidat molekuly ssDNA nebo dsDNA po jednom a spojit je buď podél řetězce, nebo napříč řetězci, aby se vytvořil motiv kříže. M13 nebo jiná sekvence základního vlákna je ručně přidána do programu a automaticky jsou vygenerována příslušná spojovací vlákna. SARSE funguje na principu vkládání bitmapových obrázků, ty se automaticky vyplní DNA pro vytvoření 2D struktur [29].

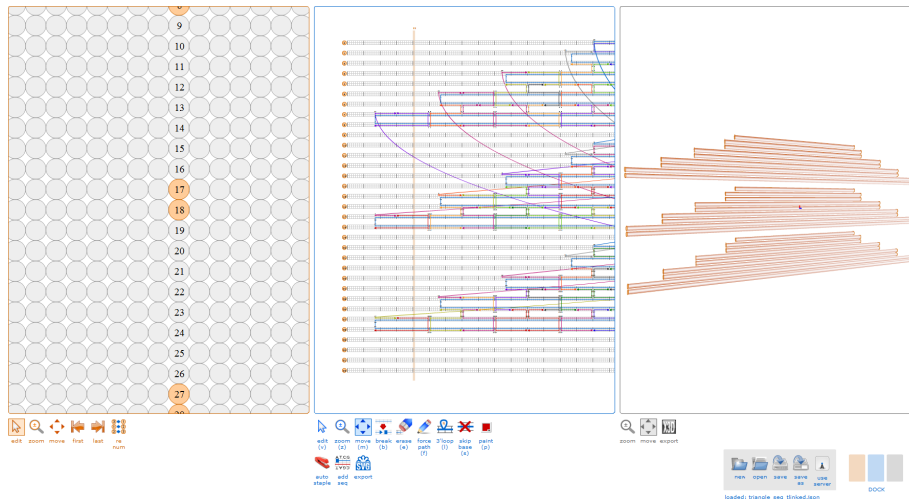
Jedním z nepoužívanějších programů je caDNAno, který umožňuje vytvořit spoj (crossover) mezi kterýmikoliv dvěma bázemi spojovacího nebo základního

vlákna, jak je znázorněno na obr. 2.9 [34].

Proces návrhu v caDNAno má 4 kroky [34]:

1. Cílový tvar je aproximován výběrem dráhy základního vlákna v rastru, který prochází mezi sousedními šroubovicemi podél antiparalelních spojů (crossover) v povolených pozicích.
2. Komplementární dráhy spojovacích vláken jsou přiřazeny k základnímu vláknu. Ve výchozím nastavení jsou zahrnuty všechny povolené spoje spojovacích vláken (staple crossover), kromě těch, jež budou vzdáleny 5 párů bází od spoje (crossover) mezi dvěma stejnými šroubovicemi základního vlákna.
3. Dráhy spojovacích vláken jsou rozděleny na kratší segmenty dlouhé 18 - 49 bází, obvykle se střední délkou 30 - 35 bází.
4. Nakonec je dráha základního vlákna vyplněna DNA sekvencemi požadovaného templátu (např. 7 - 8 kb vektoru genomu bakteriofága M13) a jsou předurčeny komplementární sekvence spojovacích vláken.

Bathe a spol. vyvinuli inovativní software CanDO pro strukturální analýzu, který pracuje společně s caDNAno [29]. Birac a spol. měli podobný cíl se softwarem GIDEON, ten na rozdíl od caDNAno navrhuje strategie designu pro více-vlákně DNA nanostruktury na základě geometrie [35].

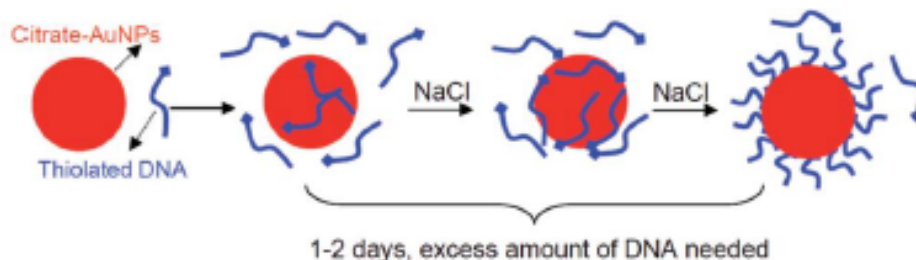


Obrázek 2.9: Program caDNAno pro vytvoření DNA origami ve tvaru trojúhelníku. Zleva, průřezový panel zobrazuje pohled na mřížku, do kterých mohou být uloženy šroubovice. Uprostřed, panel trajektorie poskytuje rozhraní pro editaci 2D nesrolovaných schémat drah základního a spojovacího vlákna. Napravo, panel vykreslující 3D model designu [autor].

2.2.3 Modifikace

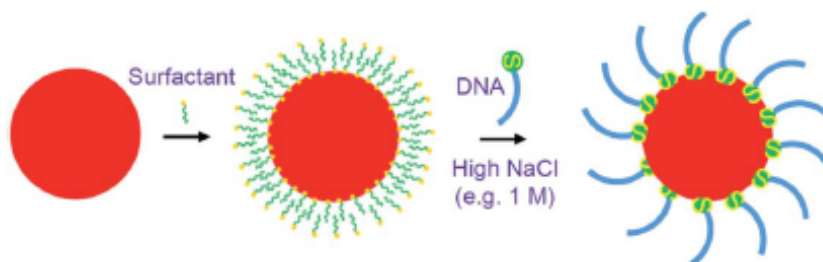
Jedním z cílů práce bylo modifikovat DNA origami zlatými nanočásticemi. Zlaté nanočástice jsou vhodné jako radiosenzitizéry díky své vysoké absorpci rentgenového záření, jedinečným chemickým, elektronickým a optickým vlastnostem [36]. Funkcionalizace DNA zlatými nanočásticemi přinesla pestrou škálu biosenzorů. AuNP mají vynikající optické vlastnosti, které se po funkcionalizaci na DNA využívají ve fotodynamické terapii [28][37]. Alivisatos a Mirkin prokázali, že DNA origami s přesně navázanými zlatými nanočásticemi (DNA origami-AuNP) lze použít jako referenci pro měření vzdáleností na úrovni nm [38].

Pro navázání AuNP na DNA (AuNP-DNA) se využívá metoda salt-aging (viz obr. 2.10). Tato metoda spočívá v tom, že syntetizované AuNP jsou smíchány s thiolovanou DNA. Syntetické nanočástice jsou dodávány v citrátovém roztoku zabraňujícím jejich agregaci. Jelikož DNA i AuNP jsou záporně nabitě, je zapotřebí dodat sůl, aby byly překonány vzájemné odpudivé elektrostatické síly. Díky soli se DNA naváže na nanočástici, ale také dochází k agregaci nanočástic. U úspěšného experimentu by barva AuNP měla během celého procesu zůstat červená, pokud se zbarví do modra, došlo k agregaci. Tato změna barvy je nevratná. Zkumavky a lahvičky použité pro tyto reakce musí být velmi čisté. AuNP mají tendenci adsorbovat nečistoty, což může ztěžovat připojení DNA. Kromě toho se AuNP mohou držet na stěnách zkumavek, což snižuje výtěžek [37].

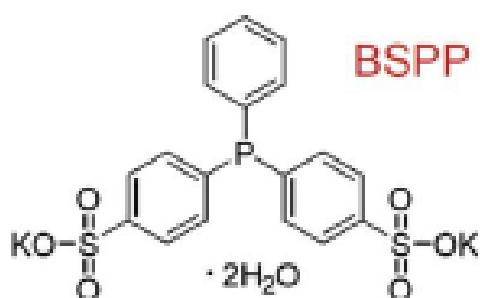


Obrázek 2.10: Metoda salt-aging [37].

Metoda salt-aging je časově náročná, proto se pro usnadnění konjugace a urychlení přípravy používají surfaktanty (povrchově aktivní látky) nebo malé molekuly či polymery, které zabraňují agregaci AuNP (viz obr. 2.11). Alivisatos a spol. vytěsnili citrát použitím ligandu BSPP, jehož vzorec je znázorněn na obr. 2.12 [37]. Stejný postup byl použit i v této práci.

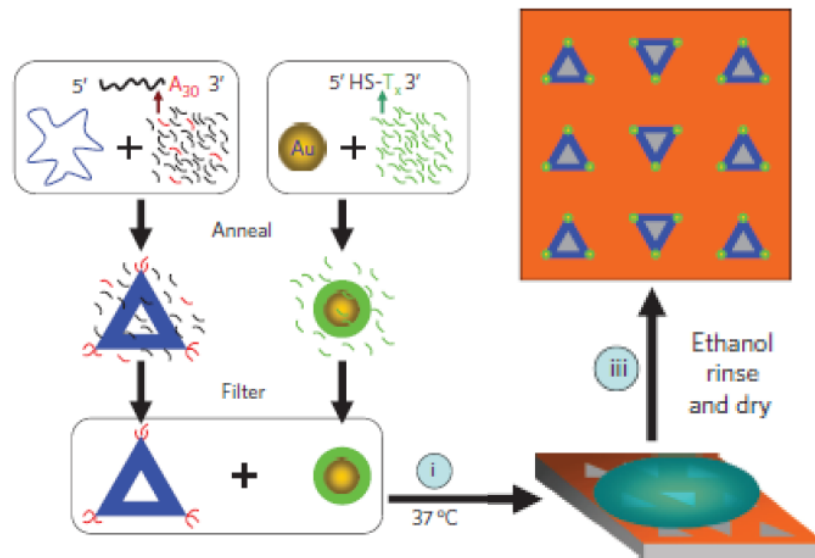


Obrázek 2.11: Metoda salt-aging za pomoci surfaktantu [37].



Obrázek 2.12: Ligand BSPP [37].

Následně se směs DNA origami a AuNP-DNA zahřeje na teplotu 37 °C a poté se nechá vychladnout na pokojovou teplotu. Takto vznikne DNA origami-AuNP. Na obr. 2.13 je znázorněna depozice DNA origami-AuNP na čistý křemíkový povrch. Jelikož jsou DNA origami-AuNP i Si povrch záporně nabitý, tak se k uchycení modifikovaných DNA origami k povrchu použije pufr TAE s vysokou koncentrací Mg^{2+} [32][38][39].



Obrázek 2.13: Depozice DNA origami-AuNP na Si povrch [39].

