

AUTOREFERAT

Dr Anna Dembska

Fluorescencyjne sondy oligonukleotydowe bazujące na czteroniciowych formach DNA



**UNIwersYTET
IM. ADAMA MICKIEWICZA
W POZNANIU**

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Wydział Chemii

Poznań, marzec 2018

I. Dane personalne

1. Imiona i nazwisko

Anna Renata Dembska

2. Nazwisko rodowe

Masternak

3. Aktualne zatrudnienie

Pracownia Chemii Bioanalitycznej, Wydział Chemii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza (UAM), ul. Umultowska 89b, 61-614 Poznań

Stanowisko: adiunkt

Telefon służbowy: + 48 61 829 1771

E-mail: aniojka@amu.edu.pl

II. Wykształcenie i stopnie naukowe

2005 r. Doktor nauk chemicznych, tytuł pracy doktorskiej: „Synteza, fotochemia i właściwości fluorescencyjne pochodnych purynowych zawierających w cząsteczce ugrupowanie pirydyniowe.”

Promotor: prof. UAM dr hab. Bohdan Skalski

1999-2005 Studia doktoranckie, Wydział Chemii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza (UAM) w Poznaniu,

1999 r. Magister chemii, tytuł pracy magisterskiej: „Synteza 5'-trifosforanów niektórych fluoroforów nukleozydowych jako układów do fluorescencyjnego znakowania DNA metodą enzymatyczną.”

Promotor: prof. UAM dr hab. Bohdan Skalski

1994-1999 Studia magisterskie, Wydział Chemii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza (UAM) w Poznaniu,

III. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

01.10.2006 - adiunkt w Pracowni Chemii Bioanalitycznej, Wydziału Chemii UAM w Poznaniu

01.02.10 - 31.08.11 - staż podoktorski, Department of Chemistry, Mellon Institute, Carnegie Mellon University, Pittsburgh, USA

01.10.07 - 31.01.08 - staż podoktorski, Nuclear Physics Institute, Lund University, Szwecja

01.10.05 - 30.09.06 - adiunkt w Zakładzie Fizyki Chemicznej, Wydziału Chemii UAM w Poznaniu

IV. Wskazanie osiągnięcia naukowego stanowiącego podstawę postępowania habilitacyjnego:

Osiągnięcie naukowe wynikające z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki stanowi cykl 9 powiązanych tematycznie publikacji dotyczących projektowania, charakterystyki i zbadania potencjału analitycznego fluorescencyjnych sond oligonukleotydowych zawierających czteroniciowe struktury DNA (tetrapleksy). Cykl zawiera 7 oryginalnych prac badawczych [H1-H5, H7, H8] oraz 2 artykuły przeglądowe [H6 i H9], które były opublikowane w latach 2010-2017. Łączna wartość współczynnika oddziaływania IF prac składających się na osiągnięcie wynosi 24,0. Łączna liczba punktów MNiSW₂₀₁₆ prac składających się na osiągnięcie wynosi 245.

a) Tytuł osiągnięcia naukowego stanowiącego podstawę postępowania habilitacyjnego:

Fluorescencyjne sondy oligonukleotydowe bazujące na czteroniciowych formach DNA.

b) Wykaz artykułów naukowych stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego:

H1.Dembska, A.; Juskowiak*, B. "The Fluorescence Properties and Lifetime Study of G-quadruplexes Single- and Double-labeled with Pyrene" Journal of Fluorescence 2010, 20(50), 1029-1035.

IF(2010)=1,966

MNiSW₂₀₁₆=20

Udział własny: 80%; koncepcja pracy, zaplanowanie badań przedstawionych w niniejszej publikacji, wykonanie pomiarów widm stacjonarnych fluorescencji oraz rejestracji krzywych zaniku fluorescencji, przeprowadzenie analizy uzyskanych wyników, w tym samodzielne obliczenie średnich czasów życia, napisanie pierwszej wersji manuskryptu.

H2.Dembska, A.; Juskowiak*, B. "Effect of metal cations on the fluorescence lifetimes of pyrene labeled G-quadruplex probes" Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry 2010, 212(1) 36–42.

IF(2010)=2,243

MNiSW₂₀₁₆=25

Udział własny: 80%; koncepcja pracy, zaplanowanie badań przedstawionych w niniejszej publikacji, wykonanie pomiarów widm stacjonarnych oraz rejestracji krzywych zaniku fluorescencji, przeprowadzenie analizy uzyskanych wyników – w tym samodzielne obliczenie średnich czasów życia, udział w dyskusji wyników, współudział w przygotowaniu manuskryptu.

H3.Dembska*, A.; Rzepecka, P., Juskowiak, B. „Spectroscopic Characterization of i-motif Forming c-myc Derived Sequences Double-Labeled with Pyrene” *Journal of Fluorescence* 2013, 23 (4), 807-812.

IF(2013)=1,667

MNiSW₂₀₁₆=20

Udział własny: 60%; koncepcja pracy, zaplanowanie i nadzorowanie badań przedstawionych w niniejszej publikacji, pomiar widm CD, UV oraz fluorescencji, rejestracja spektrofotometryczna profili topnienia, przeprowadzenie analizy i interpretacji uzyskanych wyników, napisanie manuskryptu, prowadzenie korespondencji z edytorem i redagowanie odpowiedzi na sugestie i uwagi recenzentów.

H4.Dembska*, A.; Rzepecka, P., Juskowiak, B. “Steady-State Fluorescence and Lifetime Emission Study of pH-Sensitive Probes Based on i-motif Forming Oligonucleotides Single and Double Labeled with Pyrene” *Chemosensors*, 2015, 3(3), 211-223;

IF brak danych

Udział własny: 75%; koncepcja pracy, zaplanowanie i nadzorowanie badań przedstawionych w niniejszej publikacji, wykonanie syntezy i oczyszczanie wybranych sond, pomiar widm CD, UV oraz fluorescencji, wykonanie wszystkich pomiarów krzywych zaniku fluorescencji wraz z opracowaniem wyników przy użyciu programu FluoroFit, przeprowadzenie analizy i interpretacji uzyskanych wyników, napisanie manuskryptu, prowadzenie korespondencji z edytorem i redagowanie odpowiedzi na sugestie i uwagi recenzentów.

H5.Dembska*, A.; Juskowiak, B. „Pyrene functionalized molecular beacon with pH-sensitive i-motif in a loop” – *Spectrochimica Acta Part A – Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2015, 150, 928–933.

IF(2015)=2,653

MNiSW₂₀₁₆=30

Udział własny: 90%; koncepcja pracy, zaplanowanie badań, wykonanie wszystkich pomiarów spektroskopowych, przeprowadzenie analizy i interpretacji uzyskanych wyników, napisanie manuskryptu, prowadzenie korespondencji z edytorem i redagowanie odpowiedzi na sugestie i uwagi recenzentów.

H6.Dembska*, A. “The analytical and biomedical potential of cytosine-rich oligonucleotides: A review” - *Anal. Chim. Acta*, 2016, 930, 1-12.

IF(2016)= 4,95

MNiSW₂₀₁₆=45

Udział własny: 100%; zaplanowanie koncepcji pracy przeglądowej, wybór literatury, przygotowanie rysunków, napisanie manuskryptu (w tym przygotowanie wszystkich rysunków oraz zdjęć), prowadzenie korespondencji z edytorem i redagowanie odpowiedzi na sugestie i uwagi recenzentów.

H7.Dembska*, A.; Kierzek, E.; Juskowiak, B. “Studying the influence of stem composition in pH-sensitive molecular beacons onto their sensing properties of pH-sensitive molecular beacons” – *Anal. Chim. Acta*, 2017, 990, 157-167

IF(2017)= 4,95

MNiSW₂₀₁₆=45

Udział własny: 90 %; koncepcja pracy, zaplanowanie badań przedstawionych w niniejszej publikacji, wykonanie wszystkich pomiarów spektroskopowych, przeprowadzenie analizy i interpretacji uzyskanych wyników, napisanie manuskryptu

(przygotowanie wszystkich rysunków oraz zdjęć), prowadzenie korespondencji z edytorem i redagowanie odpowiedzi na sugestie i uwagi recenzentów.

H8.Switalska, A.; Dembska, A.; Kierzek, R.; Juskowiak*, B. "Spectroscopic study of fluorescent probes based on G-quadruplex oligonucleotide labeled with ethynylpyrenyluridine" International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 105(1), 862-872;

IF(2016)= 3,671,

MNiSW₂₀₁₆=35

Udział własny: 30%; oczyszczenie otrzymanych związków przy pomocy HPLC, udział w interpretacji i dyskusji wyników.

H9.Dembska*, A.; Bielecka, P., Juskowiak, B. „, pH-Sensing fluorescence oligonucleotide probes based on an i-motif scaffold: A review.” Analytical Methods, 2017,

IF(2016)= 1,9

MNiSW₂₀₁₆=25

Udział własny: 70%; zaplanowanie koncepcji pracy przeglądowej, wybór literatury, opracowanie większości rozdziałów (1,3, 5-8), przygotowanie Tabeli 1 oraz Rysunku 7, edycja manuskryptu, prowadzenie korespondencji z edytorem i redagowanie odpowiedzi na sugestie i uwagi recenzentów.

*autor korespondencyjny

Średni udział własny: ~75%

Średni IF: ~2,7

Oświadczenia współautorów publikacji określające indywidualny wkład każdego autora w powstanie poszczególnych publikacji zamieszczono w załączniku nr 4.

