



Univerza v Mariboru

Fakulteta za naravoslovje
in matematiko

VPLIV KONCENTRACIJE $(G_4C_2)_n$ DNK ZAPOREDIJ NA TVORBO IN DOLŽINO AGREGATOV V RAZTOPINAH

Diplomski seminar na študijskem programu 1. stopnje Fizika

Elena Čokor

Mentorica: doc. dr. Lea Spindler

Somentorica in lektorica: Melani Potrč, mag. fiz., dipl. slov. (UN) in prof. ped. (UN)

Maribor, 2024

Zahvala

Zahvaljujem se svoji mentorici, doc. dr. Lei Spindler, ki mi je omogočila čudovito izkušnjo eksperimentalnega dela v laboratoriju, da me je vodila in spodbujala na raziskovalni poti.

Najlepša hvala tudi doktorski študentki Melani Potrč za pomoč pri izvedbi meritev ter za jezikovni in slovnični pregled.

Zahvaljujem se prof. dr. Ireni Drevenšek Olenik za nasvete ter vsem sodelavcem Oddelka za kompleksne snovi F7 na Inštitutu Jožef Stefan za možnost raziskovalnega dela in sodelovanje.

Zahvaljujem se tudi vsem profesorjem Oddelka za fiziko Fakultete za naravoslovje in matematiko Univerze v Mariboru za vso znanje, ki so mi ga posredovali.

Posebej bi se rada zahvalila svoji družini, ki mi je omogočila študij, mi vedno stala ob strani in me podpirala v stresnih trenutkih.

Čokor E.: Vpliv koncentracije $(G_4C_2)_n$ DNK zaporedij na tvorbo in dolžino agregatov v raztopinah

Diplomski seminar, Univerza v Mariboru, Fakulteta za naravoslovje in matematiko, Oddelek za fiziko, 2024.

POVZETEK

V diplomskem seminarju proučujemo dinamiko agregatov, ki jih tvorita DNK zaporedji $d(G_4C_2)$ in $d(G_4C_2)_4$ v vodnih raztopinah. Meritve smo izvedli z metodo dinamičnega sipanja svetlobe na raztopinah s koncentracijami od 0,1 mM do 6 mM. Z analizo avtokorelacijskih krivulj smo izračunali difuzijske koeficiente za vsako raztopino. Ugotovili smo, da difuzijski koeficient z naraščanjem koncentracije najprej upada, kar pripišemo upočasnitvi dinamike zaradi nalaganja agregatov. Od določene minimalne vrednosti dalje pa difuzijski koeficient narašča zaradi polielektrolitske narave DNK molekul. Z UV-Vis spektroskopijo smo določili natančnosti pri pripravi in redčenju raztopin. Iz difuzijskega koeficienta smo na koncu izračunali še dolžino nastalih agregatov, in ugotovili, da $d(G_4C_2)_4$ tvori daljše aggregate kot $d(G_4C_2)$.

Ključne besede: DNK, kvadrupleksi, dinamično sipanje svetlobe, difuzijski koeficient, polielektroliti, dolžina agregatov

ABSTRACT:

In the Bachelor's seminar, we study the dynamics of aggregates formed by the DNA sequences of $d(G_4C_2)$ and $d(G_4C_2)_4$ in aqueous solutions. Measurements were performed using the dynamic light scattering method on solutions with concentrations ranging from 0.1 mM to 6 mM. The diffusion coefficients for each solution were calculated by analyzing the autocorrelation curves of the scattered light. We found that the diffusion coefficient initially decreases with increasing concentration, which we attribute to the slowing down of the dynamics due to the stacking of aggregates. Beyond a certain minimum value, the diffusion coefficient increases due to the polyelectrolytic nature of DNA molecules. By using UV-Vis spectroscopy, we determined the accuracy in the preparation and dilution of the solutions. Finally, we calculated the length of the aggregates from the diffusion coefficient and found that $d(G_4C_2)_4$ forms longer aggregates than $d(G_4C_2)$.

Key words: DNA, quadruplexes, dynamic light scattering, diffusion coefficient, polyelectrolytes, length of aggregates

Kazalo vsebine

1 Uvod	1
2 Struktura DNK kvadrupleksa	1
3 Dinamika polielektrolitov v raztopinah	3
4 Dinamično sipanje svetlobe	4
4.1 Postavitev eksperimenta	7
5 Priprava vzorcev	9
6 Meritve in rezultati	11
6.1 Analiza podatkov	13
6.2 UV-Vis spektroskopija	15
7 Analiza rezultatov	16
8 Zaključek	19

1 Uvod

DNK je osnovna molekula, v kateri je zapisan genetski material vseh živih bitij. Njena struktura in zaporedja nukleotidov, povezanih v dvojno vijačnico, so ključnega pomena za normalno delovanje celic in njihovo razmnoževanje [1]. Pri prepisovanju DNK in nastajanju novih celic lahko pride do napak in mutacij, kar vodi do različnih bolezni. Primer takšnih mutacij je prekomerno ponavljanje zaporedja $d(G_4C_2)$, ki vodi do hujših bolezni nevrološkega sistema, kot sta amiotrofična lateralna skleroza (ALS) in frontotemporalna demenca (FTD) [2–4].

Sekvence DNK, bogate z gvaninom, lahko tvorijo strukture, imenovane G-kvadrupleksi. G-kvadrupleksi nastanejo, ko se štiri molekule gvanina združijo v G-tetrad in nalagajo ena na drugo. Zaradi povezanosti zaporedja $d(G_4C_2)$ z nevrološkiimi boleznimi smo želeli pokazati, da to zaporedje tvori G-kvadruplekse. Zanimalo nas je tudi, kakšen je vpliv koncentracije DNK na obnašanje in nastanek kvadrupleksov, ker se molekula DNK v genetskem materialu nahaja v zelo koncentriranem stanju [5–7].

Cilj diplomskega seminarja je preučiti dinamiko raztopin $d(G_4C_2)$ in $d(G_4C_2)_4$ zaporedij pri različnih koncentracijah z dinamičnim sipanjem svetlobe [8–10]. Pokazati želimo, da se s povečevanjem koncentracije povečuje dolžina agregatov, to je, da se kvadrupleksi nalagajo drug na drugega in se difuzijski koeficient zmanjšuje. Z nadaljnjim povečevanjem koncentracije pričakujemo, da imajo večji vpliv elektrostatične sile med delci, zato se poveča tudi difuzijski koeficient.

V diplomskem seminarju naprej razložimo strukturo DNK in kako nastajajo kvadrupleksi (2. poglavje) ter njihovo dinamiko v raztopinah (3. poglavje). Nato predstavimo metodo dinamičnega sipanja svetlobe in postavitev eksperimenta (4. poglavje). Zatem razložimo, kako smo pripravljali raztopine (5. poglavje). Sledi postopek izvedbe meritev in prikaz rezultatov (6. poglavje). Nazadnje rezultate preučimo in izračunamo dolžino agregatov (7. poglavje).

2 Struktura DNK kvadrupleksa

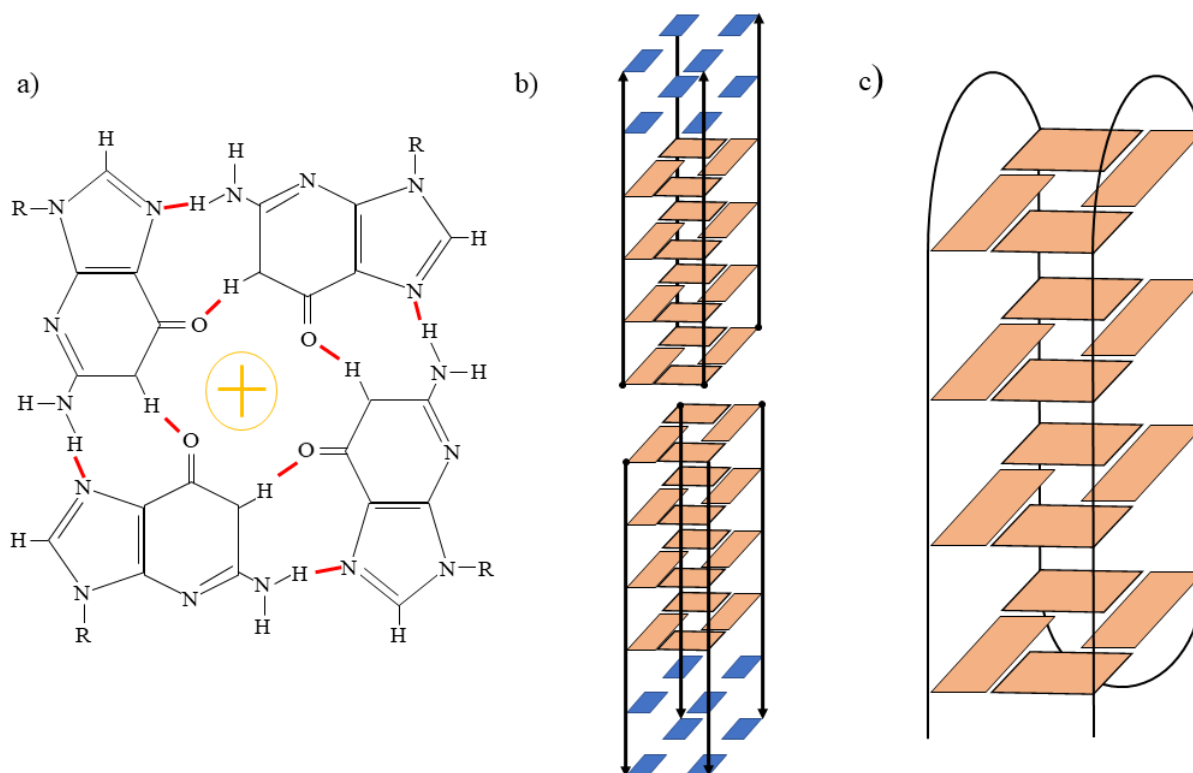
Molekula DNK je osnova genskega materiala, zato je zelo pomembno, da poznamo njeno zgradbo in vlogo v človeškem telesu. Sestavljena je iz dveh dolgih polinukleotidov, ki tvorita dvojno vijačnico. Verigi polinukleotidov sta med seboj povezani z vodikovimi vezmi.