2.3 Využití DNA origami

2.3.1 Lékařství

Nanomateriály mají jedinečné fyzikální vlastnosti, díky nimž mohou být systémy pro dodávání léčiv bezpečnější a efektivnější [28]. Nový směr při léčbě proto nacházejí v cíleném dodávání léčiv (drug delivery system, DDS), aby se zabránilo vedlejším účinkům během léčby rakoviny. Nutno podotknout, že oblast výzkumu DNA origami pro dodávání léčiv je stále v počátečním stadiu [28][40].

Primární motivací práce je použití DNA origami v konkomitantní chemo-radiační terapii rakoviny. Chemoterapie je standardní léčba rakoviny pomocí cytotoxických protinádorových léků. Tradiční chemoterapeutika nejsou specificky distribuována krví jen do nádorové tkáně, ale dostanou se i ke zdravím tkáním, což může vyvolat silnou systémovou toxicitu s nežádoucími vedlejšími účinky, které mohou způsobit poškození dříve zdravých tkání [41].

V posledních desetiletích byly různé organické i anorganické materiály použity k vytvoření nanostruktur, které usnadňují dodávání protinádorových léčiv [40]. Je důležité, aby tyto nanomateriály byly bezpečné, biokompatibilní a účinné pro dodávání léčiv *in vivo*. Bylo prokázáno, že DDS na bázi nanočástic využívají pasivního cílení díky efektu zvýšené permeability a retence. Tento jev vede ke zvýšené permeabilitě nádorové vaskulatury, což umožňuje lepší průnik relativně velkých částic (10 - 300 nm) jako jsou nanočástice, lipozomy, micely či proteiny, do intersticiálního prostoru nádoru, kde dochází k akumulaci léčiva v oblasti tumoru [41][42]. Kromě podávání léků mohou být nanostruktury použity v buněčném a molekulárním zobrazování pro detekci rakoviny [28].

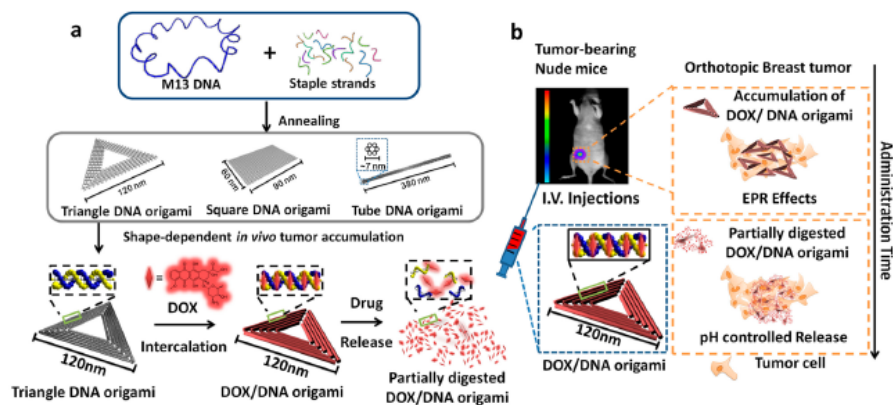
DNA origami jsou biokompatibilní, biodegradabilní a mají nízkou cytotoxicitu. Lze je také modifikovat širokou škálou funkčních skupin, jako jsou aptamery, lipidy, proteiny a nanočástice, což z DNA origami dělá slibného kandidáta, který bude sloužit jako prostředek DDS nové generace [28][40][41]. Prostřednictvím těchto výhod DNA origami usnadňuje buněčné zobrazování, cílené dodávání a kontrolované uvolňování léčiva [41]. Zejména DNA origami ve tvaru čtyřstěnu, trubice, čtverce, trojúhelníku, atd. byly vyvinuty pro dodávání léčiv *in vivo*. Před aplikací DNA origami *in vivo* je nutné provést důkladné testování *in vitro*, aby se předešlo nesprávné interpretaci dat [40]. Pro použití v biologickém systému musí nanostruktury DNA origami splňovat určité požadavky, základním kritériem je stabilita. Studie prokázala, že tvar a strukturální design může být klíčovým faktorem stability ve fyziologickém prostředí [28][40]. DNA origami jsou citlivé na pH prostředí. Například v Zhangově studii bylo zjištěno, že DNA origami je stabilní v buněčných lyzátech po dobu 12 hodin inkubace a může být pomalu degradována živými buňkami po dobu 72 hodin, což dokazuje jeho velký potenciál pro řízené uvolňování léčiva [41]. Senzitivita na pH se dá také využít k tvorbě ekologicky zodpovědných léčiv, kdy se nanostruktura jako nosič léčiva rozloží již

v těle pacienta a nedochází k jejímu uvolňování do prostředí jako je tomu v případě nanočástic nebo uhlíkových nanotrubiček [40][43].

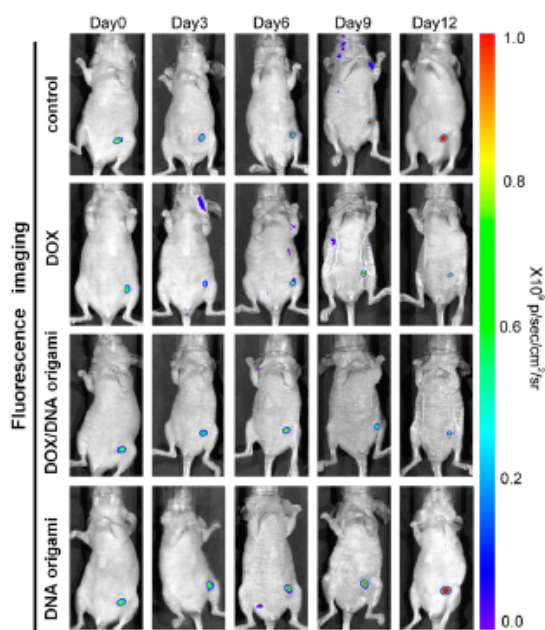
Několik experimentů prokázalo, že nanostruktury DNA origami mají schopnosti zvyšovat účinnost chemoterapie, snižovat nežádoucí vedlejší účinky a dokonce obcházet rezistenci na léky [28]. Experimenty také ukázaly, že do 3D DNA origami lze vložit více léků, ale rychleji se uvolní z 2D struktur [28]. Z toho vyplývá, že tyto struktury, především čtyřstěny, jsou účinné pro dodávání doxorubicinu (DOX) do rakovinných buněk [40]. Navíc Zhao a spol. uvedli, že nanostruktury DNA mohou být navrženy tak, aby se lišily v jejich schopnostech zapouzdření a rychlosti uvolňování v závislosti na množství relaxace ve strukturách dvoušroubovice DNA. Pro léčiva vyžadující delší stabilitu v krevním oběhu se dají DNA origami nanostruktury dále modifikovat, ku příkladu zapouzdřením do lipidové dvojvrstvy [28].

Zhangova studie použila DNA origami k cílenému dodávání léků. Na trojúhelníkovou DNA origami se navázal DOX (viz obr. 2.14) [41]. DOX je široce využíván při léčbě rakoviny, interkaluje se do DNA a díky fluorescenci a absorpční usnadňuje analýzu [40]. Charakterizovaly se komplexy DOX-DNA origami a vyhodnocovalo se uvolňování léčiva *in vivo*. Tento experiment se prováděl na myších s nádorem, kterým byl intravenózně aplikován DOX-DNA origami (viz obr. 2.15) [41]. Po provedení fluorescenčního zobrazování zjistili, že se velikost nádoru zmenšila a myši nevykazovaly žádný úbytek na hmotnosti, zatímco myši s volným DOX v těle ano. Z toho vyplývá, že DOX-DNA origami jsou méně toxické při zachování stejného terapeutického účinku [28][41]. DOX navázaný na DNA origami postupně difundoval, což způsobilo pomalejší buněčnou eliminaci, zatímco volné léky mají vyšší rychlost buněčné eliminace [28]. DOX-DNA origami se zlatými nanočásticemi vykazovala vyšší protinádorovou účinnost ve srovnání s volným DOX v těle. Tato data naznačují, že takto modifikované DNA origami může prodloužit účinky terapeutických léků a zvýšit tím účinnost léku s nižšími vedlejšími účinky [28].

Alternativou je fotodynamická terapie (photodynamic therapy, PDT), která má za následek sekvenci fotochemických a fotobiologických procesů, které způsobují nevratné fotopoškození nádorových tkání. Výsledky klinických studií prováděných po celém světě po dobu 25 let stanovily PDT jako užitečný léčebný přístup pro některé druhy rakoviny. Při PDT se používají fotosenzibilizátory, nejpoužívanějším je Photofrin, který dokáže absorbovat světlo pouze do 640 nm. Světlo při delších vlnových délkách proniká dále do tkáně. Většina nových senzibilizátorů má vyšší absorpční při 650 – 850 nm. Například DNA origami modifikované AuNP byly použity jako fotosenzibilizátory, které byly intravenózně aplikovány myším. Výsledky ukázaly, že nanostruktury DNA origami úspěšně dopravily AuNP do oblasti nádoru a po ozáření laserem o vlnové délce blízké IR záření byl nádor zničen. Životaschopnost nádorových buněk byla významně nižší u myší léčených DNA origami-AuNP ve srovnání s těmi, které byly léčeny volnými AuNP [28][44].



Obrázek 2.14: a) Příprava trojúhelníkové DNA origami s navázaným DOX. b) Intravenózně aplikované DOX-DNA origami se díky EPR hromadí v oblasti tumoru [41].



Obrázek 2.15: Fluorescenční zobrazení subjektů *in vivo* s aplikovaným DOX, DNA origami a DOX-DNA origami po dobu 12. dnů [41].

2.4 Zobrazovací metody

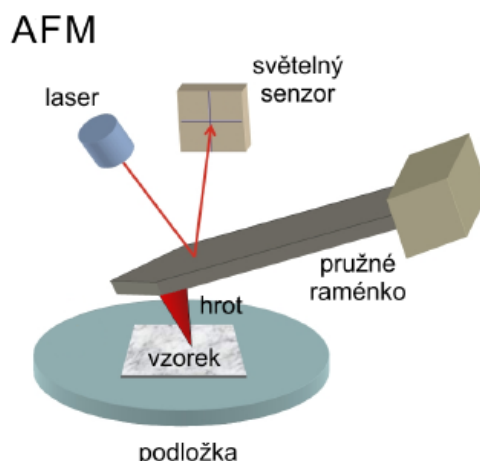
2.4.1 AFM

Metoda AFM (Atomic Force Microscopy) patří spolu s STM (Scanning Tunneling Microscopy) do skupiny mikroskopie skenující sondou (SPM - Scanning Probe Microscopy) [45]. SPM je metoda výzkumu morfologie a vlastností povrchů, či jiných objektů poskytující vysoké rozlišení na atomární úrovni s možností zrekonstruovat obraz ve 3D. Funguje na principu těsného přiblížení, případně i kontaktu sondy se vzorkem a jejich následných vzájemných interakcí [46].