W pracach zawarto wyniki uzyskane podczas realizacji następujących projektów badawczych finansowanych przez NCN: NN 204220040, 2015/17/B/ST4/03627, 2014/15/N/ST4/03032 i 2015/19/N/ST4/00407.

c) omówienie celu naukowego w/w prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Wprowadzenie: Niewątpliwie DNA jest obecnie jedną z najczęściej wykorzystywanych molekuł w nanotechnologii i bioanalizie. Status ten zawdzięcza z jednej strony rozwojowi biotechnologii i technik analitycznych oraz biologii molekularnej, ale też kolejnym odkryciom dotyczącym różnorodności form występowania kwasów nukleinowych. Odkryto także powinowactwo oligonukleotydów do wiązania ściśle określonych biomolekuł lub cząsteczek nieorganicznych, w tym biometali oraz zdolności katalityczne niektórych sekwencji (mówimy wtedy odpowiednio o aptamerach oraz DNAzymach). Ze względu na

swoje właściwości, kwasy nukleinowe wykorzystuje się w części receptorowej biosensorów, w których sygnał analityczny wywołany przyłączeniem odpowiedniego bioanalitu może być uzyskany z zastosowaniem różnych metod, takich jak elektrochemiczne, optyczne, termiczne, spektroskopowe. Wyróżnić tutaj można metody fluorescencyjne wykorzystujące oligonukleotydy sprzężone z fluoroforem (fluoroforami) do celów sensorowych. Początkowo, w oparciu o takie układy skonstruowano wiele prostych sond hybrydacyjnych, jak i tzw. latarni molekularnych (ang. *molecular beacon*). Istotną podstawą działania tych sond była zdolność tworzenia podwójnej helisy przez komplementarne nici oligonukleotydowe, czemu towarzyszyła zmiana sygnału fluorescencyjnego. Źródłem takiej zmiany mógł być proces przeniesienia energii pomiędzy akceptorem a donorem umieszczonymi na przeciwległych końcach nici sondy (tzw. metoda FRET ang. *Fluorescence Resonance Energy Transfer*). W celu generowania sygnału analitycznego, stosuje się też strategie z wykorzystaniem pochodnych pirenu, które w bliskiej odległości i odpowiedniej aranżacji przestrzennej względem siebie tworzą ekscymery, charakteryzujące się długofalową emisją w porównaniu z emisją monomeru. Inne rozwiązania obejmują zastosowanie fluoroforów, które zmieniają swoje właściwości fluorescencyjne, gdy są w bliskim otoczeniu pewnych nukleozasad. Na przykład, emisja większości fluoroforów może być skutecznie wygaszana przez guaniny w wyniku fotoindukowanego przeniesienia elektronu. W ostatnich latach został poczyniony ogromny postęp dotyczący opracowania nowych nanomateriałów fluorescencyjnych (np. kropki kwantowe (QDs), nanoklastery srebra (AgNCs), które stanowią alternatywę dla organicznych fluoroforów, ze względu na wysoką wydajność kwantową, fotostabilność, możliwość manipulacji szerokością widma emisji czy też duże przesunięcia Stokesa.

Wspomniane już odkrycie możliwości przyjmowania przez niektóre sekwencje DNA w odpowiednich warunkach, struktur trój- oraz czteroniciowych, przyczyniło się do rozwoju badań nad bardziej wyrafinowanymi biosensorami oraz nanomaszynami. Przedstawiony do oceny cyklu publikacji obejmuje artykuły naukowe, których tematykę zaliczyć można do nurtu badań skoncentrowanych na tworzeniu inteligentnych narzędzi bioanalitycznych, bazujących na elementach strukturalnych kwasów nukleinowych, w szczególności takich sekwencji DNA, które są zdolne do formowania w odpowiednich warunkach struktur czteroniciowych (tetrapleksów) - G-kwadrupleksów oraz i-motywów.

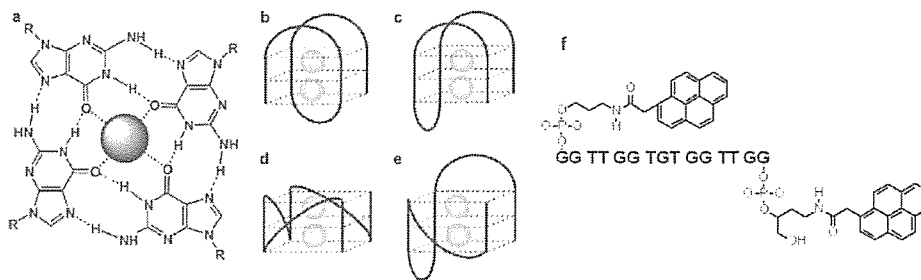
Głównym celem niniejszej osiągnięcia naukowego była weryfikacja hipotezy o przydatności oligonukleotydów tworzących formy G-kwadrupleksów oraz i-motywów

do zastosowań sensorowych jako sondy generujące sygnał fluorescencyjny w odpowiedzi na zmiany warunków środowiskowych (obecność jonów biometali lub zmiany pH).

Zakres badań stanowiących podstawę rozprawy habilitacyjnej, obejmuje zaprojektowanie sensorów, syntezę wybranych układów, ich badania fizykochemiczne i spektralne oraz badania aplikacyjne. Najważniejsze uzyskane wyniki omówiono poniżej, w podziale na 3 sekcje: A) dotyczącą sond o strukturze G-kwadrupleksów; B) dotyczącą sond o strukturze i-motywów oraz C) dotyczącą latarni molekularnych z i-motywem w pętli.

A) Sondy oligonukleotydowe na bazie G-kwadrupleksów [H1, H2, H8]

G-kwadrupleksy to czteroniciowe struktury DNA stabilizowane przez wiązania Hoogsteen'a, utworzone przez kwartet guaninowy. Drugą istotną cechą kwadrupleksu jest obecność centralnego kanału, który może kompleksować wybrane kationy metali (Rys. 1a). G-kwadrupleksy powstają albo przez asocjacje dwóch lub czterech oddzielnych nici DNA (G-tetrapleks intermolekularny) albo poprzez złożenie się pojedynczej nici bogatej w reszty guaninowe (G-tetrapleks intramolekularny) [1]. Ważny jest także fakt, iż preferowana topologia kwadrupleksu (Rys. 1b-e) zależy nie tylko od liczby zasocjowanych nici, składu sekwencji, ale także od rodzaju skompleksowanego kationu [2]. Kationy metalu stabilizują strukturę kwadrupleksu przez koordynacje guaninowych atomów tlenu przy węglach C-6 w kwartecie (Rys. 1a) [3]. Wykazano, iż największe powinowactwo do G4 DNA wykazują jony potasu. Jony różnych metali są w stanie wywoływać zmiany konformacyjne (przejście jednej formy w drugą), które w zależności od rodzaju kwadrupleksu, mogą być znaczące, jak to ma miejsce w przypadku oligonukleotydu o sekwencji ludzkiego telomerowego DNA d[AGGG(TTAGGG)₃] [4-5]. Wiele G-kwadrupleksów jest rozpoznawanych przez specyficzne białka lub ligandy, z którymi tworzy trwałe kompleksy. G-kwadrupleksy zostały uznane za potencjalny cel terapeutyczny dla chorób nowotworowych, ponieważ mogą hamować aktywność telomerazy, a niektóre leki wchodzące w interakcje z G-kwadrupleksami mogą indukować starzenie się i apoptozę komórek rakowych [6]. Ponadto, ze względu na preferencje jonów potasowych wobec innych kationów, szczególnie jonów sodowych, G-kwadrupleksy są idealną bazą do otrzymania czułych i selektywnych sond do detekcji jonów potasowych w układach biologicznych (wewnątrzkomórkowe stężenie K⁺ ~150 mM, Na⁺ ~15 mM) [7].



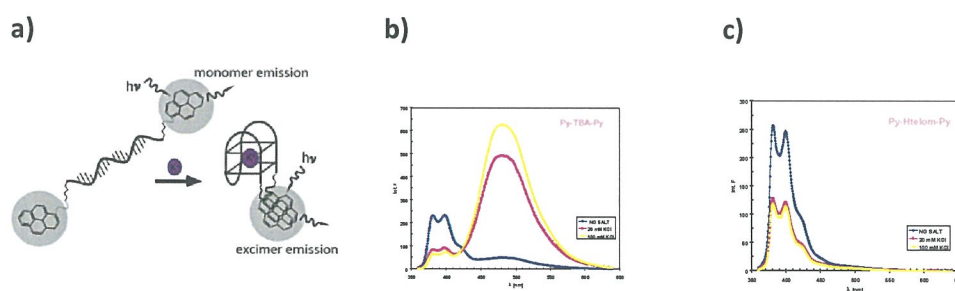
Rys. 1. Struktura G-kwartetu (a) wraz z topologią wewnętrznych kwadrupleksów – forma koszykowa (b), krzesłkowa (c), śmigłowa (d), hybrydowa (e) oraz sonda Py-TBA-Py (f) [10].

Jedną z lepiej poznanych sekwencji kwadrupleksowych jest aptamer antytrombinowy (TBA) o sekwencji GGTTGGTGTGGTTGG [8], który z uwagi na właściwości wykorzystuje się bądź to do konstrukcji sond do detekcji białka – trombiny bądź do detekcji jonów potasu. W obecności jonów potasu sekwencja TBA przyjmuje tylko formę krzesłkową (Rys. 1c) [9]. Fakt ten został wykorzystany przez Takenakę *i współpracowników* do skonstruowania, na bazie tego aptameru, sondy obustronnie znakowanej pirenem do oznaczania jonów potasu w układach biologicznych (Rys. 1f) [10]. Taki układ w nieobecności jonów potasu emituje fluorescencję krótkofalową pirenu (380-400 nm). Po dodaniu KCl sensor składa się w G-kwadrupleks, w którym cząsteczki pirenu na końcach 3' i 5' są w orientacji face-to-face, a ich wzajemne oddziaływanie powoduje powstawanie długofalowej fluorescencji ekscymerowej (> 450 nm) [10]. Takiego efektu nie obserwuje się w przypadku, gdy do konstrukcji sensora do wykrywania jonów K^+ użyje się G-kwadrupleksu na bazie sekwencji ludzkiego telomerowego DNA (Htelom), d[GGG(TTAGGG)₃] posiadającego piren dołączony do obu końców nici [11]. Zaobserwowano, że obustronnie znakowana pirenem sonda Htelom emituje jedynie fluorescencję monomerową pirenu. Takie rezultaty przypisano wysoce polimorficznej naturze G-kwadrupleksów na bazie sekwencji Htelom. Odkryto bowiem, że sekwencja Htelom, w przeciwieństwie do oligonukleotydu TBA, współistnieje w kilku formach topologicznych w obecności jonów potasowych (Rys. 1c-e): krzesłkowej, śmigłowej lub hybrydowej [12-13].

Problem wzajemnej konwersji poszczególnych struktur ludzkiego telomerowego DNA d[AGGG(TTAGGG)₃] w roztworach zawierających K^+ jest nadal przedmiotem badań, zwłaszcza, że różnorodne topologie przyjmowane przez kwadrupleksy mają duży wpływ na ich właściwości spektroskopowe i co za tym idzie na potencjalne zastosowanie bioanalityczne czy też biomedyczne.

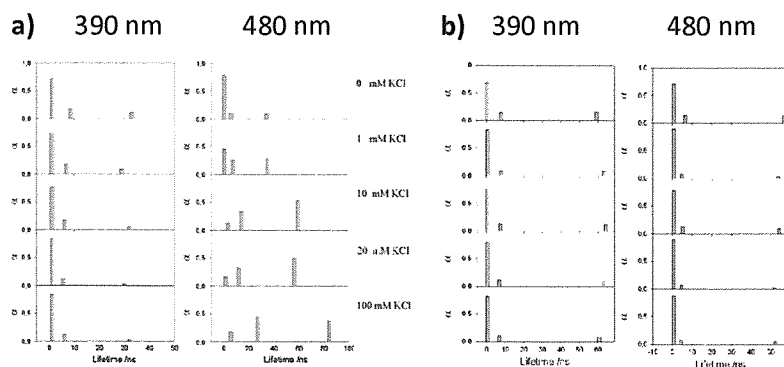
Powyższe doniesienia skłoniły mnie do zgłębienia właściwości fluorescencyjnych sond TBA i Htelom znakowanych obustronnie pirenem z wykorzystaniem techniki fluorescencji czasowo-rozdzielczej, która według mojej ówczesnej wiedzy nie była dotąd wykorzystywana do badań nad kwadrupleksami [H1, H2].