Nukleotidi so sestavljeni iz sladkorja, fosfatne skupine in dušikove baze. Sladkor ima pet ogljikovih atomov, zato ga imenujemo pentoza. V molekuli DNK pa je prisotna deoksiriboza, po kateri je molekula DNK dobila ime. Molekula sladkorja je povezana z eno fosfatno skupino. Sladkor in fosfatna skupina sta povezani z dušikovimi bazami, ki so lahko gvanin, citozin, adenin in timin [1].

Oligonukleotidi so manjši deli polinukleotidov, ki vsebujejo do 20 nukleotidov. Če je oligonukleotid bogat z gvaninom (G), lahko tvori strukturo, imenovano G-kvadrupleks.

Osnovna enota kvadrupleksa je G-tetrada, ki nastane, ko se štirje gvanini med seboj povežejo z vodikovimi vezmi in je en gvanin hkrati akceptor in donor dveh vodikovih vezi (slika 1a). G-tetrada na sredini vsebuje en monovalentni kation, ki prispeva k njeni stabilnosti. Najmočnejše vezane G-tetrade vsebujejo kalijev kation. G-tetrade se nato nalagajo ena na drugo, tako da tvorijo G-kvadrupleks [2,3]. Struktura G-kvadrupleksa je odvisna od števila gvaninov in dolžine zaporedja. Najkrajša DNK zaporedja običajno tvorijo G-kvadruplekse iz štirih zaporedij (slika 1b), daljša pa se lahko zvijejo tako, da nastane kvadrupleks iz enega samega zaporedja (slika 1c).

Predhodne študije so pokazale, da ima zaporedje $d(G_4C_2)$ strukturo tetramolekularnega vzporednega kvadrupleksa. Dva takšna vzporedna kvadrupleksa lahko sestavimo v dimerni sklop in tako dobimo simetrično strukturo (slika 1b) [2]. Zaporedje $d(G_4C_2)_4$, ki je daljše, se zvije tako, da nastane G-kvadrupleks, sestavljen iz štirih G-tetrad in treh zank, v katerih je citozin (slika 1c) [3].



Slika 1. a) Struktura G-tetrade: štiri molekule gvanina se povežejo z vodikovimi vezmi (v rdeči barvi). Kovinski ion v sredini stabilizira strukturo. b) Struktura zaporedja $d(G_4C_2)$ [2]. Gvanin je predstavljen v oranžni barvi, citozin v modri. c) Struktura zaporedja $d(G_4C_2)_4$ [3], citozin je v stranskih zankah.

Dolžina G-kvadrupleksov je zelo pomembna pri razvoju nevrodegenerativnih bolezni, kot sta amiotrofična lateralna skleroza (ALS) in frontotemporalna demenca (FTD). Obe bolezni temeljita na prekomernem povečanju števila $d(G_4C_2)$ zaporedij v strukturi gena *C9orf72*. ALS je bolezen, za katero je značilno propadanje in izguba motoričnih nevronov v možganih in hrbtenjači, zaradi česar mišice postopoma oslabijo in povzročijo paralizo. FTD je oblika demence, ki se pojavi zaradi progresivne degeneracije čelnega in sprednjega temporalnega režnja možganov [4]. Tvorba G-kvadrupleksa ustvarja strukture v kromosomih, ki vplivajo na transkripcijo genov. Izkazalo se je, da takšne spremembe v strukturi gena *C9orf72* vodijo do

bolezni ALS in FTD. To pomeni, da imajo bolni ljudje večje število ponovitev teh struktur v primerjavi z zdravimi ljudmi [4].

3 Dinamika polielektrolitov v raztopinah

Molekule v raztopini imajo kinetično energijo, zaradi česar se nenehno premikajo. Takšno gibanje molekul je naključno in ga imenujemo Brownovo gibanje. Poti sosednjih molekul so stohastično neodvisne in ne moremo predvideti, kje bo molekula v naslednjem trenutku. Lahko pa takšno gibanje opišemo kot naključno gibanje po tridimenzionalni (3D) mreži, kjer delec potrebuje čas t_1 , da naredi korak dolžine b , zato je difuzijski koeficient (D) definiran kot:

$$D = \frac{b^2}{6t_1} . \quad (1)$$

Faktor 6 v enačbi (1) opisuje, da se molekula lahko giblje v treh dimenzijah in ima vsaka dimenzija dve smeri. Poleg tega lahko napovemo tudi verjetnost ($P(r, r', t)$), da bo delec, ki smo ga začeli preučevati ob času $t = 0$ in na mestu r' , po času t na mestu r . Ta verjetnost je Gaussova porazdelitev:

$$P(r, r', t) = \frac{1}{(4\pi Dt)^{\frac{3}{2}}} e^{-\frac{(r-r')^2}{4Dt}} . \quad (2)$$

Gaussova porazdelitev (enačba (2)) reši difuzijsko enačbo z začetnim pogojem $P(r, r', t) = \delta(r - r')$:

$$\frac{\partial P(r, r', t)}{\partial t} = D \nabla_r^2 P(r, r', t) . \quad (3)$$

Za koncentracijo $c(r, t)$ na mestu r ob času t tudi velja difuzijska enačba:

$$\frac{\partial c(r, t)}{\partial t} = D \nabla_r^2 c(r, t) . \quad (4)$$

Difuzijski koeficient delcev brez medsebojne interakcije (D_0) podaja Einsteinova enačba [8]:

$$D_0 = \frac{k_B T}{f} , \quad (5)$$

kjer je k_B Boltzmannova konstanta, T temperatura in f translacijski koeficient viskoznega upora. Za krogelne delce velja:

$$f = 6\pi\eta R , \quad (6)$$

kjer η predstavlja viskoznost raztopine in R polmer krogelnega delca [8]. Včasih to enačbo uporabimo tudi za bolj zapletene oblike, tako da ocenimo, da je dimenzija delca enaka efektivni dolžini, ki jo imenujemo hidrodinamski polmer r_h , in enačbo (5) posplošimo na:

$$D_0 = \frac{k_B T}{6\pi\eta r_h} . \quad (7)$$

Za paličaste delce, kot je npr. molekula DNK, uporabimo hidrodinamično teorijo, ki sta jo razvila Tirado in Garcia de la Torre, z modelom več obročev, postavljenih drug na drugega [7]. Teorija povezuje koeficient difuzije paličastih agregatov z njihovim premerom (d) in dolžino (L):

$$D = \frac{k_B T}{3\pi\eta L} (\ln(p) + \nu), \quad (8)$$

kjer je p razmerje med dolžino agregata in premerom cilindra, $p = L/d$. Teorija velja, ko je vrednost p v območju med 2 in 30, ν pa je korekcijski faktor [7]:

$$\nu = 0,310 + \frac{0,565}{p} - \frac{0,100}{p^2}. \quad (9)$$

Molekula DNK je močno električno nabit delec, ki ga imenujemo polielektrolit, v raztopini pa disocira na poliione. Ker so polielektroliti naelektreni, so poleg Brownovega gibanja v raztopini tudi medmolekularne interakcije zaradi elektrostatičnih sil. Na porazdelitev majhnih ionov močno vpliva električni potencial poliionov. Zato moramo pri definiranju fluktuaciji numerične koncentracije ionov ($n'_\alpha(r, t)$) z difuzijsko enačbo dodati člen, ki upošteva električni potencial [5]:

$$\frac{\partial \Delta n'_\alpha(r, t)}{\partial t} = D \nabla^2 \Delta n'_\alpha(r, t) + D \frac{Z e n_\alpha}{k_B T} \nabla^2 \phi(r, t), \quad (10)$$

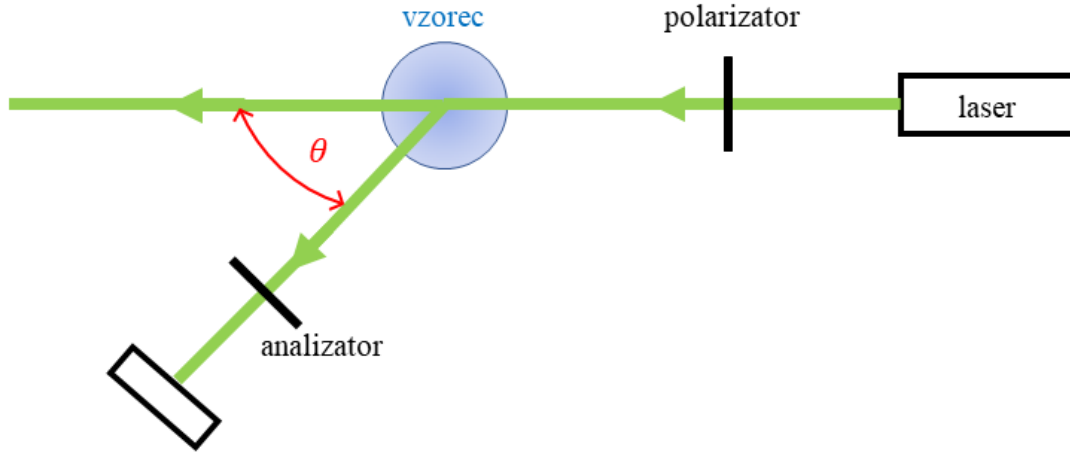
kjer je $n_\alpha(r, t)$ povprečna vrednost, okoli katere fluktuiira $n'_\alpha(r, t)$ za $\Delta n'_\alpha(r, t)$, Z število nabojev, e osnovni naboj in $\phi(r, t)$ električni potencial.