Hlavní myšlenkou vytvoření AFM byla potřeba zobrazování s vysokým rozlišením povrchu nevodivých a organických vzorků. Analýza těchto vzorků pomocí STM nebyla možná, protože tato mikroskopie je vhodná pouze pro vodivé, případně polovodivé vzorky [45]. Právě proto je AFM široce využíván pro zobrazení DNA origami [47]. Princip měření atomárních sil byl objeven pozorováním systematické odchylky během měření STM. Tyto odchylky byly následně vysvětleny elektromagnetickými silami atomového původu mezi atomy hrotu a vzorku [48].

Jedná se tedy o elektromechanický přístroj, který přichází do přímého kontaktu se vzorkem, nelze si ho tedy představovat jako klasický optický mikroskop. Skládá se ze skeneru, sondy (rameno s hrotem), detektoru, optického systému a pomocných částí.

Hrot (teoreticky zakončen pouze jedním atomem), který je kolmo připevněný na ohybném rameni, zajišťuje interakci se vzorkem. Rameno s hrotem funguje jako pružina nad povrchem vzorku. Hrot je odpuzován nebo přitahován elektromagnetickými silami, většinou Van der Waalovými, čímž dochází k ohybu ramene. Sledovaným parametrem je velikost ohybu ramene, které má v různých místech nad vzorkem odlišné ohnutí. Ohnutí ramene v řádech nanometrů je měřeno na čtyřsegmentové fotodiodě, která zachycuje změny odrazu laserového paprsku od povrchu ramene, jak je to znázorněno na obr. 2.16, a umožňuje počítačové zobrazení vzorku v trojrozměrné projekci [45][49].



Obrázek 2.16: Princip měření AFM [45].

2.4.2 Elektroforéza

V biologickém a biomedicinském výzkumu patří elektroforetická separace nukleových kyselin a proteinů k často používaným metodám [50][51]. Gelová elektroforéza patří mezi elektromigrační separační metody a funguje na principu migrace elektricky nabitých částic ve stejnosměrném elektrickém poli v roztoku elektrolytu. Elektrické pole vznikne vložením konstantního napětí mezi elektrody [50]. Z důvodu rovnoměrného působení na částice musí být elektrické pole homogenní [52]. Prostředí mezi elektrodami je tvořeno základním elektrolytem, který zajišťuje dostatečnou elektrickou vodivost celého systému [50]. Vzorek zkoumané látky (jednoduché ionty i směs molekul s elektrickým nábojem, např. aminokyseliny) je umístěn do určitého místa mezi elektrodami [52][53]. Nabitě částice jsou přitahovány k opačně nabitě elektrodě – anionty k anodě a kationty ke katodě [54]. Neutrální částice se vlivem elektrického napětí nepohybují [52]. Migrace částic závisí na elektroforetické pohyblivosti, ta je dána poměrem velikosti náboje a velikosti částice. Větší částice s méně náboji se pohybují pomaleji oproti menším částicím s více náboji, díky tomu se od sebe dokáží oddělit. V průběhu separace dojde ke vzniku oddělených zón, ve kterých se vyskytují jednotlivé složky vzorku se stejnou pohyblivostí [52][54].

Aparatura GE se skládá ze čtyř základních částí: zdroje stejnosměrného napětí, elektroforetické vany, destičky pro vytvoření gelu a hřebenu pro tvorbu jamek [53].

V gelové elektroforéze se analyt dělí nejen na základě elektrického náboje, ale také podle tvaru a velikosti částice, pH prostředí, pórovitosti a viskozity gelové matrice, v níž se pohybuje [50].

Celý gel je ponořen do pufru (TAE nebo TBE), který zde funguje jako vodivostní médium a udržuje stabilní pH během celé separace [50][53]. Použití těchto pufrů je limitováno především pufrací kapacitou, která udává pracovní koncentraci pufru a rychlost, při které může elektroforéza probíhat, aniž by došlo k deformaci gelu následkem zahřívání [50].

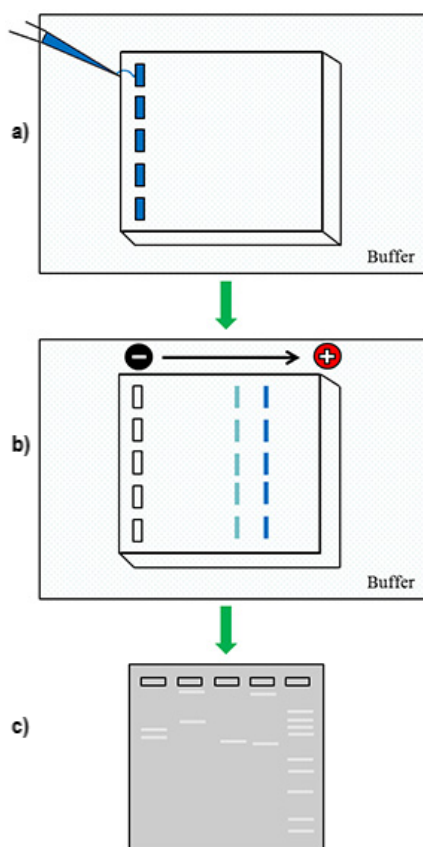
Gely jsou nejčastěji tvořeny polyakrylamidem nebo agarózou. Koncentrace agarózy nebo polyakrylamidu určuje velikost separovatelných částic daného vzorku [52]. Pro separaci krátkých částí NK se běžně používá polyakrylamidový gel (do 1000 bazí obsažených v řetězci), který je obtížný na přípravu a je toxický. Pro větší fragmenty (do 50 000 bazí v řetězci) se pak používá agarózový gel, který je snadný na přípravu a není toxický. Pro vizualizaci výsledků se používají detekční barviva, která po osvětlení vykazují luminiscenci a zviditelní migrující vzorek [50][52][53].

Agarózová gelová elektroforéza

Při extrakci agaru z červených mořských řas může dojít k rozdělení na dvě frakce - agaropektin (vysoký obsah sulfátových a karboxylových skupin) a agarózu (téměř neutrální). Strukturně se jedná o lineární polysacharid, který se skládá ze střídajících se jednotek D-galaktózy a 3,6-anhydro-L-galaktózy [53][54].

Příprava agarózového gelu spočívá ve smíchání práškové agarózy s elektroforetickým pufr. Celý roztok se uvede do varu (vznikne homogenní roztok) a po vychladnutí tekutého gelu na vhodnou teplotu je nalit do formy. Bude-li gel příliš horký, dojde k rozkladu detekčních barviv. Pokud bude gel příliš studený, nebude roztok homogenní a vzorky budou migrovat nerovnoměrně. Agarózový gel se nanáší na podpůrnou destičku, která je ponořena do vany obsahující vhodný elektroforetický pufr. Jamky jsou v gelu vytvořeny pomocí tzv. hřebenu ještě předtím, než agaróza zgelovává. Do těchto jamek je poté nanesen analyzovaný vzorek, který je smíchán s detekčním barvivem a vkladacím pufr. Následně je připojen zdroj stejnosměrného proudu. Pro vizualizaci DNA se používají detekční barviva, nejčastěji EtBr, který je možno nanést přímo do vzorku, elektroforetického pufru nebo v nejběžnějším případě přimíchat do agarózového gelu. Po ozáření UV světlem oranžově fosforeskuje. EtBr patří mezi interkalační barviva a je karcinogenní, proto je nahrazován za méně závadné náhražky (v tomto případě SYBR Green I). Oddělené zóny jsou výsledkem separace (viz obr. 2.17), a to platí i pro molekuly DNA.

K extrakci vzorku z gelu pro další analýzu se nejčastěji používají komerční kity, které pomocí tepla rozpouští gel a v silikátové kolonce se následným vymytím zachytí daný vzorek. V případě, že by zahřátím mohlo dojít k poškození vzorku se dá využít zmrazení gelu se vzorkem na teplotu -70 °C. Výsledný vzorek vznikne při odstraňování gelu, který se při procesu centrifugace zborší a vznikne tekutina [52][53].



Obrázek 2.17: Průběh agarózové elektroforézy. a) Aplikace vzorků do vytvořených jamek v agarózovém gelu (horizontální systém). b) Migrace částic ke kladné elektrodě. c) Výsledný obraz za použití detekčního barviva [55].

3 Experimentální část

3.1 Použité chemikálie a roztoky

3.1.1 Použité chemikálie

- M13mp18 viral DNA scaffold (5 nM) (tilibit nanosystems GmbH, Německo)
- oligonucleotide staples (metabion international AG, Německo)
- ethanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) (Lach-Ner s.r.o., ČR)
- 10x TAE pufr (Sigma-Aldrich, Německo)
- chlorid sodný (NaCl) (Sigma-Aldrich, Německo)
- chlorid hořečnatý hexahydrát ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (Sigma-Aldrich, Německo)
- BSPP (Sigma-Aldrich, Německo)
- SDS (Sigma-Aldrich, Německo)
- oligonukleotidy DNA (SH-funkcionalizovaná $(\text{TTT})_7$) (metabion international AG, Německo)
- syntetické zlaté nanočástice v citrátovém roztoku (10 nm) (Nanocomposix Inc., USA)
- SYBR Green I (10,000 \times in DMSO) (Sigma-Aldrich, Německo)
- agaróza (Serva Electrophoresis, Německo)
- vkládací pufr EZ-Vision™ (6X) (Amresco, USA)

3.1.2 Použité roztoky

Jedná se o vodné roztoky, pokud není uvedeno jinak.