Zgodnie z dotychczasowymi badaniami, sonda na bazie sekwencji d[GGTTGGTGTGGTTG], Py-TBA-Py emituje bardzo intensywną fluorescencję ekscymerową w obecności jonów K^+ (Rys. 2b). Natomiast w widmie fluorescencji sondy o sekwencji d[GGG(TTAGGG)₃], Py-Htelom-Py widoczne jest tylko pasmo emisji monomeru pirenu bez względu na rodzaj stosowanego jonu (Rys. 2c).



Rys. 2. Zasada działania sondy Py-TBA-Py (a) [10] wraz z widmami emisji Py-TBA-Py (b) oraz Py-Htelom-Py (c) [H1].

Wykonano pomiar zaniku fluorescencji badanych układów dla dwóch fal emisji 390 nm (maksimum fluorescencji monomerowej) oraz 480 nm (maksimum fluorescencji ekscymerowej) w temperaturze pokojowej w obecności jonów różnych metali (K^+ , Na^+ , Sr^{2+}). Krzywe zaniku fluorescencji w układach biologicznych są często trudne do interpretacji ze względu na takie czynniki jak dynamika układu w ps-ns skali, wielorakość stanów konformacyjnych, relaksację układu czy oddziaływania z heterogenicznym otoczeniem. Dlatego też analizując krzywe zaniku tetrapleksów obustronnie znakowanych pirenem przyjęłam multieksponecjalny model mimo, iż system zawierał tylko jeden rodzaj fluorescencyjnego znacznika (tu: piren). Ponadto w takich układach najrozsądniejsza wydaje się analiza dystrybucji otrzymanych czasów, w szczególności zaś obliczenie średniego czasu życia z ważonych amplitud poszczególnych składowych [14].



Rys. 3. Dystrybucja czasów życia wyznaczonych z profili zaniku fluorescencji przy 390 nm oraz 480 nm dla Py-TBA-Py (a) oraz Py-Htelom-Py (b) [H1][H2].

Obserwowana dystrybucja czasów życia obustronnie znakowanych pirenami sond wynika z interakcji piren-piren oraz piren-nukleozasada, na które dodatkowo wpływa struktura przestrzenna poszczególnych kwadrupleksów (Rys. 3). Topologia kwadrupleksu, która umożliwia efektywne oddziaływanie znaczników pirenowych, a tym samym generowanie emisji ekscymerowej o długim czasie życia, to struktura typu krzeselkowego utworzona przez sondę Py-TBA-Py (Rys. 1c). Następnie, struktury kwadrupleksów Py-Htelom-Py tj. hybrydowa (Rys. 1e, dominuje w obecności jonów K^+) i śmigłowa (Rys. 1d, dominująca w obecności jonów Sr^{2+}) ułatwiają dezaktywację wzbudzonego stanu pirenenu, ze względu na interakcję między pirenem a tetradami guaniny (wygaszanie statyczne lub w wyniku fotoindukowanego przeniesienia elektronu). Natomiast kwadrupleks Htelom o topologii koszykowej posiada diagonalną pętlę TTA (Rys. 1b), która zaburza nie tylko oddziaływania piren-piren, ale także oddziaływania warstwowe pirenenu z G-tetradą, co prowadzi do zaobserwowanego przeze mnie wydłużenia czasu życia monomeru pirenenu w obecności jonów Na^+ w porównaniu z badaniami w obecności jonów K^+ lub Sr^{2+} .

Co istotne, stwierdziłam, iż tylko w przypadku układu Py-TBA-Py istnieje prostoliniowa zależność między średnim czasem życia a zawartością jonów K^+ w badanym roztworze [H1]. Im więcej jonów K^+ w otoczeniu sondy Py-TBA-Py, tym więcej pojawia się długożyjącego ekscymeru. Ponadto, porównując średni czas życia $\langle t \rangle$ Py-TBA-Py wyznaczony przy 390 nm z tym wyznaczonym przy 480 nm w roztworze zawierającym 100 mM KCl, obserwujemy 15-krotne wydłużenie tego czasu.

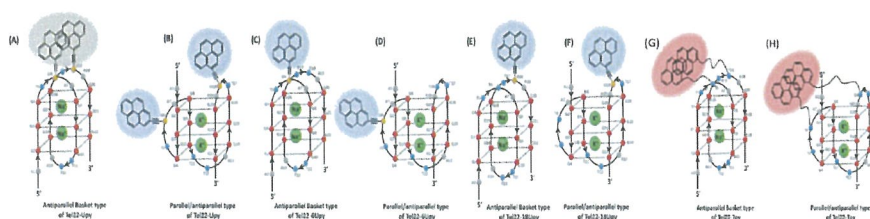
Powyższe badania zostały uzupełnione analizą właściwości fluorescencyjnych sond TBA oraz Htelom jednostronnie znakowanych pirenem. Wykazaliśmy, iż fluorescencja sond TBA oraz Htelom posiadających piren przyłączony do końca 3' jest również stopniowo wygaszana przez jony potasu. Wyniki te wskazują, że nawet sondy pojedynczo znakowane pirenem są potencjalnie użyteczne w zastosowaniach bioanalitycznych.

Podsumowując, pokazaliśmy ilościowo jak jony metali wpływają na czas życia obustronnie znakowanych pirenami kwadrupleksów o sekwencji TBA oraz Htelom i powiązaliśmy to ze strukturą tych sond. Uzyskane wyniki potwierdziły zatem, że różnice we właściwościach fluorescencyjnych sond Htelom i TBA obustronnie znakowanych pirenami są połączone z przestrzenną strukturą tych koniugatów.

Niedawno wykazano, że na topologię G-kwadrupleksów można wpłynąć np. zmieniając orientację nici [15].

Wobec tego postanowiliśmy zbadać, czy konwersję G-kwadrupleksu do oczekiwanej topologii można wywołać poprzez racjonalne umiejscowienie pochodnych pirenowych w łańcuchu oligonukleotydowym [H8].

W tym celu zaprojektowaliśmy i zsyntetyzowaliśmy sondy oparte o sekwencję fragmentu ludzkiego telomerowego DNA d[AG₃(TTAG₃)₃], które są znakowane podwójnie cząsteczką 5-(1-etynylopirenylo)-2'-deoksyurydyny (U_{py}) w pozycji 6 i 18 (Tel22-U_{py}) oraz pojedynczo (Tel22-6U_{py} i Tel22-18U_{py}). Dodatkowym systemem referencyjnym był oligonukleotyd d[AG₃(TTAG₃)₃], znakowany w pozycji 6 oraz 8 tyminą połączoną ze znacznikiem pirenowym poprzez długi (zawierający 14 atomów) alifatyczny linker (sonda Tel22-T_{py}). Sondy Tel22 zostały zsyntetyzowane w grupie badawczej prof. dr hab. R. Kierzka (ICHB PAN, Poznań). W tak zaprojektowanych systemach pochodne pirenu, przyłączone do 6 i/lub 18 pozycji znajdują się na zewnętrznych pętlach jeśli G-kwadrupleks przyjmie topologię koszykową (w obecności jonów sodu) (Rys. 4a, 4c oraz 4e) lub na pętli zewnętrznej i /lub śmigłowej w przypadku przyjęcia struktury hybrydowej (w obecności jonów potasu) (Rys. 4b, 4d oraz 4f). Z drugiej strony, można było się spodziewać, że wprowadzenie dwóch pirenów na sztywnych łącznikach etinowych do struktury oligonukleotydu d[AG₃(TTAG₃)₃], faworyzować będzie przejście konformacyjne do architektury koszykowej (Rys. 4a) nawet w obecności innych jonów niż sodowe.



Rys. 4. Topologie przyjmowane przez badane sondy: Tel22-U_{py}/Na⁺ - forma koszykowa (a) Tel22-U_{py}/K⁺ - forma hybrydowa (mieszana) (b), Tel22-6U_{py}/Na⁺ - forma koszykowa (c), Tel22-6U_{py}/K⁺ - forma hybrydowa (d), Tel22-18U_{py}/Na⁺ - forma koszykowa (e), Tel22-

18Upy/K⁺ - forma hybrydowa (f) oraz Tel22-Tpy/Na⁺ w formie koszykowej (g) i Tel22-Tpy/K⁺ w formie hybrydowej (h) [H8].

Właściwości emisyjne sond kwadrupleksowych Tel22 podwójnie i pojedynczo znakowanych pochodną Upy różniły się nieznacznie, stąd nasuwa się wniosek, iż w sondach tych nie ma spodziewanych oddziaływań między pirenami. I tak, zarówno widma absorpcji, jak i fluorescencji sond znakowanych Upy w konformacji zamkniętej i zwiniętej do G-kwadrupleksu były prawie identyczne. W każdym przypadku obserwowane było szerokie pasmo emisji długofalowej związane z fluorescencją Upy, znajdującej się w elektronowo wzbudzonym stanie z wewnątrzcząsteczkowym przeniesieniem ładunku (Py^{•+}/dU^{•-}). Co istotne, położenie tego pasma (460-480 nm) w omawianych sondach Tel22 jest inne niż (430 -450 nm) w przypadku sond na bazie latarni molekularnych zaproponowanych przez Kima i współl. [16-17]. Taką rozbieżność z doniesieniami literaturowymi można tłumaczyć w oparciu o wyniki Gabellah, który obserwował przesunięcie maksimum fluorescencji Upy w dupleksach zawierających tyminy [18]. W naszym przypadku znaczniki Upy są umieszczone w łańcuchu oligonukleotydowym między adeniną a tyminą, która ze względu na swój potencjał redukcyjny stabilizuje stan separacji ładunku Upy (Py^{•+}/dU^{•-}). W rezultacie tego obserwujemy pasmo emisji Upy w przedziale bardziej długofalowym (460-480 nm). Widma CD sond Upy oraz sondy referencyjnej Tel22-Tpy w obecności jonów sodu wskazują na ich topologię koszykową, zaś w obecności jonów potasu na formę hybrydową (Rys. 4).

Nieoczekiwanie kwadrupleks utworzony przez sondę referencyjną Tel22-Tpy, posiadającą pireny na długich łącznikach alkilowych w pozycji 6 oraz 18 łańcucha oligonukleotydowego, wykazuje w obecności jonów potasu oprócz silnej fluorescencji monomerowej pirenu (maksimum około 400 nm) także mniej intensywne pasmo emisji ekscymerowej pirenu (maksimum przy 480 nm). Przypomnijmy, że analogiczna sonda Py-Htelom-Py [H1, H2] znakowana obustronnie pirenami przez krótsze łączniki alkilowe emitowała tylko fluorescencję monomerową pirenu, niezależnie od przyjętej topologii. Stąd można przyjąć, iż długie i elastyczne łączniki w sondzie Tel22-Tpy przyczyniły się do interakcji między pirenami, prowadzącej do utworzenia świeżącego ekscymeru nawet w tak niekorzystnej konformacji jak kwadrupleks hybrydowy (Rys. 4h).