Pri višjih koncentracijah DNK elektrostatične sile prevladajo in spremenijo dinamiko v raztopini, kar opazimo kot spremembo difuzijskega koeficienta [5,6]. Ker imamo pri višjih koncentracijah v manjši prostornini več delcev, ki se odbijajo, se električne sile povečajo in dinamika pospeši, kar vidimo kot povečanje difuzijskega koeficienta. Eksperimentalno je bilo pokazano, da se s povečevanjem koncentracije DNK poveča tudi difuzijski koeficient [5,6]. Če to velja tudi za G-kvadruplekse, smo želeli ugotoviti z raziskavo, o kateri poročamo v tem seminarju.

4 Dinamično sipanje svetlobe

Dinamično sipanje svetlobe (ang. *Dynamic Light Scattering*, DLS), znano tudi kot fotonska korelacijska spektroskopija, je eksperimentalna metoda, ki se uporablja predvsem za preučevanje Brownovega gibanja v raztopinah, ki se nato poveže z difuzijskim koeficientom in velikostjo molekul ali agregatov. Metoda DLS je zelo uporabna, ker ni invazivna in ne zahteva velike količine vzorca. Za dinamično sipanje svetlobe se uporablja monokromatska koherentna svetloba [8,10]. Ko takšna svetloba pride v stik z raztopino, ki vsebuje makromolekule, se siplje v vse smeri. Po sipanju z detektorjem izmerimo intenziteto sipane svetlobe in njene fluktuacije, kar nam omogoča izračun difuzijske konstante raztopine in kasneje velikosti delcev.

Monokromatska laserska svetloba gre najprej skozi linearni polarizator in nato skozi vzorec, kjer se del svetlobe siplje v vse smeri. Sipana svetloba gre nato skozi analizator, ki ima enako prepustno smer kot polarizator, in nato vpade na detektor. Detektor meri intenziteto svetlobe, ki se siplje pod kotom θ glede na smer vpadnega žarka. Presečišče med vpadnim in sipanim snopom imenujemo sipalni volumen V .



Slika 2. Shema postavitve sistema za merjenje dinamičnega sipanja svetlobe. θ je kot, pod katerim merimo intenziteto sipane svetlobe.

Intenziteta sipane svetlobe je odvisna od lege in gibalne količine posameznega delca v sipalnem volumnu. Položaj in gibalna količina se spreminjata, ker se delci prosto gibljejo. Vstopajo v volumen in iz njega, zato intenziteto, ki s časom fluktuira, v določenem trenutku zapišemo kot odvisnost od velikosti sipalnega vektorja (q) in časa (t) $I(q, t)$ [9]. Intenziteto merimo čas T , ki je veliko daljši od časa fluktuacij intenzitete. Zaradi fluktuacij izračunamo povprečno vrednost intenzitete $\langle I \rangle$ tako, da seštejemo posamezne prispevke za vsak diferencialno majhen interval dt [9]:

$$\langle I \rangle = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_0^T I(q, t) dt . \quad (11)$$

Intenziteta sipane svetlobe fluktuira okrog povprečne vrednosti, zaradi česa vrednost intenzitete $I(q, t)$ ni enaka vrednosti $I(q, t + \tau)$, kjer τ predstavlja časovni zamik. Če je τ dovolj majhen ($\tau \rightarrow 0$), lahko rečemo, da sta intenziteti $I(q, t)$ in $I(q, t + \tau)$ stohastično odvisni, če je τ prevelik ($\tau \rightarrow \infty$), sta stohastično neodvisni. Odvisnost med tema dvema intenzitetama preverjamo z avtokorelacijsko funkcijo [9]:

$$\langle I(q, 0)I(q, \tau) \rangle = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_0^T I(q, t)I(q, t + \tau) dt . \quad (12)$$

Avtokorelacijsko funkcijo ($g_2(q, \tau)$) za intenziteto imenujemo tudi korelacijska funkcija drugega reda in jo normaliziramo kot [8]:

$$g_2(q, \tau) = \frac{\langle I(q, 0)I(q, t + \tau) \rangle}{\langle I(q, t)^2 \rangle} . \quad (13)$$

Svetloba, ki jo zaznamo, vpada na N delcev, kar pomeni, da jakost električnega polja sipane svetlobe dobimo kot vsoto jakosti električnega polja svetlobe, ki se siplje na posameznem delcu [9]:

$$E_s(t) = E_0 \sum_j^N e^{i\vec{q} \cdot \vec{r}_j} . \quad (14)$$

Jakost električnega polja dobimo iz meritev intenzitete, saj vemo, da sta povezani na način:

$$I \propto |E_s|^2 . \quad (15)$$

Avtokorelacijsko funkcijo za jakost električnega polja ($g_1(q, \tau)$), ki ji pravimo korelacijska funkcija prvega reda [8], definiramo na podoben način kot avtokorelacijsko funkcijo za intenziteto (enačba (13)):

$$g_1(q, \tau) = \frac{\langle E_s(q, 0) E_s(q, t + \tau) \rangle}{\langle I(q, t) \rangle} . \quad (16)$$

Če bi na detektor vpadla samo svetloba, ki vpada na vzorec, bi bila meritev homodinska in bi po enačbi (15) veljalo:

$$g_2(q, \tau) = |g_1(q, \tau)|^2 . \quad (17)$$

Toda poleg intenzitete svetlobe, ki se siplje na vzorcu, na detektor vpade tudi intenziteta svetlobe, ki se siplje na prašnih delcih v zraku. Meritev je zato heterodinska in zanjo velja [8]:

$$g_2(q, \tau) = 1 + |g_1(q, \tau)|^2 . \quad (18)$$

V vzorcih se makromolekule naključno gibljejo (Brownovo gibanje), zato sipanje svetlobe na njih lahko obravnavamo z Gaussovo statistiko. Iz katere sledi, da korelacijski faktor jakosti električnega polja ($g_1(q, \tau)$) pada eksponentno in je odvisen od konstante razpada Γ :

$$g_1(q, \tau) = e^{-\Gamma\tau} . \quad (19)$$

Enačbo (18) lahko zdaj zapišemo kot:

$$g_2(q, \tau) - 1 = e^{-2\Gamma\tau} , \quad (20)$$

pri čemer velja:

$$\Gamma = Dq^2 , \quad (21)$$

kjer je D difuzijski koeficient, ki ga lahko izračunamo, če poznamo relaksacijski čas $\tau_0 = 1/\Gamma$ in velikost sipalnega vektorja:

$$D = \frac{1}{\tau_0 q^2} . \quad (22)$$

Sipalni vektor je definiran kot razlika med valovnim vektorjem sipanega valovanja ($\vec{k}_s$) in valovnim vektorjem vpadnega valovanja ($\vec{k}_v$):

$$\vec{q} = \vec{k}_s - \vec{k}_v , \quad (23)$$

kjer $\vec{k}_s$ in $\vec{k}_v$ opisujeta smer razširjanja valovanja, tj. smer razširjanja valovnih čel. Sipanje je elastično, kar pomeni, da se valovna dolžina ne spremeni, zato sta velikosti valovnega vektorja vpadnega (k_v) in sipanega valovanja (k_s) enaki:

$$k_s = k_v \quad (24)$$

in lahko obe označimo s k . Velikost valovnega vektorja k je odvisna od lomnega količnika snovi (n) in valovne dolžine svetlobe v vakuumu (λ):

$$k = \frac{2\pi n}{\lambda} \quad (25)$$

Ob upoštevanju enačbe (23) lahko izračunamo velikost sipalnega vektorja kot:

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin \frac{\theta}{2} \quad (26)$$