- 10x TAE pufr s 125 mM MgCl_2
2,4 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ je doplněno pufrům 10x TAE na objem 45 ml
- 1x TAE pufr
4,5 ml 10x TAE pufru je doplněno Milli-Q H_2O na objem 45 ml

- 10 mM BSPP
53,5 mg BSPP je doplněno Milli-Q H₂O na objem 10 ml, aby výsledná koncentrace roztoku byla 10 mM
- 1M NaCl
0,58 g NaCl je doplněno Milli-Q H₂O na objem 10 ml, aby výsledná koncentrace roztoku byla 1M
- 4M NaCl
2,34 g NaCl je doplněno Milli-Q H₂O na objem 10 ml, aby výsledná koncentrace roztoku byla 4M
- 1x TAE pufr s 12,5 nM MgCl₂
2,4 g MgCl₂·6H₂O je doplněno pufr 1x TAE na objem 45 ml
- 1x TAE pufr s 12,5 nM MgCl₂ a 0,02% SDS (stabilizační pufr)
- 1x TAE pufr s 12,5 nM MgCl₂ a 0,2% SDS (centrifugační pufr)
- 2% SDS
0,2 g SDS je rozpuštěno v 10 ml Milli-Q H₂O
- 0,02% SDS
0,2 g SDS je rozpuštěno v 1000 ml Milli-Q H₂O
- 0,2% SDS
0,2 g SDS je rozpuštěno v 100 ml Milli-Q H₂O
- 0,5x TAE pufr
100 ml 10x TAE pufru je doplněno Milli-Q H₂O na objem 2 l
- 1% agarózový roztok
0,4 g agarózy je rozpuštěno ve 40 ml 0,5x TAE pufru

3.2 Použité přístrojové vybavení

- termostat s funkcí zahřívání/chlazení CH-100 (BioSan, USA)
- centrifuga Minispin (Eppendorf, Německo)
- plazmová čistička RPS40 (Roplass, ČR)
- AFM mikroskop Scanning Probe Microscope Bruker Dimension Icon (ICON-SPM) (Bruker, USA)
- ozařovač Chisostat SO 01 (Chirana, ČR)

- elektroforetická souprava Mupid-exU (Takara Bio, Japonsko)
- fotodokumentační zařízení Quantum CX5 Edge (Vilber, Německo)
- laboratorní třepačka BV1000 Vortex (Benchmark, USA)
- centrifuga 5424R (Eppendorf, Německo)
- termocycler PCR (miniPCR, USA)
- mikropipety P-2.5, 10, 20, 100, 1000 (Eppendorf, Německo)
- filtry 100 kDa Amicon (Sigma-Aldrich, Německo)
- zkumavky o objemu 0,5 ml, 1,5 ml a 2 ml (Eppendorf, Německo)
- křemíkový wafer (MicroChemicals GmbH, Německo)
- rukavicový box s argonovou atmosférou
- laboratorní váhy
- běžné laboratorní sklo

3.3 Použitý software

- zobrazování a úprava výstupů AFM Gwyddion 2.58 (GNU licence)

3.4 Příprava DNA origami

Příprava DNA origami ve tvaru trojúhelníku podle původní práce P. Rothemunda [4].

Jednovláknová DNA M13mp18 (5 nM) složená z 7249 bází byla smíchána s nadměrným množstvím 208 oligonukleotidů (čtyři z těchto vláken měla zakončení A-(AAA)₉) v pufru 1x TAE s 12,5 nM MgCl₂. Výsledný roztok byl poté zahříván na 90 °C a pomalu ochlazován na 10 °C rychlostí -0,7 °C/min na termostatu (zhotovený pomocí arduino platformy pro přesnou regulaci a programování teploty). Aby se odstranila přebytečná vlákna, tak byl roztok DNA origami (60 µl) třikrát filtrován s 440 ml pufru 1x TAE s 12,5 nM MgCl₂ při 6000 ot./min po dobu 6 minut v každém cyklu. Následně se pufr vyměnil za H₂O a za stálého přidávání čisté H₂O se provedla třikrát filtrace pomocí kolonek. Takto vytvořené trojúhelníky mají délku jedné strany 127 nm.

3.5 Příprava DNA origami se zlatými nanočásticemi

Příprava zlatých nanočástic podle B. Dinga [38].

3.5.1 Příprava zlatých nanočástic funkcionalizovaných DNA

Zlaté nanočástice byly inkubované s 10 mM BSPP (uchovávané v argonové atmosféře). K 150 μ l roztoku koloidních částic bylo přidáno 15 μ l BSPP, 2 μ l 2% SDS a 20 μ l 100 nM DNA. Směs byla laboratorní třepačkou třepána přes noc za pokojové teploty. K této směsi byl po malých krocích přidáván NaCl (s) tak, aby se v nejméně 10 krocích dosáhla výsledná koncentrace NaCl ve směsi nanočástic na 700 mM s 20 minutovou přestávkou mezi jednotlivými kroky. Pokud je proces přípravy zdařilý, tak výsledná směs má červenou barvu, pokud zmodrá, došlo k agregaci nanočástic (viz obr. 3.1). Pro purifikaci byla výsledná směs centrifugována otáčkami 30000x g po dobu 30 minut a supernatant byl opatrně odstraněn pipetou. AuNP byly poté resuspendovány v 1 ml centrifugačního pufru. Postup byl opakován 5x, při finálním ředění s využitím stabilizačního pufru. Koncentrace AuNP byla vypočítána z optické absorbance při \sim 520 nm.



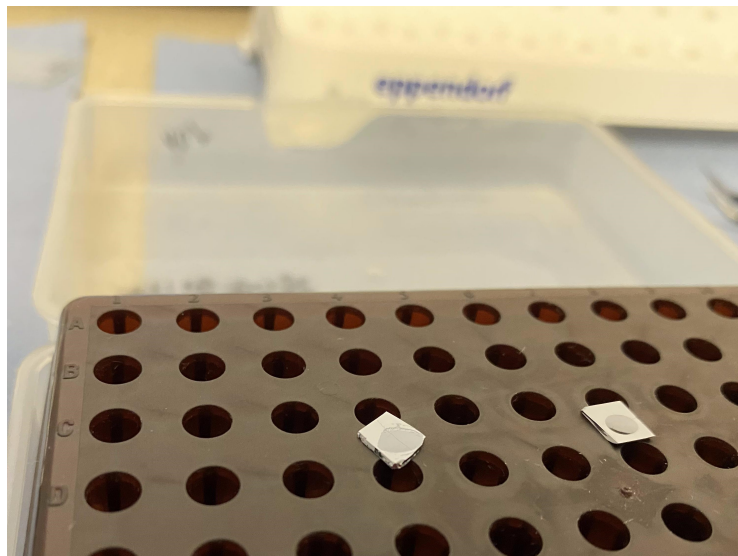
Obrázek 3.1: Agregované (modrá) a neagregované (červená) zlaté nanočástice [autor].

3.5.2 Hybridizace DNA origami se zlatými nanočásticemi

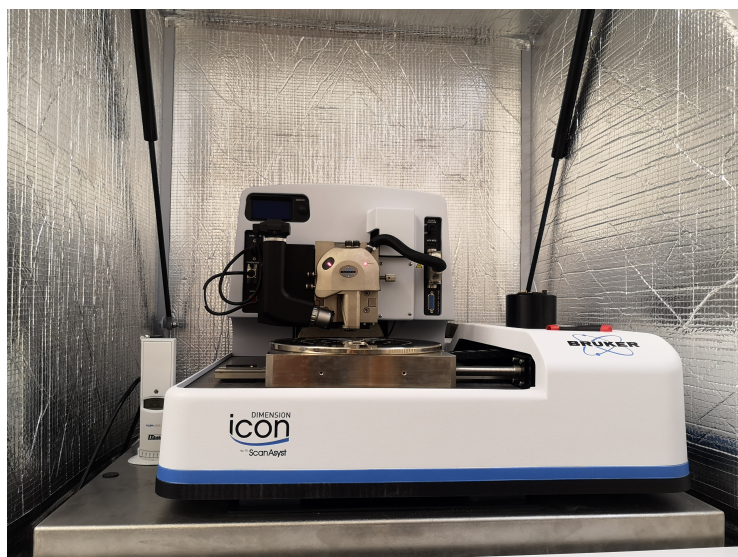
Vyčištěná DNA origami byla smíchána s DNA funkcionalizovanými AuNP v poměru 1:1,2 a hybridizovaná pomocí PCR termocycleru (40 minut při teplotě 45 °C, poté postupné ochlazení na pokojovou teplotu v průběhu 25 minut).

3.6 Depozice na Si povrch

Křemíkový povrch byl očištěn 1 ml roztoku ethanol/voda v poměru 1:1 a vložen pod plazmovou čističku na 5 min. Plazma aktivuje Si povrch, aby se stal hydrofilním. Následně byl na křemíkový wafer (0,6 cm x 0,6 cm) nanesen roztok DNA origami (1 μ l) a k uchycení DNA origami na povrch se použilo 15 μ l pufru 10x TAE s 12,5 nM $MgCl_2$ (viz obr. 3.2). Vzorek byl inkubován hodinu. Poté se Si povrch opláchl 1 ml roztoku ethanol/voda v poměru 1:1 a vyfoukán vzduchem, aby byl povrch suchý. Vytvořené nanostruktury se zobrazily pomocí AFM (viz obr. 3.3).



Obrázek 3.2: Depozice DNA origami na křemíkový wafer [autor].



Obrázek 3.3: AFM mikroskop Scanning Probe Microscope Bruker Dimension Icon od firmy Bruker [autor].

3.7 Záření gama

Roztoky DNA origami byly ozářeny v Ústavu jaderné fyziky AV ČR za použití ozařovače Chisostat, který obsahuje radionuklidový zdroj kobalt 60 (^{60}Co) emitující paprsky gama s energií 1,17 a 1,33 MeV. Ozařování bylo prováděno za pokojové teploty a ve vodní lázni, aby se umožnilo přesné podání absorbované dávky. Roztoky byly umístěny do 1,5ml zkumavek a poté byly ponořeny do vody, středy zkumavek byly umístěné přesně 3,35 cm od přední stěny vodní lázně umístěné 26,8 cm od zdroje. K datu ozáření byl v místě středu zkumavek dávkový příkon 3 Gy/min. Uspořádání je uvedeno na obr. 3.4.

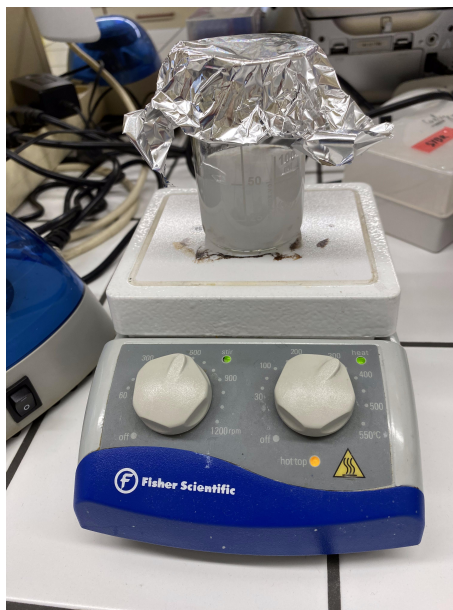


Obrázek 3.4: Ve vodním fantomu umístěném těsně k primárním clonám ozařovače Chisostat jsou ponořené zkoumané vzorky k ozáření [autor].