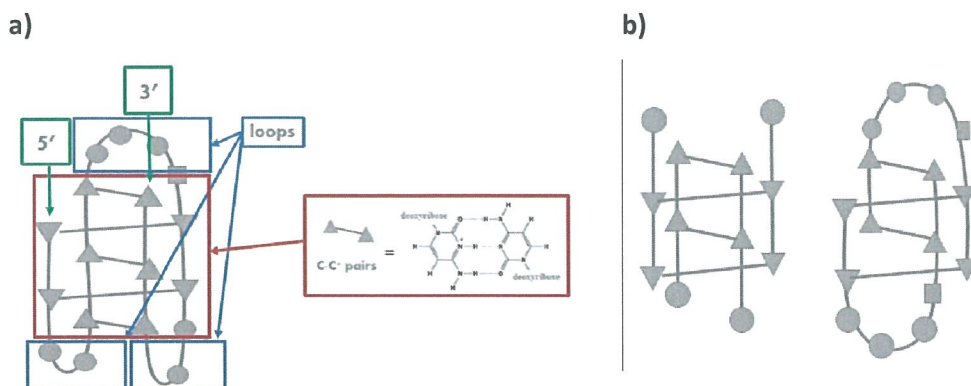
Poniżej podsumowałam najważniejsze wyniki i spostrzeżenia dotyczące sond G-kwadrupleksowych znakowanych pochodnymi pirenu:

- Po raz pierwszy wykazałam, iż nie tylko stosunek fluorescencji monomerowej do ekscymerowej, ale i średni czas życia obustronnie znakowanych pirenem kwadrupleksów zależy wprost proporcjonalnie od stężenia jonów potasu tylko w przypadku przyjmowania topologii krzesłkowej. *De facto* dotyczy to jednocząsteczkowego G-kwadrupleksu na bazie aptameru antytrombinowego (TBA).
- Potwierdziłam, iż polimorfizm G-kwadrupleksów potasowych o sekwencji ludzkiego telomerowego DNA (Htelom) praktycznie uniemożliwia racjonalne otrzymanie układu obustronnie znakowanego pirenami, pracującego w trybie monomer-ekscymer w odpowiedzi na zmiany stężenia jonów K^+ .
- Wykazałam, że fluorescencja sond na bazie TBA oraz Htelom posiadających piren na końcu 3' jest również stopniowo wygaszana w odpowiedzi na zmianę konformacji przy kompleksowaniu jonów potasu. Wyniki te wskazują, że nawet G-kwadrupleksy pojedynczo znakowane pirenem nadają się do zastosowań bioanalitycznych.
- Niezależnie od przyjętej architektury, G-kwadrupleksy o sekwencji ludzkiego telomerowego DNA znakowane jedną lub dwoma 5-(1-etynylopirenylo)-2'-deoksyurydynami (Upy) w pętłach emitują szerokie długofalowe pasmo pochodzące od emisji ze wzbudzonego stanu z przeniesieniem ładunku ($Py^{\bullet+}/dU^{\bullet-}$).
- Umieszczenie pierścieni pirenowych w pierwszej i trzeciej pętli G-kwadrupleksu Htelom na krótkich, sztywnych łącznikach (tj. zastosowanie pochodnej Upy) nie jest wystarczające, aby wywołać ich wzajemne oddziaływanie w konsekwencji implikujące zmianę konformacji do formy koszykowej.

B) Sondy oligonukleotydowe na bazie i-motywów [H3, H4, H6]

I-motywy powstają na obszarach DNA zawierających ciągi cytozyny, które w wyniku częściowej protonizacji cytozyny są zdolne do tworzenia równoległego dupleksu stabilizowanego przez wiązania wodorowe między cytozyną a cytozyną protonowaną (pary C·C⁺). Dopiero dwa takie dwuniciowe fragmenty przenikając się nawzajem tworzą strukturę czteroniciową zwaną i-motywem. Podobnie jak w przypadku G-kwadrupleksów, rozróżniamy i-motywy intermolekularne (międzycząsteczkowe zbudowane z 2 lub 4 oligonukleotydów) oraz intramolekularne (Rys. 5) [19-20]. Forma intramolekularna powstaje w wyniku zwinięcia się pojedynczego łańcucha zawierającego minimum cztery trakty cytozynowe (Rys. 5a). Trwałość struktury i-motywu zależy przede wszystkim od sekwencji oligonukleotydu oraz wartości pH otoczenia, co przyczyniło się do wykorzystania tego typu struktur do konstrukcji sond oraz nanomaszyn reagujących na zmiany pH - przykłady można

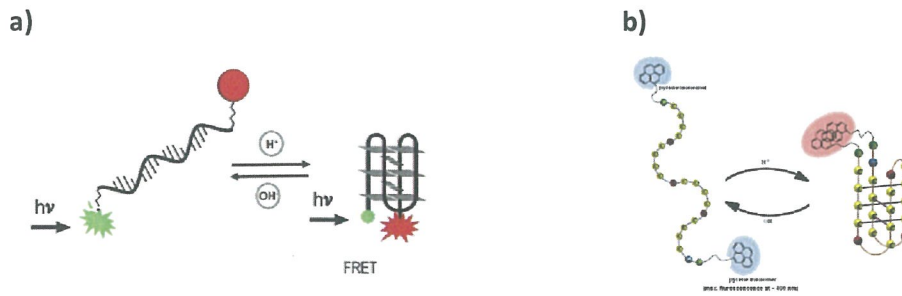
znaleźć w artykule przeglądowym [H6].



Rys. 5. Struktura jednocząsteczkowego i-motywu wraz z hemiprotonowaną parą C·C⁺ (a) oraz struktury i-motywów intermolekularnych, gdzie trójkąty symbolizują cytozyny (b) [H9].

Biorąc pod uwagę powyższe, **postawiałam sobie za cel sprawdzenie zdolności i potencjału analitycznego różnych jednocząsteczkowych i-motywów do zastosowania jako sondy dające sygnał fluorescencyjny w odpowiedzi na zmiany pH otoczenia [H3, H4].**

Ta część prezentowanych badań została wykonana w ramach grantu pt. „Fluorescencyjne sondy oligonukleotydowe znakowane pirenem czułe na zmiany pH”; finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki (nr projektu NN204 220040), którego byłam kierownikiem w latach 2011-2014. Z punktu widzenia topologii i-motywu, idea wykorzystania pary FRET do budowy jednocząsteczkowego sensora pH wydaje się być niekorzystna, gdyż w większości przypadków końce 5' i 3' w i-motywie znajdują się na sąsiednich niciach DNA. Zgodnie z doniesieniami literaturowymi [21], taka konfiguracja pary donor/akceptor powoduje silne wygaszanie fluorescencji akceptora w wyniku oddziaływań warstwowych (ich zbyt bliski kontakt). Przypuszczenie to potwierdziły nasze późniejsze badania z wykorzystaniem sondy oligonukleotydowej 488-RET-590 opartej na fragmencie sekwencji onkogenu RET (A CCCCCG CCCCCG CCCCCG CCCC TA), znakowanej donorem (ATTO488) na końcu 5' oraz - akceptorem (ATTO590) na końcu 3' (Rys. 6a). W przypadku sondy 488-RET-590, podczas formowania się w i-motyw przy obniżaniu pH, obserwowaliśmy spadek fluorescencji donora (przy 520 nm) z nieznacznym wzrostem emisji akceptora (przy 620 nm) [22]. Wydłużenie końca 5' o fragment TTTT tylko nieznacznie polepszyło obserwowane efekty FRET.



Rys. 6. Zasada działania sondy na bazie jednocząsteczkowego i-motywu (a) znakowanej parą FRET (b) znakowanej obustronnie pirenami.

Wydaje się, że takie samo jak w i-motywie ułożenie końców 5' i 3' istnieje w strukturze krzesłkowej kwadруплексу aptameru trombinowego (TBA) w obecności KCl. Ta analogia zainspirowała mnie do zaprojektowania sondy do monitorowania zmian pH na bazie jednocząsteczkowego i-motywu znakowanego obustronnie ugrupowaniem pirenowym (Rys. 6b). W założeniu, odpowiednie pH stymulować będzie wybrane sekwencje do formowania struktury czteroniciowej (i-motywu), co z kolei powinno prowadzić do efektywnego oddziaływania obu grup pirenowych i generowania fluorescencji ekscymerowej analogicznie jak w przypadku sondy Py-TBA-Py.

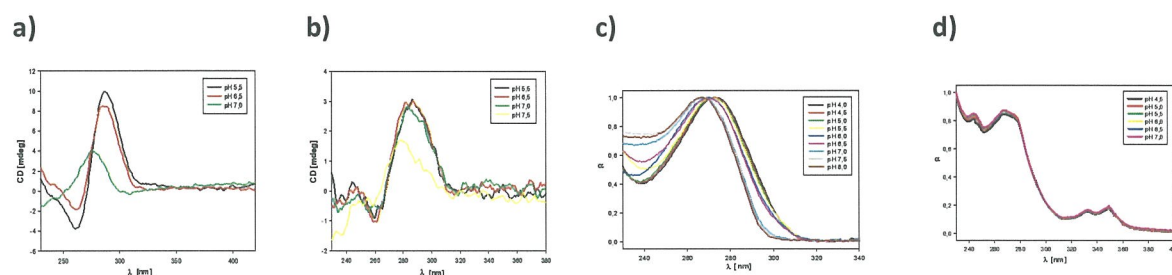
Na podstawie przeglądu literaturowego wyselekcjonowałam sekwencje mogące tworzyć intramolekularne struktury i-motywu tj. 22-mer o sekwencji 5'-(CCCCACCCT)₂C₄-3', będący składową promotora c-Myc [23] oraz 21-mer o sekwencji 5'-C(CCCGC)₃C₃TA-3', wchodzący w skład promotora RET [24]. Omawiane tutaj sondy i-motywowo zostały zsyntetyzowane przeze mnie lub przez studentki wykonujące prace magisterskie pod moim nadzorem. W pierwszym etapie badań, w wyniku przyłączenia grup pirenowych do obu końców nici uprzednio sfunkcjonalizowanych grupami aminowymi, udało się otrzymać następujące sondy obustronnie znakowane pirenami:

- 5'-Py-CCCCACCCT CCC CAC CCT CCCC-Py-3' (Py-cmyc22-Py)
- 5'-Py-CCCCACCCTCCCCACCCTCCCCA-Py-3'(Py-cmyc22A-Py)
- 5'-Py-CCC CGC CCC GCC CCG CCC CTA-Py3' (Py-RET21-Py)
- 5'-Py-ACCCCGCCCCGCCCGCCCCTA-Py-3' (Py-RETA21-Py)
- 5'-Py-CCC CGC CCC GCC CCG CCC CT-Py-3' (Py-RET20-Py)

Ze względu na fakt, iż otrzymane sondy nie były wcześniej przez nikogo badane dokonałam ich pełnej charakterystyki spektroskopowej, obejmującej rejestrację

spektrofotometrycznych profili topnienia, widm CD, UV oraz fluorescencji w zakresie pH 4,0-8,0.

