

## Tetrapleksowe DNA – nowa platforma do projektowania narzędzi bioanalitycznych

Bernard JUSKOWIAK

Wydział Chemii, Uniwersytet im. A. Mickiewicza w Poznaniu

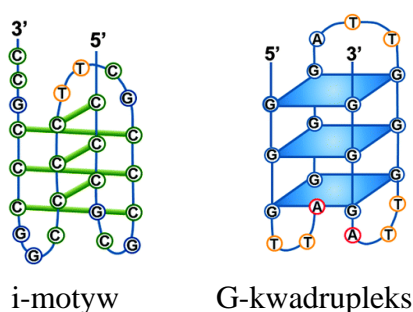
Powszechnie wiadomo, że kwasy nukleinowe pełnią kluczową rolę w funkcjonowaniu organizmów żywych oraz w przechowywaniu i przekazywaniu informacji genetycznej. Mniej natomiast znana jest ich zdolność do wiązania ligandów oraz fakt wykorzystywania oligonukleotydów w charakterze sond lub nanosensorów molekularnych. Można wyróżnić dwie kategorie sond oligonukleotydowych: (i) sondy hybrydazyjne, które bazują na komplementarności zasad azotowych oraz (ii) sondy aptamerowe bazujące, podobnie jak antyciała, na zjawisku selektywnego rozpoznawania analitu. Z punktu widzenia konstrukcyjnego budowa obu typów sond jest podobna. Oligonukleotyd (DNA lub RNA) o zaprogramowanej długości i sekwencji zasad jest modyfikowany poprzez przyłączenie grup reporterowych, których zadaniem jest transdukcja efektu chemicznego (hybrydacja, wiązanie analitu) w mierzalny sygnał analityczny. Fluorescencyjne grupy reporterowe są najczęściej wykorzystywane do modyfikacji oligonukleotydu z uwagi na czułość i wieloparametrowość sygnału fluorescencyjnego (zmiany natężenia fluorescencji, przesunięcie pasm emisji, anizotropia fluorescencji, czasy życia, wygaszanie fluorescencji, procesy transferu energii (FRET)).

Najczęściej stosowanym rozwiązaniem konstrukcyjnym sond jest tzw. latarnia molekularna oznaczana skrótem MB (ang. *Molecular Beacon*), posiadająca strukturę „spinki do włosów”. Oligonukleotyd jest znakowany na końcach 3' i 5' odpowiednio, fluoroforem (donor) i wygaszaczem (akceptor). W obecności analitu następuje hybrydacja i otwarcie struktury MB, czemu towarzyszy wzrost natężenia fluorescencji (brak wygaszania).

Sondy aptamerowe posiadają znakowaną pojedynczą nić DNA lub RNA (zwykle 20 – 80 nukleotydów), która wykazuje silne powinowactwo do określonego analitu (białko, polipeptyd, ligand organiczny, prosty jon). Znanych jest wiele wariantów projektowania i konstrukcji aptamerowych sond molekularnych. Spotykane strategie konstrukcyjne można podzielić na proste rozwiązania bazujące na bezpośrednim efekcie wywołanym obecnością analitu (wygaszanie, zmiana mikrootoczenia fluorofora) oraz na bardziej zaawansowane układy, wykorzystujące znaczne zmiany konformacyjne aptameru, czy też wręcz kompletną reorganizację sondy. Przykładem takich aptamerów są sekwencje, które w wyniku wiązania analitu tworzą czteroniciowe struktury zwane kwadrupleksami.

Unikalna struktura tetrapleksowego DNA oraz odpowiednie modyfikacje grupami reporterowymi umożliwiają generowanie różnorodnych form sygnału analitycznego.

Struktury tetrapleksowe są formowane przez oligonukleotydy bogate w cytozyny (i-motywy) lub w guaniny (G-kwadrupleksy). Na rysunku poniżej przedstawiono schematyczne struktury i-motywu i G-kwadrupleksu posiadające



Rys. 1. Schematyczna ilustracja czteroniciowych struktur typu i-motywu oraz G-kwadrupleksu.

Struktury typu i-motywu powstają w odpowiednio niskim pH (~5,5) umożliwiającym protonowanie cytozyny i tworzenie wiązań wodorowych C-C<sup>+</sup>. Zależność stabilności struktury i-motywu od pH została przez nas wykorzystana do opracowania fluorescencyjnych sensorów pH do aplikacji komórkowych [1-4].