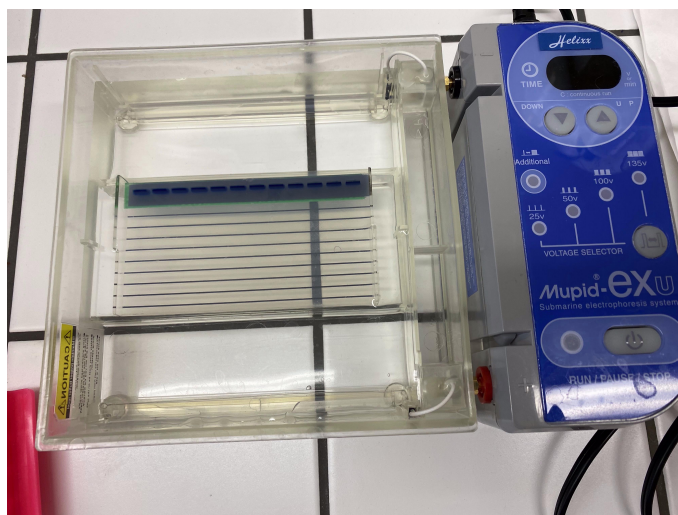
3.8 Agarózová gelová elektroforéza

1% agarózový roztok (40 ml) byl uveden do varu (viz obr. 3.5). Když se agarózový roztok vyčeřil, byly přidány 4 μl detekčního barviva SYBR Green I. Roztok se nechal vychladnout přibližně na 60 °C a byl nalit do formy (pomocí hřebenu se vytvořily jamky) a dále chladl na pokojovou teplotu, aby roztok ztuhl. Následně se gel vložil do lednice na dobu alespoň 30 min. Gel byl poté ponořen do vany s 0,5x TAE pufrům. 2 μl vkládacího „loading“ pufru se smíchalo s 10 μl vzorku DNA a až poté byla výsledná barevná směs nanášena do jednotlivých jamek. Na obr. 3.6 je zobrazena aparatura elektroforézy. Vzorky migrovaly při napětí 100 V po dobu 90 min. Po uplynutí doby byly gely vloženy do přístroje pro fotodokumentaci

gelů Quantum CX5 Edge, který dokáže snadno zachytit obraz gelu po ozáření UV transluminátorem (312 nm).



Obrázek 3.5: Příprava agarózového gelu [autor].

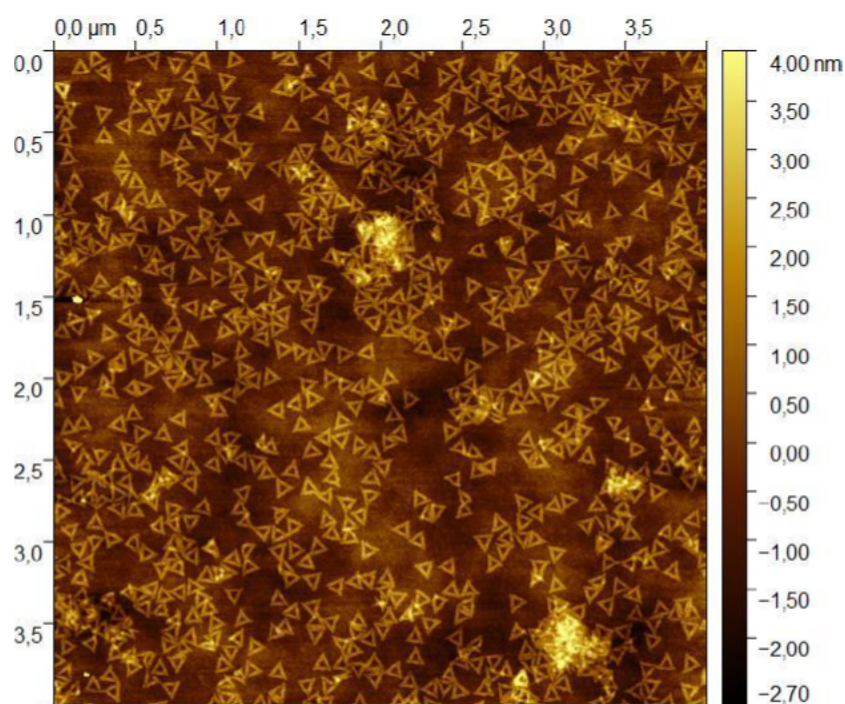


Obrázek 3.6: Aparatura gelové elektroforézy Mupid-exU se vzorky [autor].

3.9 Výsledky a diskuze

Provedla jsem přípravu 2D DNA origami ve tvaru rovnostranného trojúhelníku metodou P. Rothemunda [4]. Příprava DNA origami a jejich depozice není triviální, může docházet k různým defektům, koagulacím na povrchu nebo se DNA origami na povrch vůbec nenaváže. Příprava povrchu a jeho saturace Mg^{2+} ionty je pro analýzu AFM velmi důležitá.

Veškeré experimenty byly zobrazeny pomocí Scanning Probe Microscope Bruker Dimension Icon v režimu PeakForce Tapping a za použití ScanAsyst sondy (40 kHz, 0,4 N/m). Pro každý vzorek byly skenovány oblasti $4 \times 4 \mu m^2$ a $2 \times 2 \mu m^2$. Získané snímky byly vyhodnocovány a upravovány v programu Gwyddion 2.58. Výsledek AFM je znázorněn na obr. 3.7.



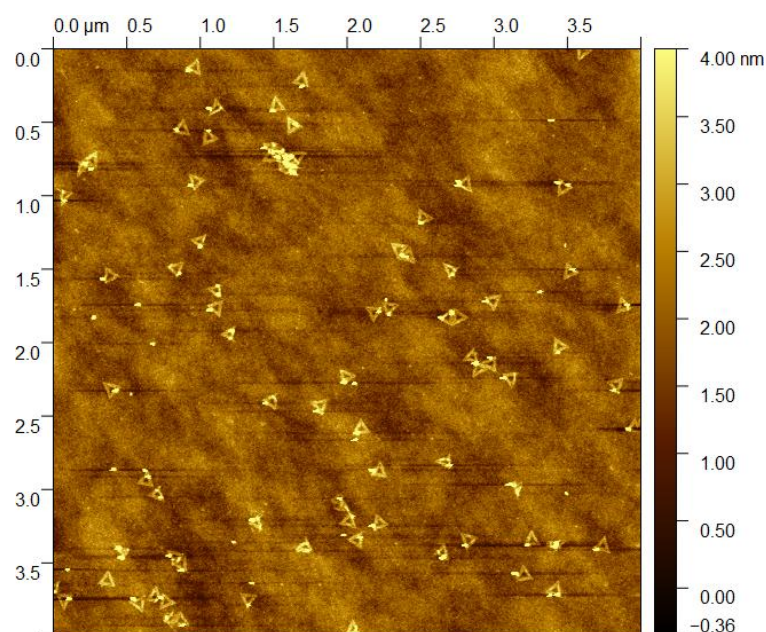
Obrázek 3.7: Příklad vydařené přípravy a depozice s koncentrací vhodnou pro další experimenty [autor].

Na obr. 3.7 můžeme identifikovat čtyři druhy DNA origami. A to nepoškozené, poškozené, denaturované a deformované, jak je vidět na obr. 3.8.



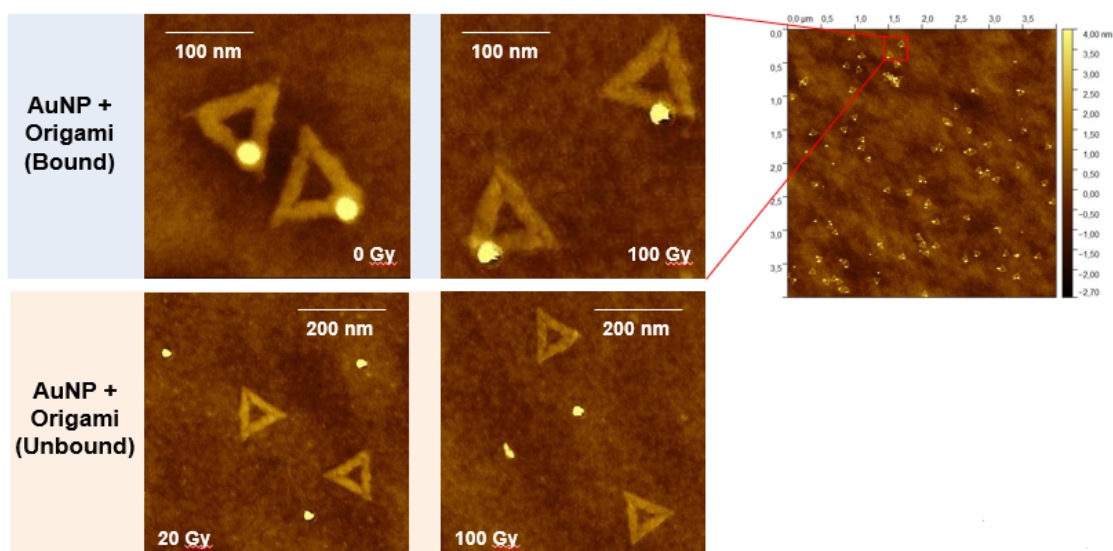
Obrázek 3.8: Čtyři druhy DNA origami. Zleva nepoškozené, poškozené, denaturované a deformované [autor].

Dle postupu z kapitoly 3.5 byly také připraveny DNA origami funkcionalizované zlatými nanočásticemi. Příklad vydařené přípravy a depozice, která byla použita pro další experimenty je na obr. 3.9.



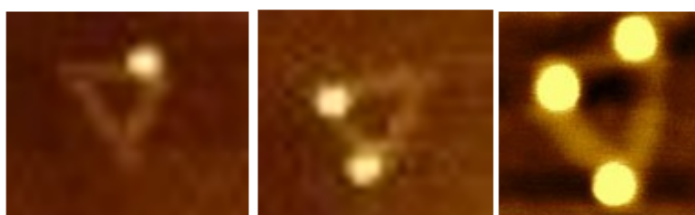
Obrázek 3.9: Konjugované DNA origami-AuNP v poměru 1:1,2, použité rozpouštědlo H₂O (30 μl tris, 10 μl MgCl₂) [autor].

V radiačních experimentech byly také použity vzorky, kdy byly AuNP s citrátovým povrchem jen smíchány s DNA origami bez vzniku vazby na origami. Rozdíl v depozici takového roztoku a roztoku s DNA origami funkcionalizovanými AuNP je viditelný na obr. 3.10.