W pierwszej kolejności postanowiłam sprawdzić, czy obecność znaczników pirenowych nie będzie przeszkodą w formowaniu się struktury i-motywu w przypadku otrzymanych sond. Zarejestrowałam widma dichroizmu kołowego (CD), aby prześledzić przejście konformacyjne między i-motywem i przypadkowo zwiniętym łańcuchem o strukturze jednoniciowej (ssDNA). Widma CD oligonukleotydu cmyc22 oraz sondy Py-cmyc22-Py w roztworze kwaśnym wykazują pozytywny sygnał przy 288 nm i sygnał ujemny przy 260 nm, co wskazuje na złożoną strukturę i-motywu (Rys. 7a-b) [25]. Podobne widma spektralne obserwowano dla innych sond. Kiedy struktura i-motywu Py-cmyc22-Py ulega rozwinięciu przy wyższych wartościach pH ($\text{pH} > 7,00$), intensywność pasma dodatniego maleje wraz z przesunięciem w kierunku fal krótszych, a jednocześnie pasmo ujemne zanika. Widma rejestrowane przy wartościach pH bliskich 8,0 wykazują słabe pasmo dodatnie około 280 nm, które jest typowe dla jednoniciowej struktury nieuporządkowanej typu kłęбка statystycznego (ang. *random coil*). Ponadto analizując widma CD omawianych sond oraz ich niemodyfikowanych prekursorów stwierdziłam, iż obecność znaczników pirenowych wpływa pozytywnie na stabilność struktury i-motywu. W szczególności, sondy Py-cmyc22A-Py oraz Py-RET21A-Py w pH 7,5 występują nadal w formie i-motywu, o czym świadczy intensywne pasmo CD przy 288 nm.

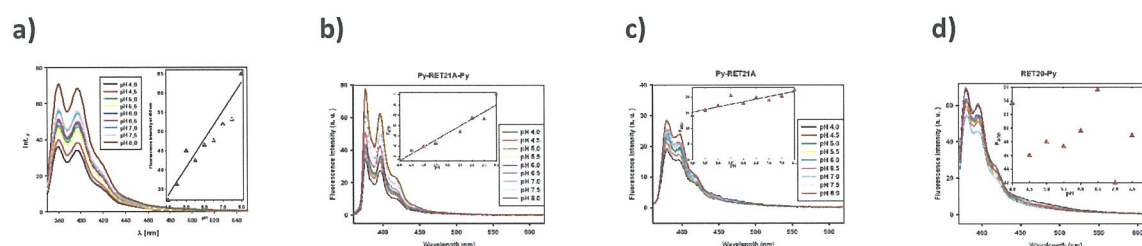


Rys. 7. Widma CD oligonukleotydu cmyc22 (a) i sondy Py-cmyc22-Py (b) oraz widma absorpcji oligonukleotydu cmyc22 (c) i sondy Py-cmyc22-Py (d) w różnych pH [H3].

Kolejną techniką pozwalającą na obserwacje tworzenia się i-motywu jest spektroskopia molekularna, gdyż w efekcie protonowania cytozyny obserwuje się efekt hiperchromowy przy długości fali od 275 do 300 nm, oraz efekt batochromowy związany z przesunięciem maksimum absorpcji z ~ 262 nm (dla obojętnej cytozyny) do ~ 275 nm (dla protonowanej cytozyny) (Rys. 7c). Dlatego monitorowanie zmian absorbancji w zakresie 275-300 nm jest dogodną metodą określania stabilności i-motywu w funkcji zmian temperatur bądź pH [25].

Widmo absorpcji oligonukleotydów z obustronnie przyłączonym pirenem charakteryzuje się trzema wyraźnymi pasmami absorpcji: intensywnym pasmem przy około 240 nm, szerokim pasmem w granicach 260-300 nm oraz dobrze odseparowanym, niskoenergetycznym pasmem powyżej 310 nm z lokalnym maksimum przy długości fali około 345 nm (Rys. 7d).

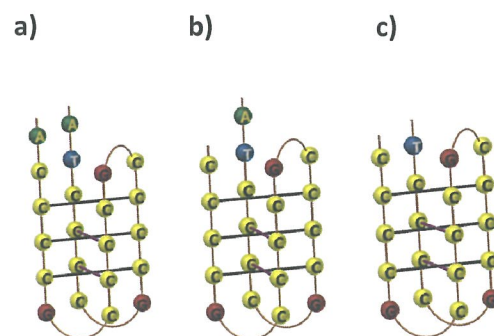
Wykresy denaturacji termicznej wszystkich sond wykazały oczekiwany hiperchromizm przy 260 nm i hipochromizm przy 300 nm, co jest zgodne z badaniami Mergny'ego i współpracowników dotyczącymi tworzenia się struktur i-motywów [26]. Analiza profili absorbancji przy długości fali 260 i 300 nm prowadziła do identycznych temperatur topnienia (T_m). Otrzymane wyniki wskazują, że wartości T_m określone dla wszystkich badanych sond były zdecydowanie wyższe w lekko kwaśnym zakresie pH. W każdym przypadku dla obustronnie znakowanych pirenem sond, najwyższą temperaturę topnienia otrzymano w roztworze o wartości pH 4,5, które odpowiada wartości pK_a cytozyny (4,58) [27]. Na przykład dla sondy Py-cmyc22-Py T_m w pH 4,5 wynosi około 60 °C i jest wyższa prawie o 25 °C niż T_m w pH 7,0. Uzyskane wyniki dla wszystkich sond wykazują tendencje wzrostu wartości temperatury topnienia wraz z obniżeniem pH, co potwierdza stabilizujący wpływ środowiska o odczynie kwasowym na tworzenie się struktury i-motywu.



Rys. 8. Widma emisji sond obustronnie znakowanych pirenami Py-cmyc22-Py (a) i Py-RET21A-Py (b) oraz sond jednostronnie znakowanych pirenem Py-RET21 (c) i RET20-Py (d) w różnych pH [H3]-[H4].

We wszystkich widmach emisji obustronnie znakowanych pirenem sond na bazie sekwencji RET oraz cmyc (w roztworach o pH od 4,0 do 8,0) zaobserwowano obecność charakterystycznego dla monomeru pirenu pasma emisji z maksimum przy długości fali około 380 nm (Rys. 8). Dla sond Py-cmyc22-Py (Rys. 8a) oraz Py-cmyc22A-Py pasmo monomerowej fluorescencji zmniejsza swoją intensywność o około 50% przy przejściu od formy otwartej (pH 8,0) do i-motywu (pH 4,0). Jednak wygaszaniu emisji monomerowej pirenu nie towarzyszy narastanie fluorescencji ekscymerowej [H3]. Tak jak w przypadku G-kwadrupleksów fakt ten można powiązać z topologią i-motywu. W przypadku użytej

sekwencji $C_4AC_3TC_4AC_3TC_4$ (cmyc) mamy 5 traktów cytozynowych, więc możliwe jest utworzenie i-motywu w taki sposób, że zasady CCCC patrząc od końca 5' nie będą brały udziału w tworzenie par C·C+. W rezultacie koniec 5' tak złożonego i-motywu będzie o wiele dłuższy od końca 3', co *de facto* może utrudniać powstawanie kompleksu piren-piren wzbudzony. Jeżeli jednak założymy, że 22-merowy fragment cmyc złoży się w i-motyw z długą środkową pętlą zawierającą 6 zasad, jak to proponuje Simonson [23], to można przypuszczać, że brak emisji ekscymerowej sond Py-cmyc22-Py oraz Py-cmyc22A-Py jest wynikiem wygaszania spowodowanego oddziaływaniem fluoroforów z długą pętlą i-motywu. Tę hipotezę jednak wykluczyłam biorąc pod uwagę, że brak emisji ekscymerowej zanotowano także dla obustronnie znakowanych pirenem sond o sekwencji RET tworzących i-motyw, który klasyfikuje się do klasy I z krótkimi pętlami [28]. Sekwencja $C_4GC_4GC_4GC_4TA$ w formie i-motywu posiada trzy pętle o rozmiarach 5'-(2:3:2)-3'(Rys. 9b). Przypomnijmy, że na bazie sekwencji RET zaprojektowałam trzy sondy różniące się ilością zasad niezaangażowanych w rdzeń i-motywu tak, aby dysproporcje między „wiszącymi” końcami i-motywu były możliwie jak najmniejsze: Py-RET21A-Py, Py-RET21-Py oraz Py-RET-20-Py – szkielet tych sond jest pokazany na rysunku 9. Wyniki badań wskazują, że obecność (i ilość) zasad flankujących rdzeń i-motywu RET w żadnym wypadku nie była wystarczająca, aby ułatwić znacznikom pirenu przyjęcie odpowiedniej orientacji do utworzenia fluoryzującego dimeru.



Rys. 9. Struktura i-motywów na bazie sekwencji RET: 22-merowej (a) oraz 21-merowej i (b) 20-merowej (c) [H4].

Jako sondy referencyjne zsyntetyzowano i przebadano sondy monopodstawione pirenem z końca 5' nici tj. Py-RET21 oraz Py-RET21A oraz z końca 3' nici tj. RET21-Py oraz RET20-Py. Co ciekawe, układy znakowane pirenem tylko z jednego końca nici wykazują znacznie mniej wyraźny wpływ pH na intensywność fluorescencji w porównaniu z systemami obustronnie znakowanymi pirenami (Rys. 8b-d). Na przykład, intensywność

pasma fluorescencji monomeru przy 400 nm zmniejszyła się prawie o około 60% po obniżeniu pH z 8,0 do 4,5 dla Py-RET21-Py oraz PyRET21A-Py, podczas gdy w przypadku sond znakowanych pirenem tylko na końcu 5' (tj. Py-RET21 oraz Py-RET21A) zaobserwowano spadek emisji o około 35%. Wyniki te sugerują, że w przypadku obustronnie znakowanych pirenem i-motywów możliwe jest oddziaływanie pierścieni pirenowych ze sobą prowadzące do utworzenia niefluorescencyjnych dimerów pirenu (GSD – ang. *Ground State Dimer*). Dodatkowo, analiza wyników otrzymanych z czasowo-rozdzielczych widm emisji wykazała brak zależności między średnim czasem życia badanych sond od pH. Warto zauważyć, że fluorescencja sond na bazie RET posiadających piren na końcu 5', w odróżnieniu do sond znakowanych na końcu 3', jest również stopniowo wygaszana w odpowiedzi na zmianę konformacji wywołaną obecnością jonów H^+ [H4].