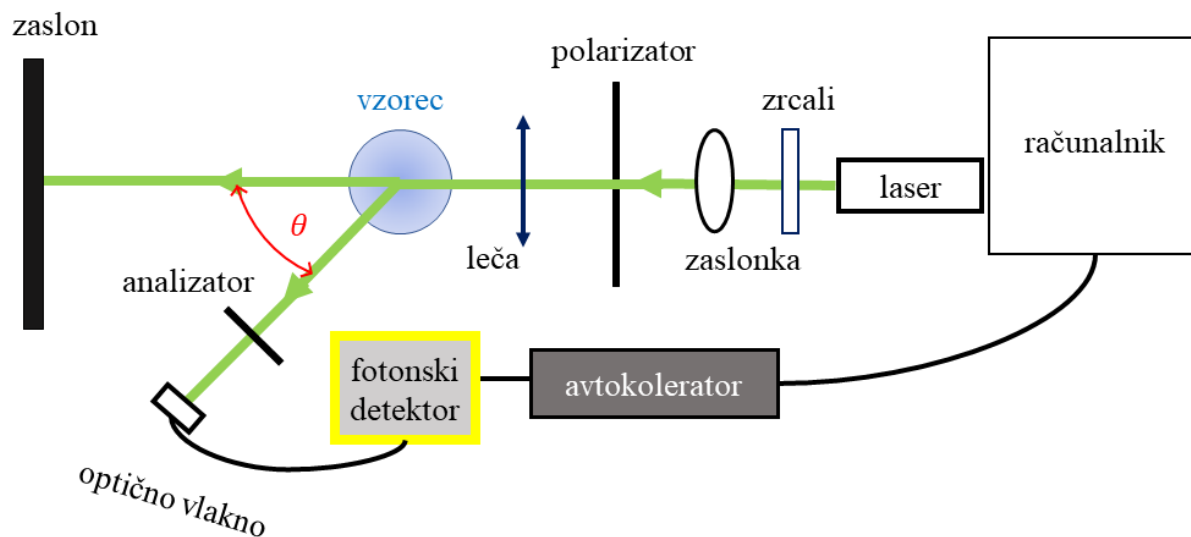
Difuzijski koeficient iz enačbe (22) je neposredno povezan z obema difuzijskima koeficientoma (enačbi (7) in (8)), definiranima v prejšnjem poglavju. Difuzijski koeficient v enačbi (22) je strmina premice na grafu $1/\tau_0$ od q^2 . Če poznamo še viskoznost raztopine in temperaturo vzorca med meritvijo, lahko izračunamo hidrodinamični polmer krogelnih delcev po enačbi (7). Za paličaste delce, torej kvadruplekse, dobimo tudi difuzijski koeficient po enačbi (22). Če poznamo viskoznost, temperaturo in premer paličastih delcev, lahko ob upoštevanju enačbe (9) izračunamo njihovo dolžino po enačbi (8).

4.1 Postavitev eksperimenta

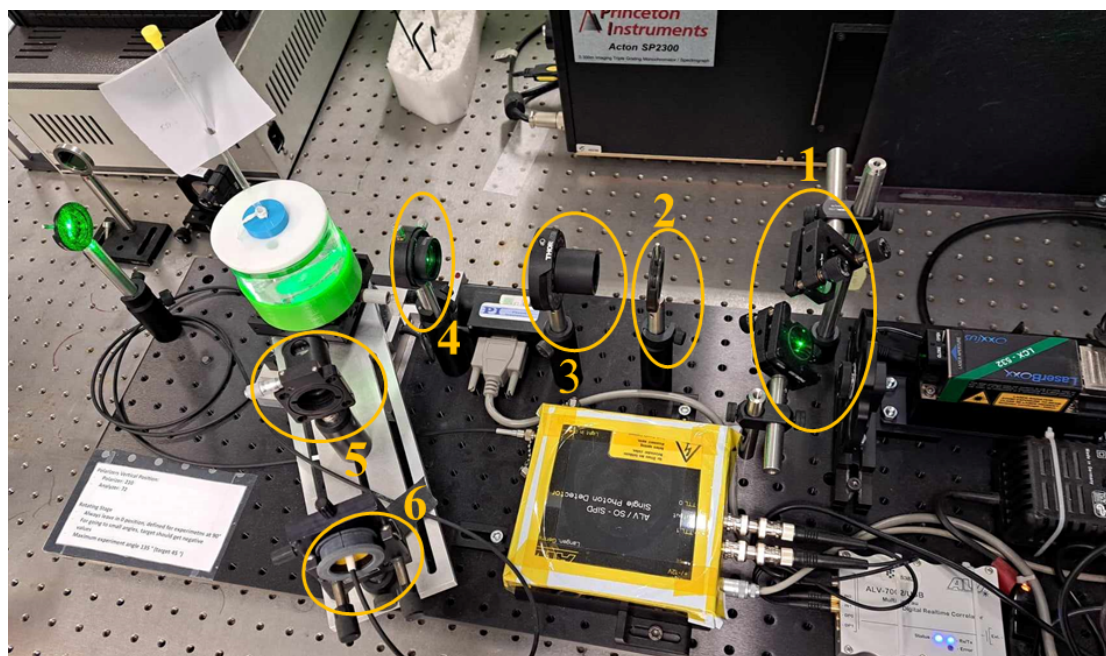
Podrobna shema postavitve eksperimenta je prikazana na sliki 3. Svetlobo iz laserja najprej zrcaloma usmerimo na vzorec tako, da pade pravokotno nanj. Po tem gre svetloba skozi zaslonko in polarizator, ki prepušča svetlobo s polarizacijo v navpični smeri. Zatem svetlobo z lečo zberemo na vzorcu, kjer se del svetlobe siplje, del pa gre skozenj in vpade na zaslon. Na zaslonu vidimo pike, ki so posledica konstruktivne interference vpadne svetlobe, ki jo razpršijo posamezni delci. Sipana svetloba gre skozi analizator, ki prepušča svetlobo polarizirano v navpični smeri, do optičnega vlakna (slika 4). Optično vlakno vodi svetlobo do enojnega fotonskega detektorja (fotopomnoževalka), ki zazna posamezne fotone z visoko učinkovitostjo in nizkim šumom. Po zaznavi in štetju fotonov pošlje električni impulz z informacijo v avtokorelator (ALV-7002/US B Multiple Tau Digital Realtime Correlator). Avtokorelator izračuna avtokorelacijsko funkcijo intenzitete ($g_2(q, \tau) - 1$). Z računalniškim programom ALV-Correlator te podatke analiziramo in dobimo graf avtokorelacijske funkcije v odvisnosti od relaksacijskega časa.

Vse meritve smo opravili z Nd:YAG laserjem, ki ima valovno dolžino $\lambda = 532$ nm. Roko, na kateri sta analizator in začetek optičnega vlakna, lahko vrtimo in s tem spreminjamo kot θ . Za vsako raztopino smo izmerili intenziteto sipane svetlobe med koti $\theta = 40^\circ$ in $\theta = 120^\circ$, v intervalih po 10° . Koti so tako omejeni zaradi postavitve eksperimenta. Vzorec je v cevki iz

homogenega stekla, postavljen v valjasto stekleno posodo z vodo. Posoda se nahaja na nepremični podlagi (slika 5). Cevko damo v vodo, da tanke dimenzije cevke ne bi povzročile učinka lečenja.



Slika 3. Shema postavitve eksperimenta, kjer je θ kot, pod katerim postavimo detektor in merimo intenziteto sipane svetlobe (sipalni kot).



Slika 4. Postavitev eksperimenta. 1: zrcali, 2: zaslonka, 3: polarizator, 4: leča, 5: analizator in 6: optično vlakno.



Slika 5. Vzorec v stekleni cevki, postavljeni v valjasto posodo z vodo, ki zmanjšuje učinek lečenja med stenami cevke in okolice.

5 Priprava vzorcev

Pri belgijskem podjetju Eurogentec smo naročili sintetizirana oligonukleotida $d(G_4C_2)$ in $d(G_4C_2)_4$. Vzorci so bili liofilizirani, kar pomeni, da ne vsebujejo vode. Posode z vzorci vsebujejo potrebne podatke, kot so masa vzorca, molska masa in molarni ekstinkcijski koeficient (ϵ). Podatki se nahajajo v preglednici 1.

Preglednica 1. Masa (m), molska masa (M) in molarni ekstinkcijski koeficient (ϵ) obeh vzorcev.

	m (mg)	M (g/mol)	ϵ (L/mol cm)
G_4C_2	17,02	1833,2	55100
$(G_4C_2)_4$	39,13	7518,8	217700

Iz podatkov v preglednici 1 smo izračunali, koliko vode moramo odpipetirati v posodo z vzorcem, da pripravimo založno raztopino določene koncentracije. Odločili smo se za pripravo 8 mM raztopine oligonukleotida v čisti vodi. Najprej izračunamo množino oligonukleotida (n):

$$n = \frac{m}{M} , \quad (27)$$

kjer je m masa in M molekulska masa. Volumen vode (V), ki jo potrebujemo, je odvisen od koncentracije (c) in množine:

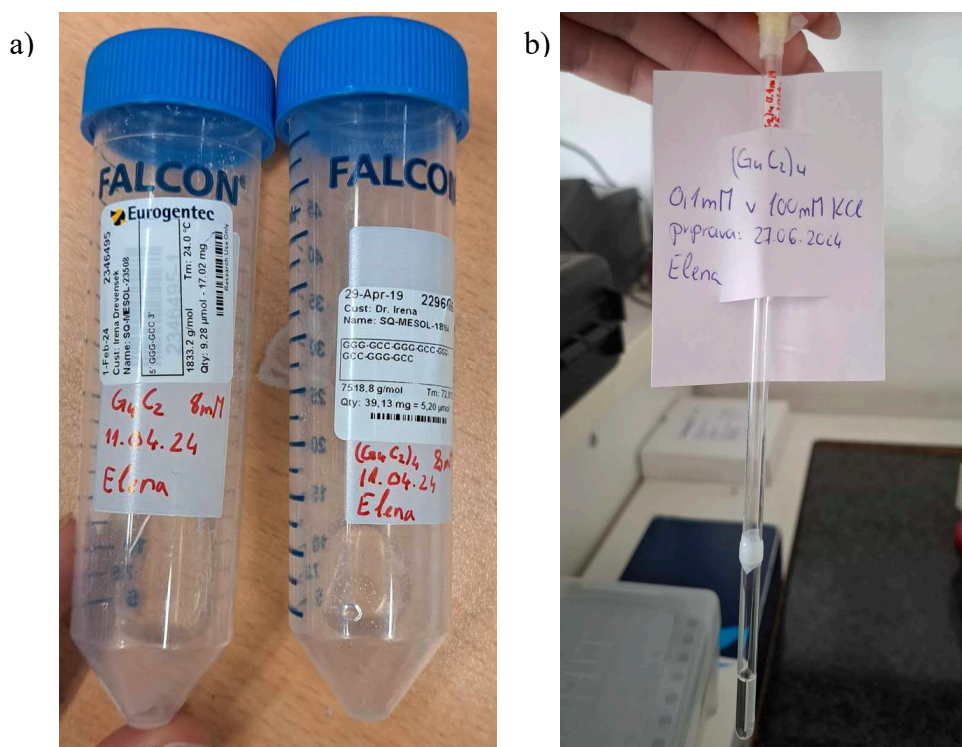
$$V = \frac{n}{c} . \quad (28)$$

Založno raztopino smo dobili tako, da smo celoten liofiliziran material raztopili v vodi. Voda, ki smo jo uporabili, je bila predhodno prečiščena in filtrirana.

Da smo zagotovili in pospešili nastanek kvadrupleksov, smo vsem raztopinam dodali 100 mM KCl. Zaradi tega smo poleg založne raztopine oligonukleotidov pripravili tudi založno raztopino KCl v čisti vodi, s koncentracijo 500 mM.

Začetne koncentracije oligonukleotidov (1 mM in 6 mM) smo naredili z dodajanjem 500 mM KCl in vode k založni 8 mM raztopini oligonukleotida. Nato smo 1 mM razredčili na 0,5 mM, 0,2 mM in 0,1 mM ter 6 mM na 4 mM in 2 mM. Za lažje redčenje smo pripravili 100 mM KCl, ki omogoča redčenje brez dodajanja vode.

Po pripravi smo 300 μ L raztopine odpipetirali v cevko, ki smo jo tesno zaprli s Parafilmom, da smo preprečili dotok zraka in s tem sušenje vzorca. Na cevko smo zapisali potrebne podatke, da ne bi prišlo do mešanja raztopin. Dodatne podatke smo napisali na list (slika 6b). Vse raztopine so bile hranjene v laboratoriju pri konstantni temperaturi $T = 21^{\circ}\text{C}$.



Slika 6. a) Založne 8 mM raztopine obeh oligonukleotidov v čisti vodi. b) Raztopina 0,1 mM $(\text{G}_4\text{C}_2)_4$ v 100 mM KCl v cevki za DLS meritev.

Ko smo raztopine pripravili, je bilo treba počakati določen čas, da smo lahko proučevali tudi staranje raztopin, zato smo ob različnih časih pripravljali različne koncentracije. Podatki o pripravi so v preglednici 2.

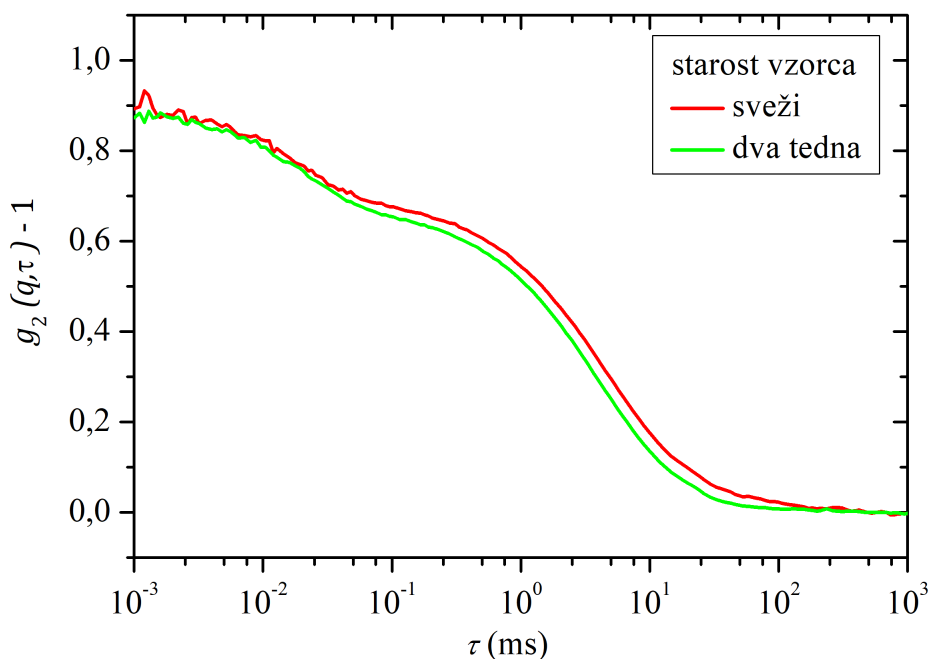
Preglednica 2. Datumi priprave posameznih koncentracij raztopin oligonukleotidov.

koncentracija	d(G ₄ C ₂)	(G ₄ C ₂) ₄
6 mM	10. 6. 2024	10. 6. 2024
5 mM	-	05. 7. 2024
4 mM	24. 6. 2024	27. 6. 2024
2 mM	27. 6. 2024	27. 6. 2024
1 mM	26. 4. 2024	13. 5. 2024
0,5 mM	28. 6. 2024	13. 5. 2024
0,2 mM	07. 6. 2024	17. 6. 2024
0,1 mM	21. 6. 2024	28. 6. 2024

6 Meritve in rezultati

Eksperimentalna oprema za dinamično sipanje svetlobe je postavljena v laboratoriju za ultrahitro spektroskopijo na Odseku za kompleksne snovi (F7) na Institutu Jožef Stefan. Z meritvami smo začeli aprila in zaključili julija 2024. Preden smo začeli z meritvami vzorcev DNK, smo se morali seznaniti z opremo. Zato smo najprej opravili meritve na kroglicah iz lateksa, katerih polmer poznamo, opravili smo tudi meritve na starih vzorcih DNK, za katere smo že vedeli, kakšen mora biti difuzijski koeficient. Po seznanitvi z eksperimentalno opremo smo pripravili prve vzorce in začeli z meritvami.

Difuzijski koeficient je odvisen od temperature, zato je zelo pomembno, da imamo pri merjenju približno enako temperaturo. Klimatski sistem je zagotavljal, da je bila temperatura v laboratoriju konstantna $T = 21^{\circ}\text{C}$. Rezultat vsake meritve je bila avtokorelacijska krivulja $g_2(q, \tau) - 1$ v odvisnosti od relaksacijskega časa τ , ki jo je bilo nato treba analizirati, da smo lahko izračunali difuzijski koeficient raztopine. Primer takšne funkcije je na sliki 7. Na grafu vidimo dva difuzijska načina: hitrega in počasnega. Hitri način je povezan z Brownovim gibanjem molekul v raztopini. Za nas je pomembnejši, ker je povezan z gibanjem makromolekul, kot so kvadrupleksi, ki jih želimo preučevati. Počasni način (ang. *slow mode*), je povezan s koncentracijskimi fluktuacijami dolgega dosega oziroma z dinamiko velikih domen, zato počasnega načina ne bomo proučevali.



Slika 7. Avtokorelacijska krivulja $g_2(q, \tau) - 1$ v odvisnosti od relaksacijskega časa τ za sveže pripravljeno in dva tedna staro 1 mM raztopino $d(G_4C_2)$ v 100 mM KCl pri $\theta = 80^\circ$.

Z meritvami smo začeli na obeh vzorcih ($d(G_4C_2)$ in $d(G_4C_2)_4$) s koncentracijo 1 mM v 100 mM KCl, ker so bile meritve s to koncentracijo predhodno že narejene in smo tako imeli kontrolni podatek. Meritve smo izvedli takoj po pripravi vzorcev, da smo lahko proučili obnašanje svežih raztopin. Potem smo počakali dva tedna in ponovno izvedli meritve, enako smo naredili po enem mesecu. V svežem vzorcu kvadrupleksi šele nastajajo in se razporejajo v prostoru, zato je zaradi prehodnih pojavov dinamika vzorca nemirnejša. Po dveh tednih in po enem mesecu je dinamika stabilnejša, saj so se kvadrupleksi naložili na končno dolžino.

Ko smo po enem mesecu izvedli meritve na vzorcih $d(G_4C_2)$ in $d(G_4C_2)_4$, smo ju razredčili na koncentracijo 0,5 mM raztopine v 100 mM KCl. Raztopine smo razredčili v vrstnem redu od 1 mM do 0,5 mM, nato do 0,2 mM in nazadnje do 0,1 mM. Postopek redčenja smo izvedli tako, da smo začetni koncentraciji dodali potreben volumen 100 mM raztopine KCl v čisti vodi. Vsako od raztopin smo meritve izvedli takoj po redčenju in po dveh tednih. Nato smo za obe sekvenci pripravili 6 mM raztopino v 100 mM KCl in ju na enak način razredčili na koncentracijo 4 mM in 2 mM. Tudi za te raztopine smo izvedli meritve takoj po pripravi in po dveh tednih. Za vse raztopine smo meritve izvedli pri kotih od 40° do 120° v intervalih po 10° in za vsako meritev dobili avtokorelacijsko krivuljo, iz katere lahko izračunamo difuzijski koeficient.