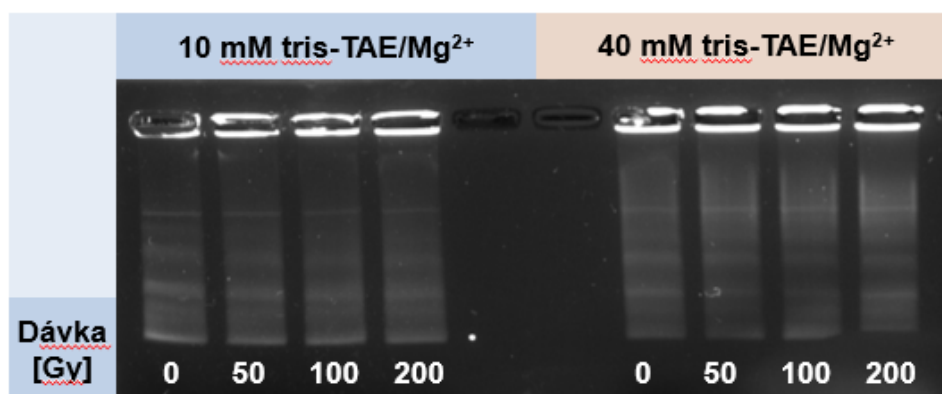
Obrázek 3.10: DNA origami s navázanými AuNP (bound) a DNA origami s nenavázanými AuNP (unbound) [autor].

Počet zlatých nanočástic navázaných na DNA origami je možné kontrolovat počtem volných DNA vláken umístěných na DNA origami během jejich přípravy s komplementárním zakončením k vláknu vázanému na AuNP, která určuje maximální počet zlatých nanočástic na jednu DNA origami. Například na trojúhelníky se třemi možnými místy navázání se podařilo navázat 1, 2 nebo 3 nanočástice, jak je to znázorněno na obr. 3.11.

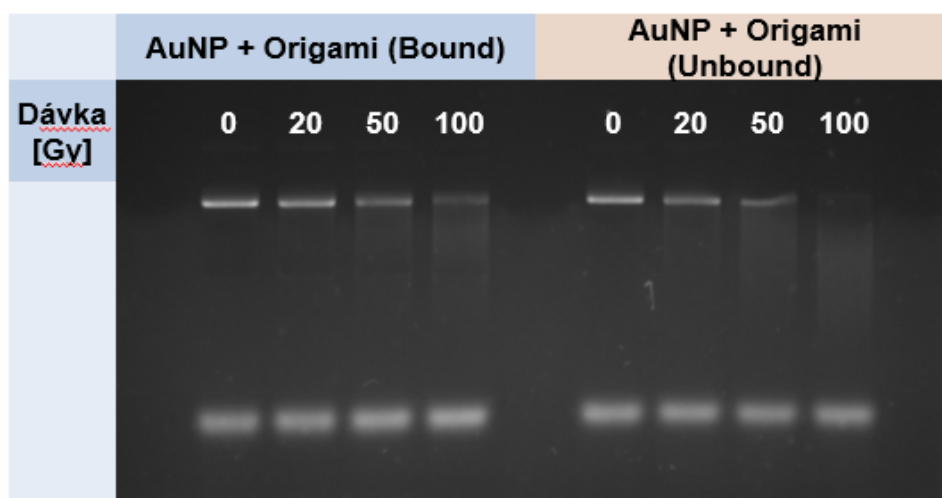


Obrázek 3.11: DNA origami s navázanými nanočásticemi [autor].

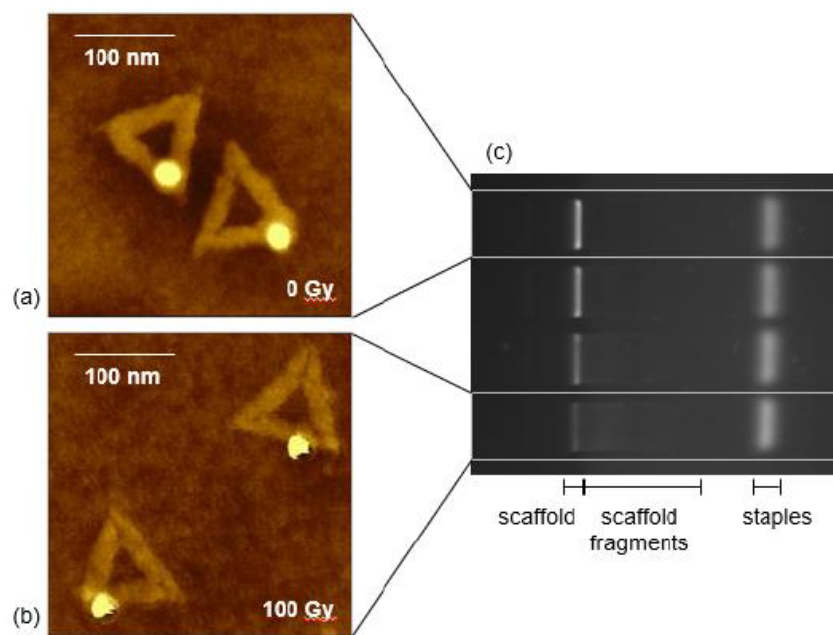
AFM je jen kvalitativní metoda, neboť relativní zastoupení nepoškozených a poškozených DNA origami závisí na skenované oblasti a také může být ovlivněno procesem depozice na povrch. Ke kvantitativnímu určení míry poškození v radičních experimentech se tedy použila agarózová gelová elektroforéza. Výsledný obraz elektroforézy je znázorněn na obr. 3.12, 3.13 a 3.14.



Obrázek 3.12: Gelová elektroforéza DNA origami [autor].



Obrázek 3.13: Gelová elektroforéza modifikovaných DNA origami zlatými nanočásticemi [autor].



Obrázek 3.14: Modifikované DNA origami zlatými nanočásticemi. a) DNA origami-AuNP při ozáření 0 Gy. b) DNA origami-AuNP při ozáření 100 Gy. c) Oddělené zóny při gelové elektroforéze [autor].

4 Závěr

Ve své bakalářské práci jsem se věnovala tématu DNA origami.

V rešeršní části práce jsem se obeznámila s vlastnostmi DNA a využitím této molekuly v nanotechnologiích. Podrobně jsem zmapovala vývoj DNA origami technologie od jeho vzniku po nejnovější trendy. Detailněji jsem se pak zaměřila na využití DNA origami v *in-singulo* experimentech, které jsou předmětem experimentální části a také jejich využitím v medicíně. Tedy v oboru, na který bych ráda zaměřila svůj budoucí výzkum. Nastudovala jsem si také metodu zobrazování AFM a metodu gelové elektroforézy, které jsem použila na analýzu DNA origami.

Cílem experimentální části práce bylo optimalizovat metodiku přípravy DNA a jejich modifikaci AuNP, tak aby se mohly uskutečnit experimenty zkoumající radiční poškození DNA. Pro experimenty jsem vybrala pravděpodobně nejstabilnější známou 2D nanostrukturu ve tvaru rovnostranného trojúhelníku navrhnoutou P. Rothemundem, kterou se mi povedlo připravit. Ve velkém množství experimentů jsem zmapovala vliv různých parametrů na výslednou kvalitu nanostruktur, jejich stabilitu a depozici. Ve výsledku se mi podařilo připravit nanostruktury vhodné pro další experimenty s ionizujícím zářením, do kterých jsem se také zapojila [56]. Podobně se mi podařilo připravit i DNA origami funkcionalizované AuNP.

Ukazuje se, že DNA díky svým jedinečným vlastnostem má velký potenciál být využívána jako konstrukční materiál, zejména v oblasti nanotechnologie, medicíny a farmacie. Následnou funkcionalizací zlatými nanočásticemi se z takto modifikovaných DNA origami stávají vhodné radiosenzitizéry při léčbě rakoviny.

Předmětem dalších výzkumů bude výroba kompaktnějších a stabilnějších 3D struktur pro medicínské využití, jejich možná aplikace ve fotodynamické terapii pro zkoumání poškození sekvencí DNA a v dalších *in-singulo* experimentech studujících interakci ionizujícího záření s DNA.

Použitá literatura

- [1] NANGREAVE, Jeanette; HAN, Dongran; LIU, Yan; YAN, Hao. DNA origami: a history and current perspective. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2010, roč. 14, č. 5, s. 608–615. ISSN 13675931. Dostupné z DOI: 10.1016/j.cbpa.2010.06.182.
- [2] SACCÀ, Barbara; NIEMEYER, Christof M. DNA Origami: The Art of Folding DNA. *Angewandte Chemie International Edition*. 2012, roč. 51, č. 1, s. 58–66. ISSN 14337851. Dostupné z DOI: 10.1002/anie.201105846.
- [3] FAN, Sisi; WANG, Dongfang; KENAAN, Ahmad; CHENG, Jin; CUI, Daxiang; SONG, Jie. Create Nanoscale Patterns with DNA Origami. *Small*. 2019, roč. 15, č. 26, s. 1805554. ISSN 1613-6810, 1613-6829. ISSN 1613-6810, 1613-6829. Dostupné z DOI: 10.1002/smll.201805554.
- [4] ROTHEMUND, Paul W. K. Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns. *Nature*. 2006, roč. 440, č. 7082, s. 297–302. ISSN 0028-0836, 1476-4687. ISSN 0028-0836, 1476-4687. Dostupné z DOI: 10.1038/nature04586.
- [5] FAN, Chunhai; LI, Qian. Advances in DNA Nanotechnology. *Small*. 2019, roč. 15, č. 26, s. 1902586. ISSN 1613-6810, 1613-6829. ISSN 1613-6810, 1613-6829. Dostupné z DOI: 10.1002/smll.201902586.
- [6] CHANDRASEKARAN, Arun Richard; ANDERSON, Nate; KIZER, Megan; HALVORSEN, Ken; WANG, Xing. Beyond the Fold: Emerging Biological Applications of DNA Origami. *ChemBioChem*. 2016, roč. 17, č. 12, s. 1081–1089. ISSN 14394227. Dostupné z DOI: 10.1002/cbic.201600038.
- [7] RAJENDRAN, Arivazhagan; ENDO, Masayuki; SUGIYAMA, Hiroshi. Single-Molecule Analysis Using DNA Origami. *Angewandte Chemie International Edition*. 2012, roč. 51, č. 4, s. 874–890. ISSN 14337851. Dostupné z DOI: 10.1002/anie.201102113.
- [8] BHAGAVAN, N.V.; HA, Chung-Eun. Structure and Properties of DNA. In: *Essentials of Medical Biochemistry*. Elsevier, 2011, s. 275–286. ISBN 9780120954612. Dostupné z DOI: 10.1016/B978-0-12-095461-2.00021-7.
- [9] DAHM, Ralf. Friedrich Miescher and the discovery of DNA. *Developmental Biology*. 2005, roč. 278, č. 2, s. 274–288. ISSN 00121606. Dostupné z DOI: 10.1016/j.ydbio.2004.11.028.
- [10] JONES, Mary E. Albrecht Kossel, a biographical sketch. *The Yale Journal of Biology and Medicine*. 1953, roč. 26, č. 1, s. 80–97. ISSN 0044-0086.

