

Znakowane pirenem sondy molekularne zbudowane z dwóch zintegrowanych części: i-motywu oraz latarni molekularnej.

Informacje o procesach wewnątrzkomórkowych wywołanych lub wywołujących zmiany pH są ważne z punktu widzenia zrozumienia mechanizmów, które rządzą biologią komórek, jak również do celów biotechnologii i diagnostyki molekularnej. Jak wiadomo fizjologiczne pH jest bliskie neutralnemu, zaś zakwaszenie cytoplazmy może być wynikiem, na przykład, aktywności komórek rakowych. Możliwość kontrolowania aktywności proliferacyjnej komórki poprzez pomiar pH może być przydatna przy konstruowaniu leków antyrakowych. Stąd jest potrzeba konstrukcji jak i udoskonalania wysoce czułych oraz równocześnie mało-inwazyjnych narzędzi do pomiarów pH w przestrzeni wewnątrz- oraz zewnątrzkomórkowej. Od niedawna, sondy do pomiarów pH na bazie i-motywów DNA stanowią atrakcyjną alternatywę dla tradycyjnych barwników fluorescencyjnych, stosowanych do pomiarów pH.

I-motywy powstają na obszarach DNA zawierających ciągi cytozyny, które w wyniku częściowej protonizacji cytozyny są zdolne do tworzenia antyrównoległego dupleksu stabilizowanego przez wiązania wodorowe między cytozyną a cytozyną protonowaną. Z kolei dwa takie dwuniciowe fragmenty potrafią przenikać się nawzajem dając strukturę czteroniciową zwaną i-motywym. Trwałość struktury i-motywu zależy od sekwencji oligonukleotydu oraz wartości pH otoczenia, co przyczyniło się do wykorzystania tego typu struktur do konstrukcji nanomaszyn reagujących na zmiany pH otoczenia.

Celem przedstawionego projektu jest opracowanie i optymalizacja zestawu sond opartych na sekwencjach i-motywów, wrażliwych na zmiany pH otoczenia oraz zdefiniowanie zakresu działania tych systemów.

Proponujemy dwa rozwiązania bazujące na wykorzystaniu znakowanych pirenem molekularnych latarni zawierających w swej sekwencji fragment zdolny do formowania jednocząsteczkowego i-motywu. W pierwszym podejściu, zaprojektowana przez nas sonda będzie znakowana obustronnie ugrupowaniem pirenolowym. Drugą naszą propozycją jest układ znakowany jednym pirenem w pętli tetrapleksu lub na jednym z końców nici łańcucha oligonukleotydowego. Spodziewamy się, iż w obu zastosowanych podejściach utworzenie i-motywu wywołała efektywne oddziaływanie między fluoroforami (piren/piren lub piren/nukleozasada), czego wynikiem będzie pojawienie się emisji ekscymerowej lub ekscypleksowej wrażliwej na zmiany pH w przedziale 7,5-5,5 czyli w zakresie odpowiadającym zmianom wewnątrzkomórkowego pH oraz bardzo czulej na małe zmiany pH (0,1 jednostki pH).

Obydwa systemy są w założeniu prostymi, świecącymi układami, zdolnymi do generowania silnego sygnału analitycznego w odpowiedzi na obniżenie pH otoczenia, co czyni je potencjalnie doskonałymi narzędziami do śledzenia zmian pH mikrootoczenia. Planowany zakres badań obejmuje syntezę projektowanych układów oraz ich badania fizykochemiczne oraz spektroskopowe obejmujące między innymi: rejestrację widm CD, widm absorpcji UV-Vis i fluorescencji w różnym pH i przy różnej sile jonowej, jak również w szerokim zakresie temperatur od 10- 95o C. Takie szczegółowe badania pozwolą na poznanie kinetyki formowania się i dysocjacji poszczególnych i-motywów wbudowanych w pętlę latarni molekularnej.

Ponadto, ze względu na możliwe zastosowanie aplikacyjne proponowanych sond do badań pH in cellulo lub nawet in vivo, celem jest rozszerzenie projektu na analogi DNA wykazujące stabilność biochemiczną (tj. 2'OMeRNA). Zamierzamy poddać ocenie stabilność biochemiczną zaprojektowanych sond poprzez badanie ich podatności na degradację w roztworach z dodatkiem enzymów (np. endonukleazy, która rozcina dwuniciowe DNA) lub w lizacie komórkowym. Spodziewamy się, że modyfikowane sondy (tj. 2'OMeRNA) nie ulegną degradacji, w przeciwieństwie do fluorescencyjnych sensorów na bazie DNA.

Projektowane sondy w dalszej perspektywie przeznaczone będą do zastosowań bioanalitycznych i biomedycznych, stąd następnym krokiem badań jest sprawdzenie ich działania in cellulo. Badania aplikacyjne mogą być prowadzone z wykorzystaniem konfokalnego mikroskopu fluorescencyjnego, dając szansę na śledzenie zmiany pH w komórce zarówno w przestrzeni jak i w czasie (ang. spatial and temporal pH gradients).

Podsumowując, wierzymy, że zaproponowane przez nas sondy molekularne nie tylko okażą się doskonałymi narzędziami do śledzenia zmian pH wewnątrzkomórkowego, ale zostaną wykorzystane jako narzędzie do badania właściwości biofizycznych tego rodzaju struktur. Rezultaty takich studiów mogą przyczynić się do zrozumienia i wyjaśnienia biologicznej roli czteroniciowych form strukturalnych DNA.