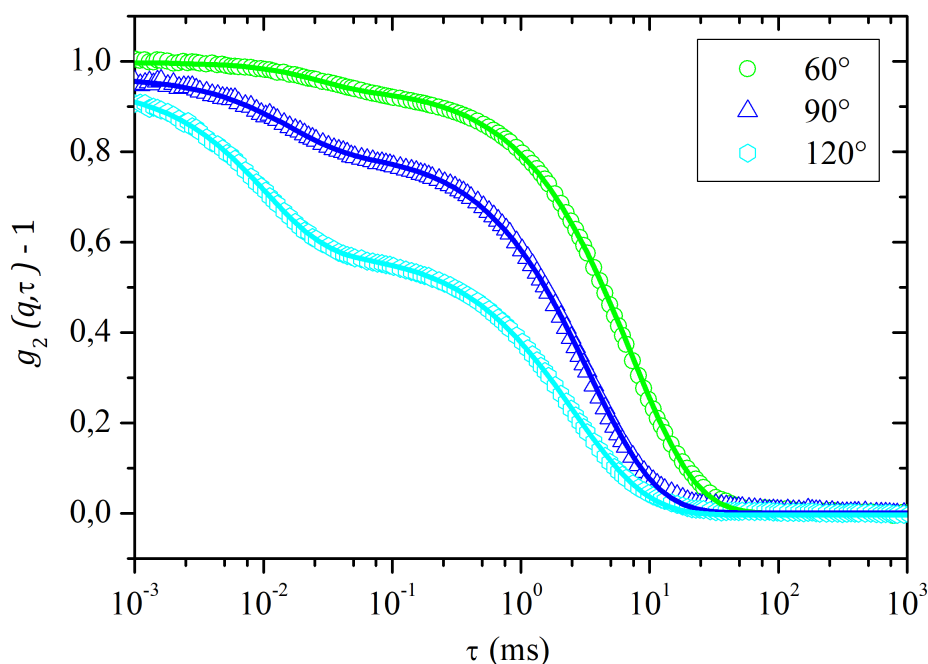
6.1 Analiza podatkov

Računalnik med meritvijo prejema podatke iz avtokorelatorja in na zaslon izriše graf avtokorelacijske funkcije v odvisnosti od relaksacijskega časa. Poleg tega podatke shrani v ASCII datoteko. ASCII datoteko nato uvozimo v program OriginPro 8.5, kjer jo lahko analiziramo.

Najprej v programu OriginPro 8.5 definiramo funkcijo, s katero analiziramo podatke [10]:

$$y = y_0 + \left[1 + j(a_1 e^{-(tf_1)^{s_1}} + (1 - a_1)e^{-(tf_2)^{s_2}} - 1) \right]^2, \quad (29)$$

kjer y predstavlja $g_2(q, \tau) - 1$, j razmerje med intenziteto elastično sipane svetlobe in intenziteto celotne sipane svetlobe, a_1 amplitudo hitrega dinamičnega načina, t čas, f_1 in f_2 relaksacijski frekvenci hitrega in počasnega dinamičnega načina, s_1 in s_2 sta eksponenta raztezka, ki določata širino porazdelitve relaksacijskih časov. V primeru zelo ozke porazdelitve je $s \approx 1$, kar pomeni, da imajo skoraj vsi delci enake velikosti. Relaksacijski frekvenci sta povezani z relaksacijskim časom hitrega ($f_1 = 1/\tau_1$) in počasnega ($f_2 = 1/\tau_2$) načina. Z relaksacijskimi frekvencami namesto z relaksacijskim časom delamo zato, da se izognemo deljenju v eksponentu za lažje prilagajanje funkcij v programu Origin. Parametrom y_0, j, s_1, s_2 dodelimo začetne vrednosti, da funkcijo (enačba (29)) lažje prilagodimo izmerjeni avtokorelacijski funkciji. Izhodišče meritev (ang. *baseline*) je pri ničli, zato faktorju y_0 postavimo začetno vrednost 0, faktorju j vrednost 0,8, ki opiše heterodinsko mešanje, faktorjem s_1 in s_2 pa vrednost 1, ki nakazuje ozko porazdelitev. Te vrednosti postopoma spreminjamo, dokler se funkcija ne ujema s krivuljo (slika 8). Nato za vsak kot dobimo parametre prilagoditve, ki so za primer na sliki 8 zbrani v preglednici 3.



Slika 8. Avtokorelacijska krivulja $g_2(q, \tau) - 1$ v odvisnosti od relaksacijskega časa τ za svežo 4 mM raztopino $d(G_4C_2)$ v 100 mM KCl pri sipalnih kotih 60° , 90° in 120° . Polne črte predstavljajo prilagoditvene funkcije (enačba (29)). Vrednosti parametrov so podane v preglednici 3.

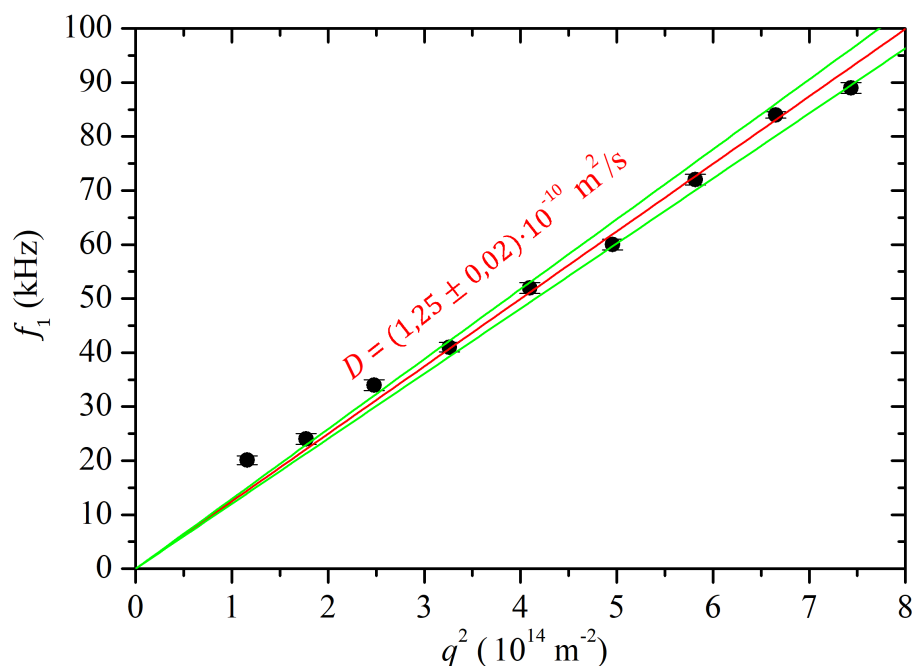
Parametri z indeksom 1 so povezani s hitrim difuzijskim načinom, parametri z indeksom 2 pa s počasnim. Ker je hitri način povezan z Brownovim gibanjem makromolekul, se bomo v nadaljevanju osredotočili na hitrejši način in z njim povezan parameter f_1 . Ob upoštevanju definicije f_1 in enačbe (22) dobimo:

$$D = f_1 q^2 . \quad (30)$$

Preglednica 3. Prilagoditveni parametri $j, a_1, f_1, s_1, f_2, s_2, y_o$ za prilagoditveno funkcijo (enačba (29)) za svežo 4 mM raztopino d(G₄C₂) v 100 mM KCl pri sipalnih kotih 60°, 90° in 120°.

	60°	90°	120°
j	$0,95 \pm 0,01$	$0,810 \pm 0,005$	$0,774 \pm 0,005$
a_1	$0,028 \pm 0,01$	$0,105 \pm 0,002$	$0,260 \pm 0,002$
f_1	37 ± 3	62 ± 2	89 ± 1
s_1	$1,2 \pm 0,2$	$1,04 \pm 0,04$	$0,99 \pm 0,02$
f_2	$0,067 \pm 0,002$	$0,169 \pm 0,002$	$0,228 \pm 0,003$
s_2	$0,884 \pm 0,008$	$0,917 \pm 0,007$	$0,857 \pm 0,009$
y_o	$-0,0026 \pm 0,0001$	$-0,035 \pm 0,002$	$-0,054 \pm 0,002$

Kvadrat velikosti sipalnega vektorja (q^2) lahko izračunamo po enačbi (26), relaksacijske frekvence pa dobimo iz prilagajanja odvisnosti podane z enačbo (29) izmerjenim avtokorelacijskim funkcijam. Iz teh vrednosti narišemo graf f_1 v odvisnosti od q^2 , in opazimo, da je odvisnost linearna. Naklon prilagojene linearne funkcije je enak difuzijskemu koeficientu (slika 9).