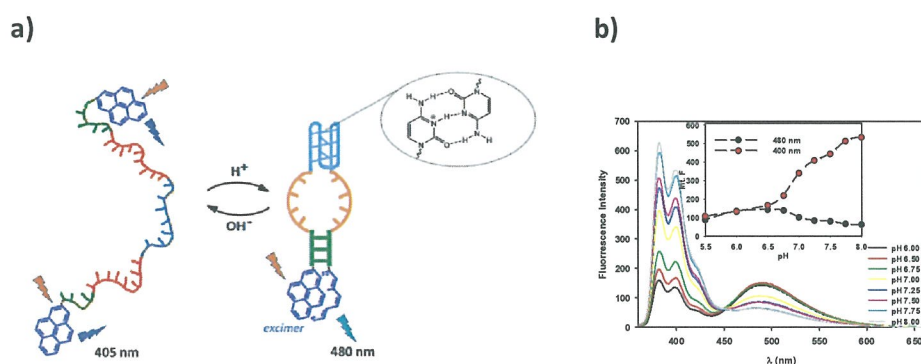
Podsumowując tę część badań, w wyniku systematycznej analizy spektroskopowej otrzymanych sond obustronnie znakowanych pirenem na bazie sekwencji cmyc oraz RET wykazałam, iż:

- Obecność podstawników pirenowych na obu końcach nici nie tylko nie przeszkadza w utworzeniu i-motywu, ale w większości stabilizuje przestrzenną strukturę 3D powstałego i-motywu
- Obustronnie znakowane pirenami sondy składają się w i-motywy wykazujące fluorescencję monomerową pirenu, wrażliwą na zmiany pH-otoczenia.
- Emisja mono-podstawionych pirenem sond na bazie sekwencji RET jest proporcjonalnie zależna od pH tylko w przypadku znakowania końca 5' oligonukleotydu.
- Obecność flankujących zasad niezaangażowanych w rdzeń i-motywu była niewystarczająca, aby pomóc znacznikom pirenu w przyjęciu orientacji face to face i utworzeniu ekscymeru.

Biorąc pod uwagę dotychczasowe wyniki, stwierdziłam, że różnica w długości wolnych końców wiszących po utworzeniu i-motywu może przeszkadzać w wygenerowaniu sygnału ekscymerowego pirenu. Celem uniknięcia tego problemu, zaproponowałam, aby na obu końcach oligonukleotydu C₄GC₄GC₄GC₄TA dodać kilka zasad, tworzących dodatkowe pary Watsona-Cricka po utworzeniu jednocząsteczkowego i-motywu. **W rezultacie skonstruowałam system wrażliwy na pH, który łączy właściwości i-motywu z działaniem obustronnie znakowanych pirenem latarni molekularnych [29].**

C) Latarnie molekularne z i-motywem w pętli [H5, H7, H9]

Latarnie molekularne zwane także strukturami typu spinki do włosów zostały wprowadzone w 1996 roku przez Tyagi'ego i Kramer'a jako narzędzie do wykrywania specyficznych sekwencji DNA i RNA [30-31]. Klasyczna latarnia molekularna to cząsteczka jednoniciowego DNA w której są dwa regiony komplementarne do siebie ułożone w przeciwnych kierunkach i przedzielone fragmentem stanowiącym sondę hybrydacyjną. Fragmenty komplementarne łączą się wiązaniami wodorowymi tworząc trzon struktury, natomiast fragment niesparowany tworzy pętlę. Początkowo w latarniach molekularnych sygnał analityczny uzyskiwany był w wyniku znakowania jednego końca fluoroforem a drugiego wygaszaczem [30]. Fujimoto et al. jako pierwsi wykorzystali pochodne pirenu do znakowania latarni molekularnych i obserwowania zaniku fluorescencji ekscymerowej towarzyszącemu zmianom konformacyjnym latarni molekularnej wywołanym przyłączeniem sekwencji komplementarnej do pętli (ang. *open state*) [32].



Rys. 10. Graficzne przedstawienie zasady działania obustronnie znakowanej pirenami latarni molekularnej z i-motywem (oznaczonym na jasnoniebiesko) w pętli, gdzie dodatkowo zawarto schemat pary cytozyna-cytozyna protonowana (a) oraz widma emisji sondy pHSO_A w roztworach o różnych pH (b) [H7].

Za cel obrałam sobie sprawdzenie zdolności i potencjału analitycznego latarni molekularnej z i-motywem w pętli jako sensora pracującego w trybie monomer-ekscymer w odpowiedzi na zmiany pH otoczenia [H5].

Zaproponowany przeze mnie system, jak przedstawiono na rysunku 10, składa się z obustronnie znakowanego pirenami dwuniciowego rdzenia o długości sześciu par zasad oraz 25-merowej pętli zawierającej powtórzenia policytozynowe [H5]. Zasada działania tak zaprojektowanej sondy zakłada, że w lekko kwaśnym, a nawet obojętnym pH, bogata w cytozyny pętla latarni molekularnej będzie złożona w i-motyw, a układ będzie emitował

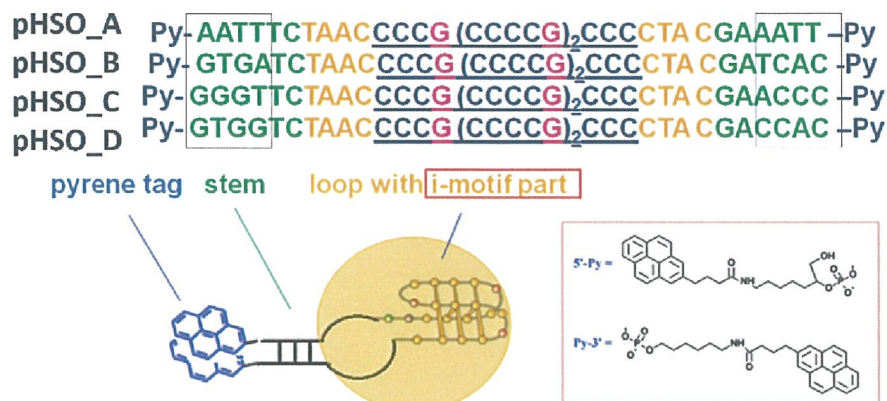
fluorescencją ekscymerową. W sytuacji, gdy pH otoczenia sondy wzrośnie, nastąpi przejście i-motywu do formy otwartej, zwiększenie się pętli, co spowoduje destabilizację rdzenia latarni molekularnej (efekt allosteryczny) i odseparowanie pirenów prowadzące do zmniejszenia/zaniku fluorescencji ekscymerowej na rzecz pojawienia się fluorescencji monomerowej pirenu. Powyższe założenie, że generowanie sygnału analitycznego przez znaczniki fluorescencyjne umieszczone na końcach latarni molekularnej jest konsekwencją zmniejszania się pętli w wyniku składania się i-motywu w części pętlowej, zostało niezależnie potwierdzone przez badania Nesterova i in. na systemie znakowanym parą FRET [33].

Biorąc pod uwagę potencjalne zastosowanie latarni molekularnej jako sensora do monitorowania zmian pH, w pierwszej kolejności wykazałam, iż fragment C₄GC₄GC₄GC₄TA zawarty w pętli 37-merowej latarni molekularnej o sekwencji AATTTC TAAC₄GC₄GC₄GC₄TAC GAAATT (gdzie podkreślono fragment rdzenia) składa się w i-motywie w obecności jonów H⁺. System ten nazwałam pHSO_A, gdzie pHSO to akronim angielskiego wyrażenia pH Sensitive Oligonucleotide tzn. pH-wrażliwy oligonukleotyd.

W widmie CD sondy pHSO_A widać charakterystyczne dla i-motywu pasmo dodatnie z maksimum przy około 285 nm i pasmo ujemne w obszarze 250-260 nm. Ponadto, z zależności intensywności pasma CD przy 285 nm od pH, wyznaczyłam punkt przejścia między formą otwartą a złożoną i-motywu w pętli (pH_T), który zarówno dla sekwencji niemodyfikowanej, jak i dla sondy pHSO_A wynosi 7,25. Z tego wynika, iż obecność podstawników pirenowych na obu końcach latarni molekularnej nie miała wpływu na stabilności i-motywu w pętli. Zgodnie z założeniem układ emituje fluorescencję ekscymerową, której intensywność zależy od pH otoczenia (Rys. 10b). Zakres działania sondy wyznaczyłam metodą fluorescencyjną, wykreślając zależność stosunku intensywności pasma emisji monomeru do pasma emisji ekscymeru od pH. Jak pokazano na rysunku 12a, sonda pHSO_A jest wrażliwa na zmiany pH w zakresie między pH 6,25 a 7,75. Co istotne, zakres ten pokrywa się z wartościami pH jakie są spotykane wewnątrz komórek. Warto przypomnieć, że typowe pH cytozolu to około 7,4 i w stanach chorobowych czy pod wpływem stresu oksydacyjnego pH to może się obniżyć. Celem efektywnego sprawdzenia, szybkości i odwracalności pracy sondy wykonałam eksperyment, polegający na pomiarach intensywności fluorescencji próbki w czasie z naprzemiennym dodawaniem jonów H⁺ oraz OH⁻. Otrzymane wyniki wskazują na natychmiastową odpowiedź układu na zmiany pH między 6,5 a 7,5, a naprzemienne spadki i wzrosty fluorescencji wskazują na odtwarzalność pracy sondy. Dodatkowo w pracy [H5] wykazałam, iż wprowadzenie punktowej mutacji w obrębie pętli latarni molekularnej (lecz nie w domenie i-motywu) ma istotny wpływ na

stabilność i zakres pracy sondy. Jednakże zmiana ta nie poprawiła właściwości fluorescencyjnych układu tzn. intensywność pasma emisji ekscymerowej pozostała na tym samym poziomie.

Biorąc pod uwagę fakt, iż sygnał analityczny latarni molekularnej z i-motywwem w pętli w odpowiedzi na zmiany pH otoczenia jest wywołany efektem allosterycznym pomiędzy rdzeniem a pętlą postanowiłam zbadać, czy zmiana ilości par GC w rdzeniu tego konstruktury wpłynie na zakres dynamiczny pracy sondy [H7].



Rys. 11. Skład i ogólna budowa latarni molekularnych pHSO (ang. *pH-Sensitive Oligonucleotide*) z zaznaczonymi elementami strukturalnymi. W szarych ramkach uwidoczniono różnice w elementach strukturalnych sond [H7].

W tym samym czasie Jonstrup i inni wykazali, iż stabilność rdzenia latarni molekularnych można regulować poprzez zmianę zawartości par GC w rdzeniu [34]. Zaprojektowane sondy pHSO różnią się od siebie czterema parami zasad spośród sześciu tworzących rdzeń latarni: sonda pHSO_A posiada tylko pary zasad AT, podczas gdy w innych sondach dwie (pHSO_B) lub trzy pary zasad AT (pHSO_C, pHSO_D) są zastąpione parami GC (Rys. 11).

