

Projekt NCN Nr 2011/01/B/ST4/01188

Oligonukleotydowe sondy fluorescencyjne na granicy faz monowarstwa lipidowa / roztwór wodny. Monitorowanie gradientu stężenia jonów potasu.

Czteroniciowe struktury DNA, znane jako kwadrupeksy guaninowe, mogą uczestniczyć w wielu procesach regulacji transkrypcji onkogenów i w specyficznej terapii antynowotworowej. Badania aplikacyjne czteroniciowych struktur DNA obejmują poszukiwania ligandów skutecznie stabilizujących kwadrupeksy do zastosowań w terapii antyrakowej, oraz konstrukcje nanomaszyn molekularnych oraz inteligentnych sond oligonukleotydowych do fluorescencyjnej detekcji jonów (K⁺) oraz białek w układach biologicznych. Bazując na skłonności niektórych oligonukleotydów do tworzenia struktur kwadrupeksowych w obecności jonów potasu, zaproponowano sondy fluorescencyjne na jony K⁺, które zbudowane są z oligonukleotydu znakowanego grupami fluorescencyjnymi. Głównym celem prezentowanego projektu jest próba wykorzystania techniki Langmuira z udziałem monowarstwy lipidowej do projektowania i optymalizacji fluorescencyjnych sond, bazujących na strukturze czteroniciowego DNA (kwadrupeks G-4), oraz opracowanie nowatorskiego sensora fluorescencyjnego do monitorowania stężenia jonów potasu przy powierzchni błony komórkowej. Opracowane dotychczas rozwiązania sensorowe dedykowane były pomiarom w roztworach, co nie odzwierciedla warunków komórkowych. Zbadanie zachowania się sondy w modelowym układzie naśladującym błonę komórkową, jakim jest membrana lipidowa na granicy faz woda/powietrze, jest konieczne, gdyż wyniki takie mogą rzucić światło na rzeczywistą przydatność sond oligonukleotydowych do detekcji gradientu jonów potasu w pobliżu lub na powierzchni membrany komórkowej.

Projekt obejmuje zaprojektowanie i syntezę sond według dwóch strategii: (i) sonda „adsorpcyjna” lokalizowana na powierzchni monowarstwy w wyniku oddziaływań elektrostatycznych i zbudowana z oligonukleotydu znakowanego fluoroforami, tworzącego strukturę kwadrupeksu w obecności jonów K⁺ oraz (ii) sonda „kotwicowa” lokalizowana na granicy faz dzięki oddziaływaniom hydrofobowym i zbudowana z dwóch elementów: sondy właściwej zawierającej dodatkową sekwencję (15 zasad) zdolną do hybrydyzacji z komplementarną nicią DNA elementu drugiego wyposażonego w „kotwicę” cholesterolową. Podstawą działania obu tych układów sensorowych jest selektywne kompleksowanie jonów potasu przez oligonukleotyd, czemu towarzyszy utworzenie struktury czteroniciowej (kwadrupeksy G4). Przyłączenie fluorofora do oligonukleotydu nie zmienia tych właściwości. Reorganizacja strukturalna oligonukleotydu skutkuje efektami spektralnymi, które zależą od natury grup fluorescencyjnych obecnych na końcach oligonukleotydu. W przypadku znakowania oligonukleotydu parą donor/akceptor, obserwuje się generowanie sygnału przeniesienia energii (FRET), natomiast emisja ekscymerowa powstaje dla sond znakowanych grupami pirenowymi. W zależności od użytej sekwencji oligodeoksynukleotydu, właściwości sondy (selektywność, czułość) mogą być zmieniane. W charakterze modelowych membran biologicznych zostaną przebadane monowarstwy utworzone z syntetycznego surfaktanta DODAB (dioktadecylodimetylo amoniowy bromek) z dodatnio naładowaną grupą czołową oraz z fosfolipidu DPPC (dipalmitoilofosfatydylocholina) reprezentatywnego dla składu błon komórkowych, posiadającego łańcuchy alkilowe C16 i obojnaczą grupę hydrofilową (zwitterion). Możliwe są też badania z udziałem monowarstw mieszanych dwuskładnikowych.

Pomiary izoterm π -A (ciśnienie powierzchniowe-powierzchnia) pozwolą na ocenę sposobu oddziaływania sond z monowarstwą lipidową. Procesy takie jak, asocjacja, adsorpcja i penetracja monowarstwy w obszarze hydrofilowych grup związku amfifilowego powinny mieć wpływ na kinetykę i równowagi tworzenia struktur kwadrupeksowych przez oligonukleotyd. Wstępne badania z udziałem nieznakowanych oligonukleotydów sugerują, że monowarstwa aktywnie modyfikuje zdolności oligonukleotydu do oddziaływania z jonami potasu i tworzenie struktur kwadrupeksowych. Drugim kanałem informacji o właściwościach i działaniu sond będzie monitorowanie sygnału fluorescencyjnego sondy oligonukleotydowej na granicy faz monowarstwa/ subfaza wodna, która pełni rolę modelu membrany komórkowej. Reasumując, badania realizowane w ramach projektu powinny odpowiedzieć na pytania dotyczące wpływu granicy faz (struktura i ładunek grup hydrofilowych monowarstwy) na procesy kompleksowania jonów potasu przez kwadrupeks (równowagi, kinetyka, morfologia kwadrupeksu), oraz wyjaśnić rolę granicy faz w kontrolowaniu procesów fotofizycznych fluoroforów (wydajność kwantowa, wygaszanie fluorescencji, zmiana położenia pasm emisji). Proponowany projekt badawczy doskonale wpisuje się w obszar priorytetowego kierunku badań w aspekcie materiałów oraz aparatury wspomagającej diagnostykę i terapię medyczną. Istotą proponowanych badań jest opracowanie nowatorskiej sondy fluorescencyjnej na jony K⁺ i nowych metodologii badania i charakterystyki oligonukleotydowych sond fluorescencyjnych o znaczeniu terapeutycznym i diagnostycznym. Podjęcie badań jest uzasadnione ze względu na fakt, że problematyka kwadrupeksów guaninowych jest jedną z prężniej rozwijających się dziedzin badawczych, niosąc ze sobą potencjalne zastosowania zarówno biomedyczne (nowe leki antynowotworowe hamujące aktywność telomerazy) jak i bioanalityczne (nowe strategie fluorescencyjnej detekcji i monitorowania jonów (K⁺) lub białek). Realizacja wnioskowanego projektu powinna dostarczyć nowych narzędzi badawczych, które w dalszej perspektywie powinny wzbogacić arsenał metod wykorzystywanych do badania procesów komórkowych np., związanych z funkcjonowaniem pomp sodowo-potasowych.

Proponowany projekt badawczy jest przedsięwzięciem całkowicie nowatorskim, zarówno w aspekcie badania kwadrupeksowego DNA techniką Langmuira, jak i w obszarze wykorzystania granicy faz monowarstwa/faza wodna do badań fotofizycznych sondy.