

Fluorescencyjne sondy oligonukleotydowe oparte na strukturze G-kwadrupleksu, ich charakterystyka i oddziaływanie z monowarstwą Langmuira

Tematyka rozprawy doktorskiej skupia się na opracowaniu i charakterystyce fluorescencyjnych sond do monitorowania jonów potasu, bazujących na strukturze G-kwadrupleksu (G4 DNA) z wykorzystaniem techniki Langmuira z udziałem monowarstwy lipidowej. Sekwencje kwasów nukleinowych bogate w guaninę (G) mogą tworzyć tetrady, w celu utworzenia czteroniciowych motywów strukturalnych znanych jako G-kwadrupleksy. Istotną ich cechą strukturalną jest obecność centralnego kanału, który w sposób selektywny kompleksuje wybrane kationy metali. Optymalną stabilność G4 zapewniają jony potasowe (efektywnie na poziomie stężeń fizjologicznych).

Zaprojektowano i scharakteryzowano spektroskopowo (spektrofotometria UV-vis, fluorescencja, dichroizm kołowy) oligonukleotydowe sondy fluorescencyjne, znakowane hydrofobowym ugrupowaniem (kotwica cholesterolowa) oraz znacznikami fluorescencyjnymi (FRET, py, Upy i AgNCs). Badania spektralne, potwierdziły, że tak zaprojektowane układy generują sygnał analityczny w obecności kationów metali alkalicznych i wykazują wyższą czułość w stosunku do jonów K^+ (w porównaniu z jonami Na^+). Kationy metalu powodują zmiany konformacyjne sondy (utworzenie kwadrupleksu) z jednoczesną rearanżacją przestrzenną znaczników fluorescencyjnych. Dla sond typu FRET dochodzi wtedy do transferu energii od wzbudzonego donora do cząsteczki akceptora lub do pojawienia się emisji ekscymerowej dla sond znakowanych pirenem. W przypadku koniugatów pirenulo-dezoksyurydyny (sondy typu Upy) badania wykazały, że wzbudzenie pirenu prowadzi początkowo do lokalnego stanu wzbudzonego (π, π^*), który szybko ulega wewnątrzcząsteczkowemu przeniesieniu elektronu (ET) tworząc układ $piren^{\bullet+}/dU^{\bullet-}$ z rozdzieleniem ładunków (ang. *charge-separated*, CS). Z kolei, nanoklastery srebra (AgNCs) generowane na matrycy jednoniciowego oligonukleotydu bogatego w zasady cytozynowe, stanowią jeden z najbardziej obiecujących znaczników fluorescencyjnych dzięki wysokiej wydajności fotoemisji i doskonałej fotostabilności.

Rejestracja izoterm π -A dla monowarstwy bromku dioktadecylodimetyloamoniowego (DODAB) w obecności sond oraz widm fluorescencyjnych kompleksów sonda/DODAB na granicy faz woda/powietrze techniką światłowodową, pozwoliły uzyskać wgląd w procesy interakcji sonda-monowarstwy i oszacować oddziaływanie sondy z kationami metali. Z powodzeniem udało się zaobserwować kotwiczenie sond modyfikowanych cząsteczką cholesterolu w monowarstwie Langmuira i uzyskać sygnał fluorescencyjny na jej powierzchni.

Końcowym etapem badań było monitorowanie jonów K^+ przy powierzchni błony biologicznej (komórki HeLa) w oparciu o najbardziej obiecujące układy sonda/DODAB (Ch(F-TBA-T), Ch(py-TBA-py)). Z sukcesem udało się zaobserwować, że badane sondy mają potencjał jako biosensory do detekcji jonów K^+ .

Badania zawarte w niniejszej rozprawie doktorskiej są przedsięwzięciem całkowicie nowatorskim, zarówno w aspekcie badania kwadrupeksowego DNA techniką Langmuira, jak i w obszarze prowadzenia badań fotofizycznych sond na granicy faz monowarstwa/faza wodna.