Po pierwsze, analiza widm CD potwierdziła, że pętle zaprojektowanych latarni są w stanie złożyć się w i-motyww, ale z innymi wartościami pH_T (Tabela 1). Wyznaczone wartości T_m badanych sond pHSO wskazują, że latarnie zawierające odpowiednio: 3 (pHSO_B) lub 4 (pHSO_D) pary GC w rdzeniu mają nieco bardziej stabilny i-motyww, pod warunkiem, że nie ma traktu GGG w części dwuniciowej (pHSO_C). Sądzymy, że jest to konsekwencja faktu, że sonda pHSO_C zawiera trzy kolejne guanozyny (GGG) na końcu 5', co może utrudniać tworzenie się motywwu i ze względu na potencjalną możliwość tworzenia dodatkowych interakcji z traktami cytozynowymi w pętli.

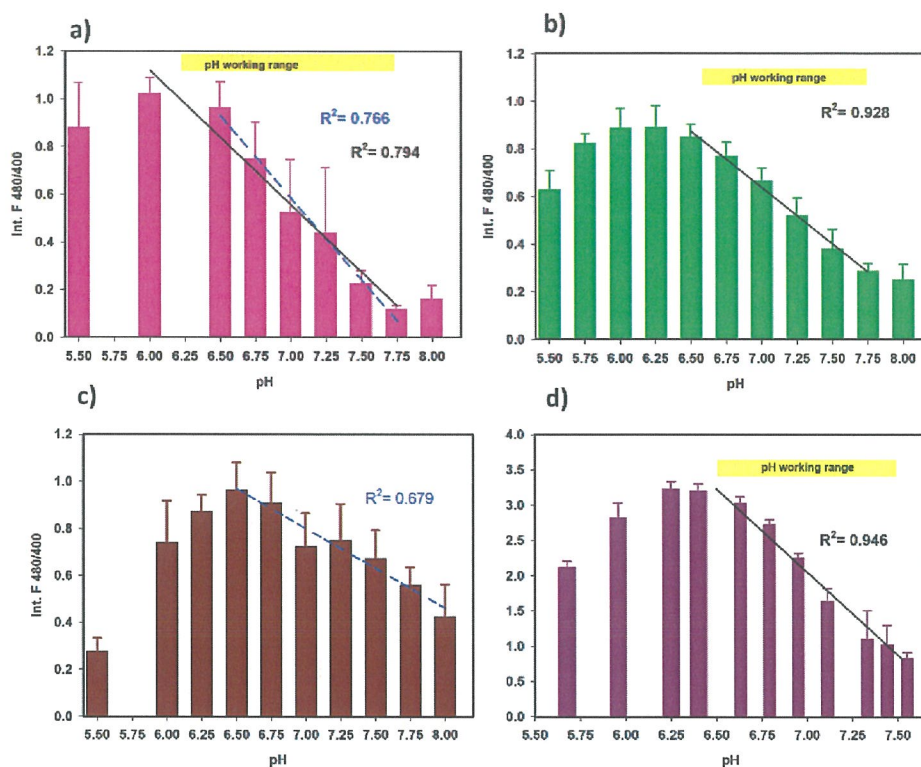
W widmach fluorescencji wszystkich sond pHSO w badanym zakresie pH są obecne pasma emisji monomeru, oraz ekscymeru, jednakże udział emisji długofalowej w całkowitej fluorescencji w zakresie pH 6,0-6,75 jest wyższy w przypadku sond pHSO_C i pHSO_D. Wyniki te potwierdzają kluczową rolę stabilnego rdzenia w produkcji wydajnych ekscymerów przez pirenę na końcach latarni molekularnych. W przypadku sondy pHSO_C obserwuje się (wraz z obniżaniem pH) stopniowe wygaszenie zarówno fluorescencji monomerowej, jak i ekscymerowej pireny. Fakt ten także powiązaliśmy z obecnością traktów GGG w rdzeniu tej sondy- należy bowiem pamiętać, że powtórzenia GG i GGG są bardzo wydajnymi donorami elektronów dla pireny, co skutkuje wygaszaniem emisji pireny (GGG wygasa skuteczniej niż GG) [35]. Ponadto zaobserwowano, że obecność traktu GGG w rdzeniu latarni molekularnej powoduje realtywnie wolniejsze przejście między formą otwartą a zamkniętą tej sondy. W przypadku pozostałych sond zarejestrowano ich natychmiastową odpowiedź na cykliczne zmiany pH – przykładowy wykres pokazujący odwracalność pracy sondy pHSO_D zamieszczono na rysunku 14a.

Tabela 1. Właściwości sond pHSO [H7].

	pHSO_A	pHSO_B	pHSO_C	pHSO_D
pH _r CD	7.25	7.10	6.97	7.10
pH _r FL	6.97	7.20	nd	7.00
zakres działania	6.25-7.75	6.50-7.75	nd	6.50-7.50
szerokość przedziału działania	1.5 units	1.25 units	nd	1.0 unit
precyzja	0.67	0.29	nd	0.27

Zakres działania sond wyznaczono metodą fluorescencyjną, wykreślając zależność stosunku emisji monomer/ekscymer od pH (Rys. 12). Stwierdzono, że sonda pHSO_B (3GC) jest wrażliwa na zmiany pH w zakresie między pH 6,50 a 7,75, zaś sonda pHSO_D (4GC) w zakresie między pH 6,50 a 7,50. Ponadto zakres prostoliniowości działania sond pokrywa odpowiednio 1,25 jednostki pH w przypadku pHSO_B (3GC) i 1,0 jednostki pH dla pHSO_D (4GC), w porównaniu z 1,5 jednostki pH dla pHSO_A z 1 parą GC w rdzeniu. Co więcej sondy pHSO_B i pHSO_D wykazują się większą precyzją niż sonda pHSO_A (Tabela 1). Biorąc pod uwagę fakt, iż badane sondy pHSO są tej samej długości i posiadają identyczne pętle z wbudowanym i-motywy, można stwierdzić, iż obserwowane różnice w precyzji oraz zakresie działania sond wynikają z innej stabilności ich rdzeni. Wyniki te zgadzają się z zaobserwowanym trendem, iż latarnie molekularne z rozszerzonym zakresem działania są mniej precyzyjne niż te, które mają zawężony zakres działania [36]. Z drugiej strony, uzyskany przez mniejszy zakres pracy latarni pHSO_D przeczy przekonaniu, że takie

zakresy pracy są trudne do uzyskania w przypadku włączenia i-motywu w pętlę latarni (tzw. *external hairpin*), w przeciwieństwie do sytuacji, gdy i-motyw umieszczony jest w rdzeniu latarni molekularnej (*internal hairpin*) [37].

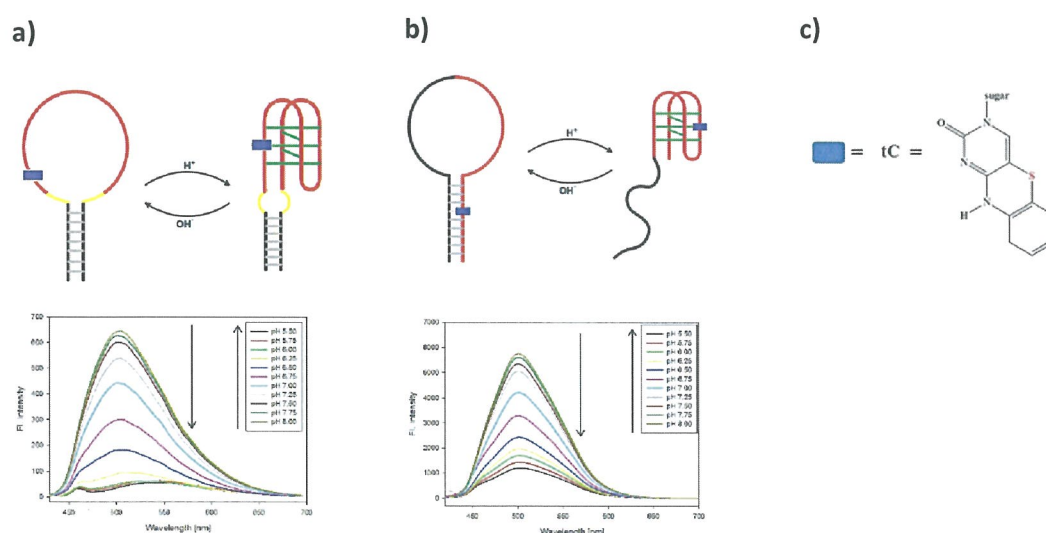


Rys. 12. Zależność stosunku pasma emisji ekscymeru/monomeru od pH w poszczególnych sondach; na żółto zaznaczono zakres działania sond, gdzie: pHSO_A (a), pHSO_B (b), pHSO_C (c), pHSO_D (d) [H7].

Reasumując, opracowałam alternatywny sposób otrzymywania wysoce czułych sond do pomiaru pH, opartych na i-motywach, wykazujących się określonym pH_T i przedziałem działania. Rozwiązania proponowane przez większość badaczy do modulacji zakresu działania sond na bazie i-motywów dotyczą głównie ilościowych i jakościowych zmian w rdzeniu i-motywu tj. (a) kontrolowana zmiana ilości powtórzeń cytozyny; (b) wprowadzenie zmodyfikowanych nukleozasad cytozyny (c) modyfikacja szkieletu DNA; (d) zastąpienie cytozyny jej fluorescencyjnym analogiem. Informacje na ten temat zebrane są w pracy przeglądowej [H9].

Podejście, w którym co najmniej jedną z cytozyn wchodzącą w skład i-motywu zastępuje się jej fluorescencyjnym analogiem jest bardzo atrakcyjne pod względem zastosowania tak zaprojektowanego i-motywu jako fluorescencyjnej sondy do monitorowania zmian pH, ponieważ w jednym zabiegu wprowadza się zarówno element fluorescencyjny, jak i wpływa

na pH_T sondy. Podstawienie normalnych nukleozasad za pomocą ich analogów fluorescencyjnych nie jest popularnym rozwiązaniem ze względu na ograniczoną liczbę dostępnych nukleozasad fluorescencyjnych. Do grupy fluorescencyjnych analogów cytozyny należą 1,3-diazo-2-oksofenotiazyna (analog tC) oraz 1,3-diazo-2-oksofenoksazyna (analog tC⁰) [38]. Warto wspomnieć, iż badania nad fluorescencyjnymi sondami na bazie i-motywu o sekwencji RET z wbudowanym tricyklicznym analogiem cytozyny (tC) wchodzi w skład pracy doktorskiej przygotowywanej przez mgr P. Bielecką, której jestem promotorem pomocniczym. Co więcej, ostatnio rozpoczęliśmy badania nad latarniami molekularnymi zintegrowanymi z domeną i-motywu o sekwencji C₄GC₄GC₄GC₄TA zawierającej analog tC [H9]. W pierwszym podejściu struktura latarni zawiera analog tC wprowadzony do pętli bogatej w powtórzenia cytozynowe (Rys. 13a), tak, iż w warunkach alkalicznych ten fluorofor znajduje się na pojedynczym łańcuchu DNA (ss (tC)). Jednakże przy wartościach pH poniżej 7,0, ten fluorescencyjny analog cytozyny znajduje się w strukturze i-motywu (iM (tC)). Zatem, sygnał analityczny wywołany zmianą pH jest zależny od różnicy w wydajności kwantowej fluorescencji tC w ssDNA i w i-motywie (Rys. 13a dolny panel).