Slika 9. Relaksacijska frekvenca (f_1) v odvisnosti od kvadrata velikosti sipalnega vektorja (q^2) za svežo 4 mM raztopino d(G₄C₂) v 100 mM KCl. Rdeča črta predstavlja prilagojeno linearno funkcijo, katere strmina je enaka difuzijskemu koeficientu ($D = (1,25 \pm 0,02) \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$). Zeleni črti določata napako.

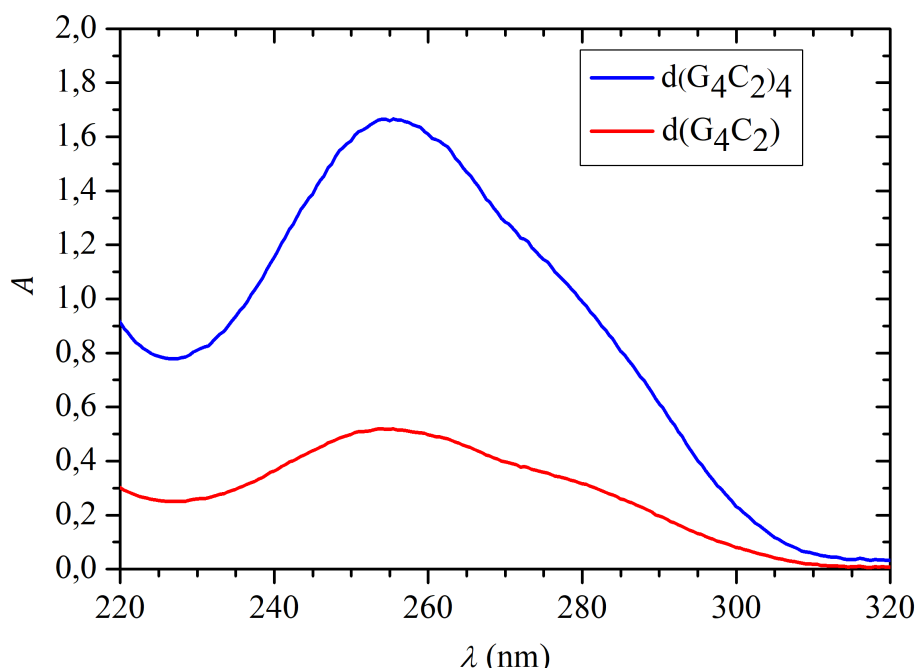
6.2 UV-Vis spektroskopija

Da bi se prepričali o ustreznosti pripravljenih in razredčenih raztopin, smo izvedli meritve z UV-Vis spektroskopijo. UV-Vis spektroskopija je eksperimentalna metoda, ki se uporablja za merjenje količine svetlobe, ki jo absorbira ali prepušča vzorec pri različnih valovnih dolžinah ultravijolične (UV) in vidne (Vis) svetlobe. Z analizo absorbance vzorca lahko izračunamo koncentracijo oligonukleotidov v raztopini. Kot rezultat meritve dobimo graf absorbance (A) v odvisnosti od valovne dolžine svetlobe (λ) (slika 10). UV-Vis spektroskopijo smo naredili za 0,1 mM raztopino obeh sekvenc, ker je to zadnja, najbolj razredčena raztopina in s tem pridobimo zgornjo mejo napake.

Koncentracijo DNK raztopin računamo pri valovni dolžini 260 nm, kjer ima absorpcijski spekter molekule DNK običajno lokalni maksimum. Pri dovolj nizkih absorbancah velja linearna zveza:

$$A(260 \text{ nm}) = c\epsilon l, \quad (31)$$

kjer je c molarne koncentracije raztopine, ϵ ekstinkcijski koeficient oligonukleotida in l dolžina optične poti.



Slika 10. Absorbanca (A) kot funkcija valovne dolžine (λ) za obe sekvenci, $d(G_4C_2)$ in $d(G_4C_2)_4$ pri 0,1 mM koncentraciji.

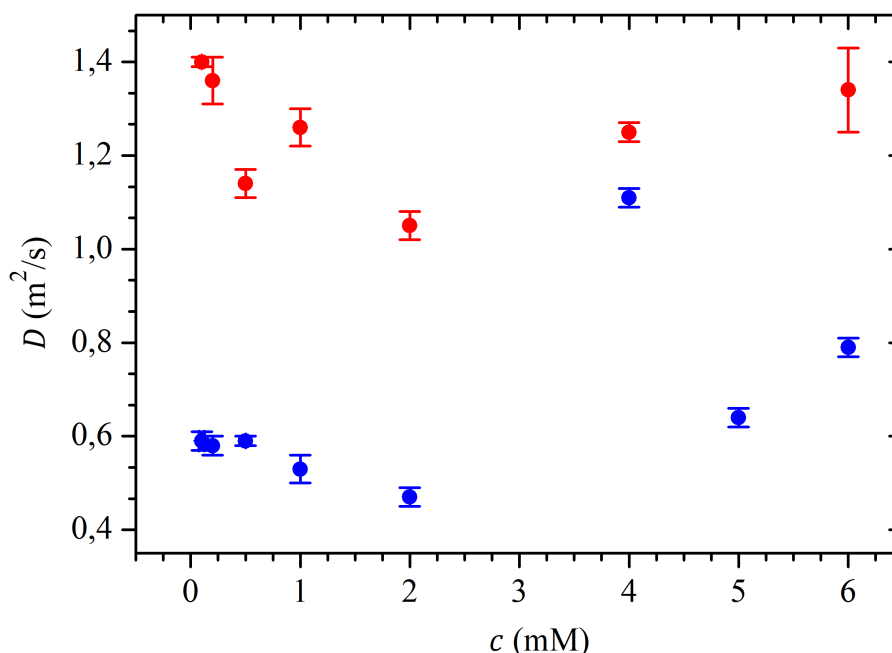
Vrednosti ekstinkcijskega koeficienta oligonukleotidov za obe sekvenci smo pridobili od proizvajalca (preglednica 1). Dolžina optične poti za kiveto je bila $l = 1$ mm. Za vsako od sekvenc smo izvedli več meritev in za vsako meritev smo pri 260 nm odčitali absorbanco. Pri sekvenci $d(G_4C_2)$ je bila $A(260 \text{ nm}) = 0,49$, pri sekvenci $d(G_4C_2)_4$ pa $A(260 \text{ nm}) = 1,59$. Iz enačbe (31) smo za vsako meritev izračunali molsko koncentracijo in uporabili povprečno vrednost. Določili smo, da je koncentracija za sekvenco $d(G_4C_2)$ $c = 0,090$ mM, za sekvenco $d(G_4C_2)_4$ pa $c = 0,073$ mM. Opazimo, da imamo odstopanja od pričakovane koncentracije manjša od 28 %.

7 Analiza rezultatov

Kot že večkrat omenjeno, smo se pri analizi meritev osredotočili na hitro difuzijo, ker predvidevamo, da najbolje opiše dinamiko kvadrupleksov v raztopini. Pri prilagajanju funkcije (enačba (29)) izmerjenim avtokorelacijskim funkcijam je zato bila najbolj pomembna relaksacijska frekvenca f_1 . Za vsak vzorec smo dobili relaksacijske frekvence za različne sipalne kote, iz katerih smo nato narisali graf in določili difuzijski koeficient. Z dobljenimi vrednostmi smo narisali graf difuzijskih koeficientov v odvisnosti od koncentracije DNK za obe zaporedji (slika 11).

S povečevanjem koncentracije od 0,1 mM do 2mM se difuzijski koeficient zmanjšuje, kar pomeni, da se dolžina agregatov povečuje. Ta pojav je bolj opazen pri sekvenci $d(G_4C_2)$, ki ima na splošno manjše agregate kot sekvenca $d(G_4C_2)_4$. Sekvenca $d(G_4C_2)_4$ ima pri manjših koncentracijah difuzijski koeficient enak v okviru merskih napak, kar pomeni, da je to najmanjša dolžina, ki jo lahko doseže. Obe sekvenci imata minimum med 2 mM in 4 mM, nato

pa difuzijski koeficient narašča, ko se koncentracija povečuje. V tem primeru se difuzijski koeficient povečuje zaradi povečanja polielektrolitskega vpliva, oziroma vpliva elektrostatičnih sil med delci. Pri sekvenci $d(G_4C_2)_4$ vrednost pri 4 mM izstopa, zato smo naredili dodatno 5 mM raztopino. Ker preučujemo biološke vzorce, ki imajo prehodne pojave in možne fluktuacije, lahko dobimo rezultate, ki odstopajo od pričakovanih okvirjev.