- [11] WATSON, James D.; CRICK, Francis H. C. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature*. 1953, roč. 171, č. 4356, s. 737–738. ISSN 0028-0836, 1476-4687. ISSN 0028-0836, 1476-4687. Dostupné z DOI: 10.1038/171737a0.
- [12] SINDEN, Richard R.; PEARSON, Christopher E.; POTAMAN, Vladimir N.; USSERY, David W. DNA: Structure and function. In: *Advances in Genome Biology*. Elsevier, 1998, sv. 5, s. 1–141. ISBN 9780762300792. Dostupné z DOI: 10.1016/S1067-5701(98)80019-3.
- [13] CALLADINE, Chris R.; DREW, Horace R.; LUISI, Ben F.; TRAVERS, Andrew A. *Understanding DNA: the molecule & how it works*. 3. ed. Elsevier Academic Press, 2004. ISBN 9786610968251. Dostupné také z: <http://www.myilibrary.com?id=96825>.
- [14] ARYAL, Sagar. *DNA- Structure, Properties, Types and Functions*. 2018. Dostupné také z: <https://microbenotes.com/dna-structure-properties-types-and-functions/>.
- [15] KHAN, Gul Shahzada; SHAH, Afzal; ZIA-UR-REHMAN; BARKER, David. Chemistry of DNA minor groove binding agents. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2012, roč. 115, s. 105–118. ISSN 10111344. Dostupné z DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2012.07.003.
- [16] YANG, Yang; HAN, Dongran; NANGREAVE, Jeanette; LIU, Yan; YAN, Hao. DNA Origami with Double-Stranded DNA As a Unified Scaffold. *ACS Nano*. 2012, roč. 6, č. 9, s. 8209–8215. ISSN 1936-0851, 1936-086X. ISSN 1936-0851, 1936-086X. Dostupné z DOI: 10.1021/nn302896c.
- [17] ZHANG, Zhao; SONG, Jie; BESENBACHER, Flemming; DONG, Mingdong; GOTHELF, Kurt V. Self-Assembly of DNA Origami and Single-Stranded Tile Structures at Room Temperature. *Angewandte Chemie*. 2013, roč. 125, č. 35, s. 9389–9393. ISSN 0044-8249, 1521-3757. ISSN 0044-8249, 1521-3757. Dostupné z DOI: 10.1002/ange.201303611.
- [18] ZHAO, Zhao; LIU, Yan; YAN, Hao. Organizing DNA Origami Tiles into Larger Structures Using Preformed Scaffold Frames. *Nano Letters*. 2011, roč. 11, č. 7, s. 2997–3002. ISSN 1530-6984, 1530-6992. ISSN 1530-6984, 1530-6992. Dostupné z DOI: 10.1021/nl201603a.
- [19] ZHOU, Lifeng; MARRAS, Alexander E.; SU, Hai-Jun; CASTRO, Carlos E. DNA Origami Compliant Nanostructures with Tunable Mechanical Properties. *ACS Nano*. 2014, roč. 8, č. 1, s. 27–34. ISSN 1936-0851, 1936-086X. ISSN 1936-0851, 1936-086X. Dostupné z DOI: 10.1021/nn405408g.
- [20] HONG, Fan; ZHANG, Fei; LIU, Yan; YAN, Hao. DNA Origami: Scaffolds for Creating Higher Order Structures. *Chemical Reviews*. 2017, roč. 117, č. 20, s. 12584–12640. ISSN 0009-2665, 1520-6890. ISSN 0009-2665, 1520-6890. Dostupné z DOI: 10.1021/acs.chemrev.6b00825.

- [21] ROTH, Efrat; GLICK AZARIA, Alex; GIRSHEVITZ, Olga; BITLER, Arkady; GARINI, Yuval. Measuring the Conformation and Persistence Length of Single-Stranded DNA Using a DNA Origami Structure. *Nano Letters*. 2018, roč. 18, č. 11, s. 6703–6709. ISSN 1530-6984, 1530-6992. ISSN 1530-6984, 1530-6992. Dostupné z DOI: 10.1021/acs.nanolett.8b02093.
- [22] SAID, Hassan; SCHÜLLER, Verena J.; EBER, Fabian J.; WEGE, Christina; LIEDL, Tim; RICHERT, Clemens. M1.3 – a small scaffold for DNA origami. *Nanoscale*. 2013, roč. 5, č. 1, s. 284–290. ISSN 2040-3364, 2040-3372. ISSN 2040-3364, 2040-3372. Dostupné z DOI: 10.1039/C2NR32393A.
- [23] CHANDRASEKARAN, Arun Richard; PUSHPANATHAN, Muthuirulan; HALVORSEN, Ken. Evolution of DNA origami scaffolds. *Materials Letters*. 2016, roč. 170, s. 221–224. ISSN 0167577X. Dostupné z DOI: 10.1016/j.matlet.2016.01.161.
- [24] KICK, Benjamin; HENSLER, Samantha; PRAETORIUS, Florian; DIETZ, Hendrik; WEUSTER-BOTZ, Dirk. Specific growth rate and multiplicity of infection affect high-cell-density fermentation with bacteriophage M13 for ssDNA production: Fed-Batch Bacteriophage M13 Fermentation for ssDNA Production. *Biotechnology and Bioengineering*. 2017, roč. 114, č. 4, s. 777–784. ISSN 00063592. Dostupné z DOI: 10.1002/bit.26200.
- [25] NICKELS, Philipp C.; KE, Yonggang; JUNGMANN, Ralf; SMITH, David M.; LEICHSENRING, Marc; SHIH, William M.; LIEDL, Tim; HÖGBERG, Björn. DNA Origami Structures Directly Assembled from Intact Bacteriophages. *Small*. 2014, roč. 10, č. 9, s. 1765–1769. ISSN 16136810. Dostupné z DOI: 10.1002/sml.201303442.
- [26] MARCHI, Alexandria N.; SAAEM, Ishtiaq; VOGEN, Briana N.; BROWN, Stanley; LABEAN, Thomas H. Toward Larger DNA Origami. *Nano Letters*. 2014, roč. 14, č. 10, s. 5740–5747. ISSN 1530-6984, 1530-6992. ISSN 1530-6984, 1530-6992. Dostupné z DOI: 10.1021/nl502626s.
- [27] KICK, Benjamin; PRAETORIUS, Florian; DIETZ, Hendrik; WEUSTER-BOTZ, Dirk. Efficient Production of Single-Stranded Phage DNA as Scaffolds for DNA Origami. *Nano Letters*. 2015, roč. 15, č. 7, s. 4672–4676. ISSN 1530-6984, 1530-6992. ISSN 1530-6984, 1530-6992. Dostupné z DOI: 10.1021/acs.nanolett.5b01461.
- [28] UDOMPRASERT, Anuttara; KANGSAMAKSIN, Thaned. DNA origami applications in cancer therapy. *Cancer Science*. 2017, roč. 108, č. 8, s. 1535–1543. ISSN 1349-7006. Dostupné z DOI: 10.1111/cas.13290.
- [29] EDWARDS, Angela; YAN, Hao. DNA Origami. In: KJEMS, Jørgen; FERAPONTOVA, Elena; GOTHELF, Kurt V. (ed.). *Nucleic Acid Nanotechnology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2014, sv. 29, s. 93–133. ISBN 9783642388149 9783642388156. Dostupné z DOI: 10.1007/978-3-642-38815-6_5.

- [30] ROTHEMUND, Paul W. K. Scaffolded DNA Origami: from Generalized Multicrossovers to Polygonal Networks. In: CHEN, Junghuei; JONOSKA, Nataša; ROZENBERG, Grzegorz (ed.). *Nanotechnology: Science and Computation*. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 2006, s. 3–21. ISBN 9783540302957. Dostupné z DOI: 10.1007/3-540-30296-4_1.
- [31] ZENG, Jie; FU, Wenhao; QI, Zhenping; ZHU, Qiushuang; HE, Huawei; HUANG, Chengzhi; ZUO, Hua; MAO, Chengde. Self-Assembly of Microparticles by Supramolecular Homopolymerization of One Component DNA Molecule. *Small*. 2019, roč. 15, č. 26, s. 1805552. ISSN 1613-6810, 1613-6829. ISSN 1613-6810, 1613-6829. Dostupné z DOI: 10.1002/sml.201805552.
- [32] KELLER, Adrian; BALD, Ilko; ROTARU, Alexandru; CAUËT, Emilie; GOTHELF, Kurt V.; BESENBACHER, Flemming. Probing Electron-Induced Bond Cleavage at the Single-Molecule Level Using DNA Origami Templates. *ACS Nano*. 2012, roč. 6, č. 5, s. 4392–4399. ISSN 1936-0851, 1936-086X. ISSN 1936-0851, 1936-086X. Dostupné z DOI: 10.1021/nm3010747.
- [33] BISEN, Prakash S. *Laboratory protocols in applied life sciences*. CRC Press, Taylor & Francis Group, 2014. ISBN 9781466553149. Dostupné z DOI: 10.1201/b16575.
- [34] DOUGLAS, Shawn M.; MARBLESTONE, Adam H.; TEERAPITTAYANON, Surat; VAZQUEZ, Alejandro; CHURCH, George M.; SHIH, William M. Rapid prototyping of 3D DNA-origami shapes with caDNAno. *Nucleic Acids Research*. 2009, roč. 37, č. 15, s. 5001–5006. ISSN 1362-4962, 0305-1048. ISSN 1362-4962, 0305-1048. Dostupné z DOI: 10.1093/nar/gkp436.
- [35] BIRAC, Jeffrey J.; SHERMAN, William B.; KOPATSCH, Jens; CONSTANTINO, Pamela E.; SEEMAN, Nadrian C. Architecture with GIDEON, a program for design in structural DNA nanotechnology. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. 2006, roč. 25, č. 4, s. 470–480. ISSN 10933263. Dostupné z DOI: 10.1016/j.jmgm.2006.03.005.
- [36] HER, Sohyoung; JAFFRAY, David A.; ALLEN, Christine. Gold nanoparticles for applications in cancer radiotherapy: Mechanisms and recent advancements. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2017, roč. 109, s. 84–101. ISSN 0169409X. Dostupné z DOI: 10.1016/j.addr.2015.12.012.
- [37] LIU, Biwu; LIU, Juewen. Methods for preparing DNA-functionalized gold nanoparticles, a key reagent of bioanalytical chemistry. *Analytical Methods*. 2017, roč. 9, č. 18, s. 2633–2643. ISSN 1759-9660, 1759-9679. ISSN 1759-9660, 1759-9679. Dostupné z DOI: 10.1039/C7AY00368D.
- [38] DING, Baoquan; DENG, Zhengtao; YAN, Hao; CABRINI, Stefano; ZUCKERMANN, Ronald N.; BOKOR, Jeffrey. Gold Nanoparticle Self-Similar Chain Structure Organized by DNA Origami. *Journal of the American Chemical Society*. 2010, roč. 132, č. 10, s. 3248–3249. ISSN 0002-7863, 1520-5126. ISSN 0002-7863, 1520-5126. Dostupné z DOI: 10.1021/ja9101198.