W przypadku G-kwadrupleksów (GQ) istnieje więcej opcji projektowania i konstrukcji układów sensorowych. Po pierwsze, struktury GQ wykazują dużo form topologicznych zależnych od natury kationu stabilizującego strukturę. Wykorzystując stabilizujące właściwości jonu K<sup>+</sup>, opracowano szereg wariantów sond do monitorowania gradientu jonów potasu w warunkach komórkowych [5-9]. Powinowactwo niektórych GQ to wiązanie ligandów organicznych a w szczególności heminy, zostało wykorzystane do konstrukcji DNAzymów o aktywności peroksydazowej. Badano układy asocjacyjne GQ/hemina a także układy modyfikowane np., DNAzymy z modyfikacją w łańcuchu DNA oraz koniugaty z kowalencyjnie przyłączoną heminą lub kropką kwantową [10-14].

## Literatura

1. A. Dembska, B. Juskowiak, Pyrene functionalized molecular beacon with pH-sensitive i-motif in a loop, *Spectrochim. Acta p.A.*, 150 (2015) 928-933.
2. P. Bielecka, B. Juskowiak, Fluorescent Sensor for PH Monitoring Based on an i-Motif- Switching Aptamer Containing a Tricyclic Cytosine Analogue (tC), *Molecules*, 20 (2015) 18511-18525.
3. P. Bielecka, A. Dembska, B. Juskowiak, Monitoring of pH Using an i-Motif-Forming Sequence Containing a Fluorescent Cytosine Analogue, tC *Molecules* 2019, 24, 952.
4. Dembska, A., Switalska, A., Fedoruk-Wyszomirska, A., Juskowiak, B., Development of fluorescence oligonucleotide probes based on cytosine- and guanine-rich sequences, *Sci. Reports* 10 (2020) 11006.
5. S. Nagatoishi, T. Nojima, B. Juskowiak, S. Takenaka, Pyrene-labeled G-quadruplex oligonucleotide as a fluorescence probe for potassium ions detection in biological applications, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 44 (2005) 5067-5070.
6. S. Nagatoishi, T. Nojima, E. Galezowska, B. Juskowiak, S. Takenaka, G-quadruplex-based FRET probes with the thrombin-binding aptamer (TBA) sequence designed for the efficient fluorometric detection of potassium, *ChemBioChem*, 7 (2006) 1730-1737..
7. A. Dembska, B. Juskowiak, Effect of metal cations on the fluorescence lifetimes of pyrene-labeled G-quadruplex probes, *J. Photochem. Photobiol. A*, 212(2010) 36-42.
8. S. K. Ohtsuka, S. Sato, Y. Sato, K. Sota, S. Ohzawa, T. Matsuda, K. Takemoto, N. Takamune, B. Juskowiak, T. Nagaib and S. Takenaka, Fluorescence imaging of potassium ions in living cells using a fluorescent probe based on a thrombin binding aptamer-peptide conjugate, *Chem. Commun.*, 2012, 48, 4740-4742.
9. Switalska, A; Dembska, A; Fedoruk-Wyszomirska, A; Juskowiak, B, Cholesterol-Bearing Fluorescent G-Quadruplex Potassium Probes for Anchoring at the Langmuir Monolayer and Cell Membrane, *Sensors* 18(2018) 2201.
10. J. Kosman, Y-T. Wu, A. Gluszynska, B. Juskowiak, N-Methyl-4-hydrazino-7-nitrobenzofurazan: a fluorogenic substrate for peroxidase-like DNAzyme, and its potential application, *Anal. Bioanal. Chem.*, 406 (2014) 7049-7057.
11. Kosman J, Stanislawska A, Głuszyńska A, Juskowiak B; Conjugation of hemin to G-quadruplex forming oligonucleotide using click chemistry, *Int. J. Biol. Macromol*, 101 (2017) 799-804.
12. Kosman J, Jatschka J, Csaki A, Fritzsche Wg, Juskowiak B, Stranik O; A New Strategy for Silver Deposition on Au Nanoparticles with the Use of Peroxidase-Mimicking DNAzyme Monitored via a Localized Surface Plasmon Resonance Technique., *SENSORS-BASEL*, 17 (2017) 849.
13. Zukowski, K., Kosman, J., Juskowiak, B., Light-Induced Oxidase Activity of DNAzyme-Modified Quantum Dots, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020) 8190.
14. J. Kosman, B. Juskowiak, Thrombin-Binding Aptamer with Inversion of Polarity Sites (IPS): Effect on DNAzyme Activity and Anticoagulant Properties, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2021) 7902.