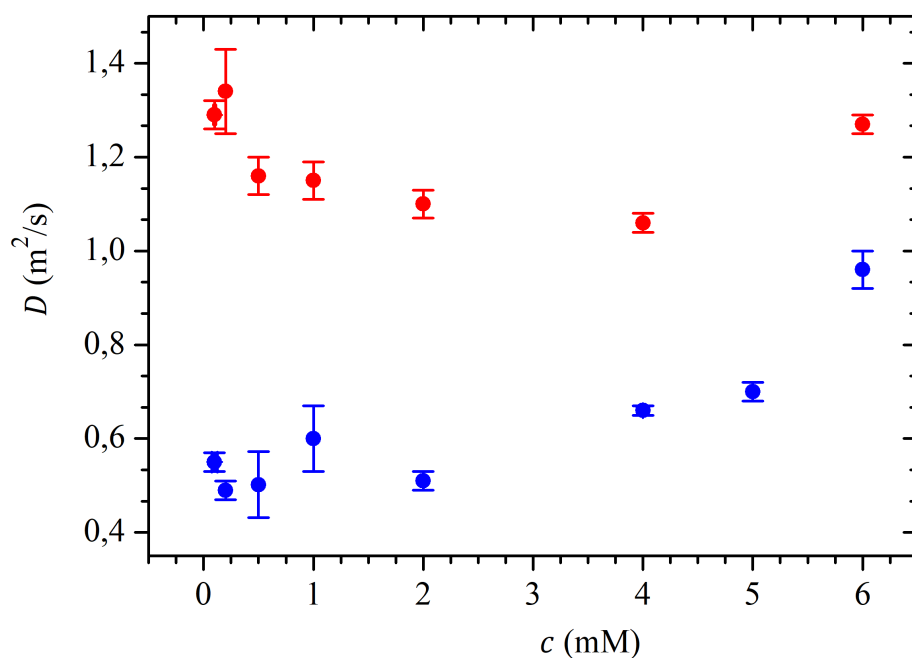


Slika 11. Difuzijski koeficient (D) v odvisnosti od koncentracije (c) za sveže raztopine, takoj po njihovi pripravi. Zaporedje $d(G_4C_2)$ je prikazano z rdečimi pikami, zaporedje $d(G_4C_2)_4$ pa z modrimi.

Po dveh tednih smo meritve ponovili, saj nas je zanimalo, ali bo enak trend viden tudi, ko se bodo vzorci stabilizirali. Enak trend, najprej zniževanje, nato pa zvišanje difuzijskega koeficienta, smo opazili tudi po dveh tednih (slika 12), pri čemer je bil trend za sekvenco $d(G_4C_2)$ bolj izrazit. Že pri najnižjih izmerjenih koncentracijah je $d(G_4C_2)_4$ namreč v območju, kjer so se izoblikovali agregati z maksimalno dolžino in ni možnosti, da bi se še naprej nalagali. Polielektrolitski učinek hitreje prevlada pri $d(G_4C_2)_4$, ker imamo večje agregate. Dinamika se pohitri, zato tudi imamo večjo relativno spremembo difuzijskega koeficienta kot pri sekvenci $d(G_4C_2)$.

Poleg vpliva polielektrolitov nas zanima tudi dolžina nastalih agregatov. Iz enačbe (7) lahko izračunamo hidrodinamski polmer ob predpostavki, da so kvadrupleksi okrogli. Predpostavimo pa, da kvadrupleksi tvorijo paličaste strukture. Zanima nas njihova dolžina, ki jo lahko izračunamo iz enačb (8) in (9). Pri izračunu dolžine upoštevamo, da je premer kvadrupleksa $d = 2,6$ nm [7], temperatura $T = 21$ °C in viskoznost vode pri tej temperaturi $\eta = 0,9775$ [11].

Dolžino agregatov smo izračunali za minimalne vrednosti difuzijskih koeficientov, pri 2 mM za sveže vzorce, ker so pri tej vrednosti agregati obeh sekvenc najdaljši. Dolžine in hidrodinamski polmeri so zapisani v preglednici 4. Teorija paličnih sipalcev, po kateri smo izračunali dolžino agregatov, velja v primeru $2 < p < 30$. Ta pogoj je izpolnjen za obe sekvenci.



Slika 12. Difuzijski koeficient (D) v odvisnosti od koncentracije (c) za dva tedna stare raztopine. Zaporedje $d(G_4C_2)$ je prikazano z rdečimi pikami, zaporedje $d(G_4C_2)_4$ pa z modrimi.

Dolžino agregatov lahko določimo tudi tako, da število G-tetrad pomnožimo z njihovo medsebojno razdaljo, ki znaša 0,34 nm. Iz podatkov, ki smo jih pridobili eksperimentalno, smo potrdili tezo (slika 1b), da se zaporedje $d(G_4C_2)$ nalaga tako, da se dva agregata nalagata en na drugega. Takšen agregat ima dolžino $L = 6,8$ nm. Dolžina zaporedja $d(G_4C_2)_4$ nakazuje, da je bilo 75 G-tetrad naloženih druga na drugo, kar ustreza približno 19 naloženim monomolekularnim kvadrupleksom s končno dolžino $L = 25,8$ nm.

Preglednica 4. Difuzijski koeficient (D), hidrodinamski polmer (r_h), izračunan po enačbi (7), in dolžina agregatov (L), izračunana po enačbi (8), za sekvenci $d(G_4C_2)$ in $d(G_4C_2)_4$.

	$d(G_4C_2)$	$d(G_4C_2)_4$
D (10^{-10} m²/s)	$1,05 \pm 0,03$	$0,47 \pm 0,02$
r_h (nm)	$2,10 \pm 0,06$	$4,7 \pm 0,2$
L (nm)	$6,7 \pm 0,2$	25 ± 4

8 Zaključek

V diplomskem seminarju smo preučili, kako se spreminja difuzijski koeficient za DNK sekvenci $d(G_4C_2)$ in $d(G_4C_2)_4$ glede na njuno koncentracijo. Uporabili smo metodo dinamičnega sipanja svetlobe, katere rezultat je avtokorelacijska krivulja. Iz avtokorelacijskih krivulj smo izračunali difuzijski koeficient za različne koncentracije obeh zaporedij. Iz difuzijskega koeficienta smo izračunali hidrodinamski polmer in dolžino nastalih agregatov. Z UV-Vis spektroskopijo smo preverili natančnost pri redčenju raztopin.

Ugotovili smo, da se difuzijski koeficient z naraščanjem koncentracije najprej zmanjšuje, ker se povečuje dolžina agregatov, nato pa narašča zaradi polielektrolitske narave G-kvadrupleksov. Takšne spremembe so vidne tudi po tem, ko so vzorci stari dva tedna. UV-Vis spektroskopija nam je pokazala, da smo bili pri pripravi raztopin relativno natančni kljub zaporednemu redčenju raztopin. Iz vrednosti difuzijskega koeficienta opazimo, da tvori zaporedje $d(G_4C_2)$ krajše agregate kot $d(G_4C_2)_4$.

V prihodnje bi bilo dobro eksperiment razširiti še na druge sekvence $d(G_4C_2)_n$, dodati več koncentracij in vse koncentracije preveriti z UV-Vis spektroskopijo. Za boljše razumevanje raztopin bi bilo smiselno uporabiti tudi druge eksperimentalne metode. Prav tako bi bilo vredno raziskati učinke počasnega dinamičnega načina in preučiti njegovo povezavo s spremembo koncentracij.

Viri in literatura

- [1] B. Alberts, urednik, *Molecular Biology of the Cell*, 4th ed (Garland Science, New York, 2002).
- [2] P. Šket, J. Pohleven, A. Kovanda, M. Štalekar, V. Župunski, M. Zalar, J. Plavec in B. Rogelj, *Characterization of DNA G-Quadruplex Species Forming from C9ORF72 G4C2-Expanded Repeats Associated with Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Lobar Degeneration*, *Neurobiol. Aging* **36**, 1091 (2015).
- [3] J. Brčić in J. Plavec, *ALS and FTD Linked GGGGCC-Repeat Containing DNA Oligonucleotide Folds into Two Distinct G-Quadruplexes*, *BBA General Subjects* **1861**, 1237 (2017).
- [4] B. Zhou, C. Liu, Y. Geng in G. Zhu, *Topology of a G-Quadruplex DNA Formed by C9orf72 Hexanucleotide Repeats Associated with ALS and FTD*, *Sci Rep* **5**, 16673 (2015).
- [5] H. Liu, L. Skibinska, J. Gapinski, A. Patkowski, E. W. Fischer in R. Pecora, *Effect of Electrostatic Interactions on the Structure and Dynamics of a Model Polyelectrolyte. I. Diffusion*, *J. Chem. Phys.* **109**, 7556 (1998).
- [6] A. Włodarczyk, P. Grzybowski, A. Patkowski in A. Dobek, *Effect of Ions on the Polymorphism, Effective Charge, and Stability of Human Telomeric DNA. Photon Correlation Spectroscopy and Circular Dichroism Studies*, *J. Chem. Phys. B* **109**, 3594 (2005).
- [7] M. M. Tirado, C. L. Martínez, in J. G. De La Torre, *Comparison of Theories for the Translational and Rotational Diffusion Coefficients of Rod-like Macromolecules. Application to Short DNA Fragments*, *J. Chem. Phys.* **81**, 2047 (1984).

- [8] J. Stetefeld, S. A. McKenna in T. R. Patel, *Dynamic Light Scattering: A Practical Guide and Applications in Biomedical Sciences*, Biophys Rev **8**, 409 (2016).
- [9] B. J. Berne in R. Pecora, *Dynamic Light Scattering: With Applications to Chemistry, Biology, and Physics*, Dover ed (Dover Publications, Mineola, N.Y, 2000).
- [10] E. Eiser, *Dynamic Light Scattering, v Multi Length-Scale Characterisation*, uredili D. W. Bruce, D. O'Hare in R. I. Walton, 1st ed. (Wiley, Hoboken, 2014), pp. 233–282.
- [11] J. Kestin, M. Sokolov in W. A. Wakeham, *Viscosity of Liquid Water in the Range $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ to $150\text{ }^{\circ}\text{C}$* , J. Phys. Chem. Ref. Data **7**, 941 (1978).