- [39] HUNG, Albert M.; MICHEEL, Christine M.; BOZANO, Luisa D.; OSTERBUR, Lucas W.; WALLRAFF, Greg M.; CHA, Jennifer N. Large-area spatially ordered arrays of gold nanoparticles directed by lithographically confined DNA origami. *Nature Nanotechnology*. 2010, roč. 5, č. 2, s. 121–126. ISSN 1748-3387, 1748-3395. Dostupné z DOI: 10.1038/nnano.2009.450.
- [40] KUMAR, Vinit; PALAZZOLO, Stefano; BAYDA, Samer; CORONA, Giuseppe; TOFFOLI, Giuseppe; RIZZOLIO, Flavio. DNA Nanotechnology for Cancer Therapeutics. *Theranostics*. 2016, roč. 6, č. 5, s. 710–725. ISSN 1838-7640. Dostupné z DOI: 10.7150/thno.14203.
- [41] ZHANG, Qian; JIANG, Qiao; LI, Na a spol. DNA Origami as an *In Vivo* Drug Delivery Vehicle for Cancer Therapy. *ACS Nano*. 2014, roč. 8, č. 7, s. 6633–6643. ISSN 1936-0851, 1936-086X. Dostupné z DOI: 10.1021/nm502058j.
- [42] HEGER, Zbyněk; ECKSCHLAGER, Tomáš; STIBOROVÁ, Marie; ADAM, Vojtěch; ZÍTKA, Ondřej; KIZEK, René. Modern Nanomedicine in Treatment of Lung Carcinomas. *Klinická onkologie*. 2015, roč. 28, č. 4, s. 245–250. ISSN 0862495X, 18025307. Dostupné z DOI: 10.14735/amko2015245.
- [43] ZHUANG, Wan-Ru; WANG, Yi; CUI, Peng-Fei; XING, Lei; LEE, Jaiwoo; KIM, Dongyoon; JIANG, Hu-Lin; OH, Yu-Kyoung. Applications of π - π stacking interactions in the design of drug-delivery systems. *Journal of Controlled Release*. 2019, roč. 294, s. 311–326. ISSN 01683659. Dostupné z DOI: 10.1016/j.jconrel.2018.12.014.
- [44] DOUGHERTY, Thomas J.; GOMER, Charles J.; HENDERSON, Barbara W.; JORI, Giulio; KESSEL, David; KORBELIK, Mladen; MOAN, Johan; PENG, Qian. Photodynamic Therapy. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*. 1998, roč. 90, č. 12, s. 889–905. ISSN 0027-8874, 1460-2105. Dostupné z DOI: 10.1093/jnci/90.12.889.
- [45] AMBROŽ, Marcel. *Analýza struktury DNA s pomocí mikroskopu AFM [online]*. 2013. Dostupné také z: <https://is.muni.cz/th/c11oi/>. Diplomová práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Brno.
- [46] KLEMEŠ, Jan. *Studium struktury biomolekul pomocí AFM [online]*. 2008. Dostupné také z: <https://is.muni.cz/th/o55bp/>. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Brno.
- [47] BIRKEDAL, Victoria; DONG, Mingdong; GOLAS, Monika M.; SANDER, Bjoern; ANDERSEN, Ebbe Sloth; GOTHELF, Kurt Vesterager; BESENBACHER, Flemming; KJEMS, Jørgen. Single molecule microscopy methods for the study of DNA origami structures. *Microscopy Research and Technique*. 2011, roč. 74, č. 7, s. 688–698. ISSN 1059910X. Dostupné z DOI: 10.1002/jemt.20962.

- [48] HORÁČKOVÁ, Veronika. *Nanoscale imaging with atomic force microscopy (AFM)*. 2017. Dostupné také z: <https://theses.cz/id/a63ija/>. Disertační práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Brno.
- [49] SEDLÁČKOVÁ, Tereza. *Techniky zobrazování biomolekul, bakterií a buněk v subnanometrickém měřítku mikroskopem AFM [online]*. 2011. Dostupné také z: <https://theses.cz/id/3kquv3/>. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Brno.
- [50] DOSOUDILOVÁ, Klára. *Gelová elektroforéza značených oligonukleotidů [online]*. 2011. Dostupné také z: <https://is.muni.cz/th/i09o1/>. Diplomová práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Brno.
- [51] JOHANSSON, B. G. Agarose Gel Electrophoresis. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. 1972, roč. 29, č. sup124, s. 7–19. ISSN 0036-5513, 1502-7686. Dostupné z DOI: 10.3109/00365517209102747.
- [52] JAROŠ, Luboš. *Předzpracování obrazu 1D gelové elektroforézy*. 2015. Dostupné také z: <http://hdl.handle.net/11012/40738>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně. Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, Brno.
- [53] KOŽUSZNIKOVÁ, Eliška. *Gelová elektroforéza ve výuce analytické chemie*. 2014. Dostupné také z: <https://is.muni.cz/th/cjwod/>. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Brno.
- [54] VACULÍKOVÁ, Anna. *Využití gelové elektroforézy a chirálních optických metod pro analýzu biologicky významných molekul*. 2019. Dostupné také z: <https://is.muni.cz/th/uklme/>. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Brno.
- [55] MERCK. *Nucleic Acid Electrophoresis Protocols Introduction*. 2021. Dostupné také z: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/nucleic-acid-electrophoresis.html#Polyacrylamide-gel-electrophoresis-for-DNA>.
- [56] SALA, Leo; ZEROLOVÁ, Agnes; RODRIGUEZ, Alvaro; REIMITZ, Dan; DAVÍDKOVÁ, Marie; EBEL, Kenny; BALD, Ilko; KOČIŠEK, Jaroslav. Folding DNA into origami nanostructures enhances resistance to ionizing radiation. *Nanoscale*. 2021. accepted.

Seznam obrázků

2.1	Časová osa vývoje statické a dynamické DNA nanotechnologie [3]. . .	11
2.2	Schéma struktury DNA podle Watsona a Cricka [11].	13
2.3	Detailní schéma DNA. a) Hlavní řetězce jsou tvořeny vazebným zbytkem od kyseliny fosforečné navázaným na deoxyribózu. Spárované nukleové báze drží řetězce pohromadě. b) Tyto dva řetězce jsou navzájem antiparalelní. c) Směr každého řetězce je očíslován podle počtu uhlíků (1 až 5) v každé molekule deoxyribózy. Na uhlík označený jako 5' na konci řetězce 5' není navázán žádný nukleotid. Totéž platí pro uhlík označený jako 3' na konci řetězce 3' [14].	14
2.4	Schéma konformace DNA. Zleva B forma (pravotočivá), A forma (pravotočivá) a Z forma (levotočivá) [13].	16
2.5	DNA origami vytvořené Rothemundem. Zleva hvězda, "smajlík" a trojúhelník [4].	18
2.6	Schéma přípravy DNA origami podle Rothemunda [4].	19
2.7	Depozice DNA (origami) na Si povrch [33].	19
2.8	Přístupy k designu DNA nanostruktur [30].	20
2.9	Program caDNAno pro vytvoření DNA origami ve tvaru trojúhelníku. Zleva, průřezový panel zobrazuje pohled na mřížku, do kterých mohou být uloženy šroubovice. Uprostřed, panel trajektorie poskytuje rozhraní pro editaci 2D nesrolovaných schémat drah základního a spojovacího vlákna. Napravo, panel vykreslující 3D model designu [autor].	21
2.10	Metoda salt-aging [37].	22
2.11	Metoda salt-aging za pomoci surfaktantu [37].	23
2.12	Ligand BSPP [37].	23
2.13	Depozice DNA origami-AuNP na Si povrch [39].	24
2.14	a) Příprava trojúhelníkové DNA origami s navázaným DOX. b) Intravenózně aplikované DOX-DNA origami se díky EPR hromadí v oblasti tumoru [41].	27
2.15	Fluorescenční zobrazení subjektů <i>in vivo</i> s aplikovaným DOX, DNA origami a DOX-DNA origami po dobu 12. dnů [41].	27
2.16	Princip měření AFM [45].	29
2.17	Průběh agarózové elektroforézy. a) Aplikace vzorků do vytvořených jamek v agarózovém gelu (horizontální systém). b) Migrace částic ke kladné elektrodě. c) Výsledný obraz za použití detekčního barviva [55].	31

3.1	Agregované (modrá) a neagregované (červená) zlaté nanočástice [autor].	35
3.2	Depozice DNA origami na křemíkový wafer [autor].	36
3.3	AFM mikroskop Scanning Probe Microscope Bruker Dimension Icon od firmy Bruker [autor].	36
3.4	Ve vodním fantomu umístěném těsně k primárním clonám ozařovače Chisostat jsou ponořené zkoumané vzorky k ozáření [autor].	37
3.5	Příprava agarózového gelu [autor].	38
3.6	Aparatura gelové elektroforézy Mupid-exU se vzorky [autor].	38
3.7	Příklad vydařené přípravy a depozice s koncentrací vhodnou pro další experimenty [autor].	39
3.8	Čtyři druhy DNA origami. Zleva nepoškozené, poškozené, denaturované a deformované [autor].	40
3.9	Konjugované DNA origami-AuNP v poměru 1:1,2, použité rozpouštědlo H ₂ O (30 μ l tris, 10 μ l MgCl ₂) [autor].	40
3.10	DNA origami s navázanými AuNP (bound) a DNA origami s nenavázanými AuNP (unbound) [autor].	41
3.11	DNA origami s navázanými nanočásticemi [autor].	41
3.12	Gelová elektroforéza DNA origami [autor].	42
3.13	Gelová elektroforéza modifikovaných DNA origami zlatými nanočásticemi [autor].	42
3.14	Modifikované DNA origami zlatými nanočásticemi. a) DNA origami-AuNP při ozáření 0 Gy. b) DNA origami-AuNP při ozáření 100 Gy. c) Oddělené zóny při gelové elektroforéze [autor].	43