Rys. 13. Zasada działania latarni molekularnych z i-motywem, zawierającym analog tC w rdzeniu, gdzie: sekwencja bogata w cytozyny znajduje się w pętli (a) lub znajduje się częściowo w pętli i częściowo w rdzeniu (b), struktura tC (c) [H9].

W drugim zaproponowanym systemie, zarówno rdzeń jak i część pętli zawierają powtórzenia cytozyny (Rys. 13b). W warunkach alkalicznych struktura latarni jest zdominowana przez układ spinki do włosów, gdzie analog tC znajduje się w rdzeniu sondy (ds (tC)). Jednakże w warunkach słabo kwaśnych, kiedy nić bogata w cytozyny utworzy i-

motyw, analog tC będzie umiejscowiony w strukturze tetrapleksu (iM (tC)). W tym przypadku sygnał analityczny w odpowiedzi na zmiany pH otoczenia jest zależny od różnicy w wydajności kwantowej fluorescencji tC w dsDNA i w i-motywie (Rys. 13b dolny panel).

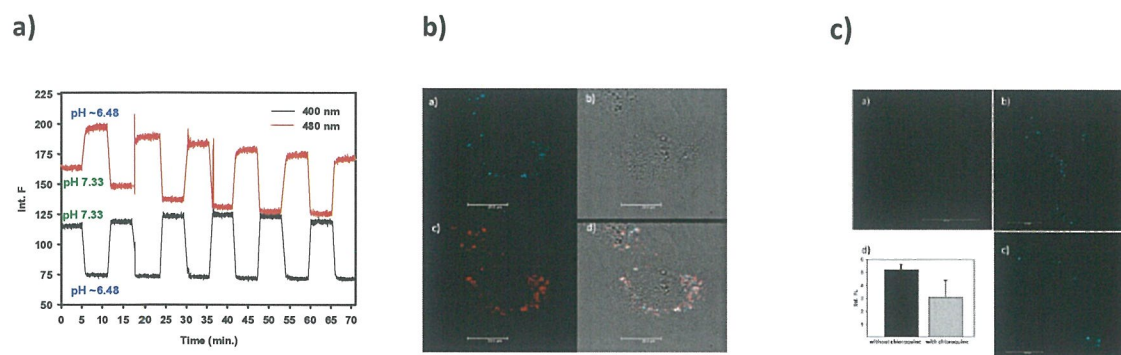
W dalszej pracy chciałabym rozszerzyć w/w badania na latarnie molekularne zintegrowane z i-motywiem, znakowane tC oraz innym fluoroforem, który mógłby pełnić rolę akceptora energii od tC. Takie rozwiązanie pozwoliłoby otrzymać sygnał analityczny w zakresie bardziej długofalowym niż w systemach dotychczas przeze mnie proponowanych, co jest zawsze korzystniejsze w badaniach aplikacyjnych dotyczących systemów komórkowych *in vivo*. 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*).

W ostatnim etapie badań, podjęłam się oceny użyteczności zaprojektowanych latarni pHSO do pomiarów zmian wewnątrzkomórkowego pH. Badania te były wykonywane we współpracy z grupą badawczą dr hab. E. Kierzek (IChB PAN w Poznaniu) z użyciem mikroskopu konfokalnego (TCS SP5 II Leica).

Spośród otrzymanych latarni molekularnych wybrałam 2 sondy różniące się zasadniczo właściwościami (pHSO_A oraz pHSO_D), które poddano transfekcji do żywych komórek (linia HeLa). Już pierwsze eksperymenty na żywych komórkach wykazały, iż tego typu sondy są trwałe *in cellulo* oraz emitują fluorescencję obserwowaną pod mikroskopem konfokalnym [H7]. Obrazy z konfokalnej mikroskopii fluorescencyjnej wskazywały na obecność sygnałów fluorescencyjnych w kształcie kropek w komórkach HeLa traktowanych pHSO_A lub pHSO_D (Rys. 14b-c). W komórkach kontrolnych (nie transfekowanych sondami) nie obserwowano takich efektów, a co najwyżej obraz rozproszonej fluorescencji (Rys. 14c; lewy górny panel) - dowodzi to, że obserwowane sygnały fluorescencyjne pochodzą od sond, a nie są wynikiem autofluorescencji komórki. Celem stwierdzenia, w jakie miejsce w komórce kierowane są badane sondy, przeprowadzono eksperyment z dodatkiem barwnika LysoTracker Red, który potrafi specyficznie wybarwiać lizosomy [39]. Dzięki nałożeniu obrazów fluorescencji sond z obrazem emisji barwnika LysoTracker Red stwierdzono, że obie sondy znajdowały się poza jądrem żywych komórek i że tego rodzaju sondy można stosować do znakowania lizosomów (Rys. 14b, prawy dolny panel).

W celu dalszej oceny potencjalnych zastosowań latarni z i-motywiem i w pętli jako sondy do pomiarów zmian pH wewnątrz komórek, komórki HeLa transfekowane sondą poddano działaniu chlorokwiny. Chlorokwina należy do związków lizosomtropowych, które wykazują zdolność do neutralizowania kwaśnego środowiska w lizosomach [40]. Dzięki temu,

substancje lizosomotropowe są badane w terapiach przeciwnowotworowych pod kątem zdolności ułatwiania działania cytostatyków, ponieważ wewnątrzlizosomalne pH komórek nowotworowych jest prawie o 0,5 jednostki niższe niż w komórkach zdrowych. Po 30 min. od dodania chlorokwiny zaobserwowano wyraźny spadek ilości fluorescencyjnych sygnałów w kształcie kropek w komórkach HeLa, jak pokazano na rysunku 14c (dolny panel). Otrzymane rezultaty jednoznacznie wskazują na potencjał w zakresie wykorzystania sond typu pHSO do monitorowania dynamicznych zmian pH w lizosomach.



Rys. 14. Ilustracja odwracalnej pracy sondy pHSO_D przy cyklicznych zmianach pH (a) oraz obrazy mikroskopii konfokalnej pokazujące: umiejscowienie sondy pHSO_D (o zielonkawoniebieskiej fluorescencji) w lizosomach (barwionych na czerwono) we wnętrzu komórki (b) oraz wpływ działania chlorokwiny na pracę sondy pHSO_A (o zielonkawoniebieskiej fluorescencji) (c) [H7].

Należy pamiętać, iż jest potrzeba konstrukcji wysoce czułych i mało-inwazyjnych narzędzi do pomiarów pH w obrębie guzów (dotyczy to ich przestrzeni wewnątrz- oraz zewnątrzkomórkowej). Stąd dalekosiężnym celem mojej pracy, jest taka modyfikacja łańcucha oligonukleotydowego, aby możliwe było samorzutne wniknięcie latarni molekularnej z i-motywwem w pętli do wnętrza komórki, co udało się w przypadku sond z rodziny „I-switch” czy sond skoniugowanych z nanocząstkami złota (informacje na ten temat zebrane są w pracy przeglądowej [H9]).

Podsumowując, w wyniku badań nad sondami typu latarnie molekularne, obustronnie znakowanymi pirenem oraz zawierającymi fragment bogaty w cytozyny w pętli stwierdziłam, iż:

- tego typu latarnie molekularne mogą służyć jako sondy do pomiaru pH, dzięki składaniu się ich pętli w i-motyww, czemu towarzyszy zmiana intensywności fluorescencji pirenu,

- właściwości fluorescencyjne (wyrażone poprzez stosunek pasma emisji ekscymerowej do emisji monomerowej pirenu) tak zaprojektowanych sond zależą od składu rdzenia latarni molekularnej oraz pH otoczenia
- obecność 3 lub 4 par GC w dwuniciowym rdzeniu o długości 6 par stabilizuje i-motywy w pętli latarni molekularnej,
- obecność traktu GGG w rdzeniu latarni molekularnej wpływa niekorzystnie na jej właściwości fluorescencyjne
- ilość par GC w dwuniciowym rdzeniu o długości 6 par zasad (ogólnie mówiąc stabilność rdzenia) wpływa na punkt przejścia, zakres i precyzję pracy latarni molekularnej z i-motywy w pętli,
- latarnie molekularne z i-motywy w pętli można z powodzeniem transfekować do komórek żywych, gdzie gromadzą się w lizosomach i są w stanie efektywnie reagować na zmiany pH

W efekcie przeprowadzenia opisanych powyżej badań uzyskałam cenne wyniki, które poszerzają wiedzę na temat latarni molekularnych, co jest istotne w kontekście projektowania tego typów układów zawierających aptamer w pętli. Uzyskana wiedza na temat działania obustronnie znakowanych pirenem latarni molekularnych z i-motywy w pętli ma nie tylko charakter poznawczy, ale również aplikacyjny. Z sukcesem udało mi się wykazać, że latarnia molekularna z i-motywy w pętli ma potencjał jako sonda analityczna do monitorowania w czasie rzeczywistym zmian wewnątrzkomórkowego pH w żywych komórkach. Dalsza funkcjonalizacja tego układu, na przykład za pomocą przeciwciał, swoistych aptamerów lub nanomateriałów pozwoliłaby na uzyskanie kontrolowanego wejścia do wnętrza komórki lub kotwiczenia w błonie komórkowej.

Uważam, że następnym krokiem w rozwoju biosensorów, także tych opartych na i-motywach oraz G-kwadruksach będzie wykorzystanie ich do konstrukcji nanoplatform pozwalających na multipleksowe wykrywanie różnych analitów i jednoczesnych zastosowań teranostycznych.

Literatura:

1. J. T. Davis, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 43 (2004) 668-698.

2. S. Burge, G.N. Parkinson, P. Hazel, A.K. Todd,; S. Neidle, *Nucleic Acids Res.* 34 (2006) 5402– 5415.
3. N.V. Hud, J. Plavec (2006). In: S. Neidle (Ed.), *Quadruplex Nucleic Acids* (100–130). Royal Society of Chemistry Publishing; Cambridge UK:
4. Y. Wang, D.J. Patel, *Structure*, 1 (1993) 263-282.
5. A. Ambrus, D. Chen, J. Dai, T. Bialis, R.A. Jones, D. Yang, *Nucleic Acids Research*, 34 (2006) 2723–2735.
6. S. Neidle, M.A. Read, *Biopolymers* 56 (2000) 195–208.
7. S. Takenaka, B. Juskowiak, *Anal. Sci.* 27 (2011) 1167–1172.
8. L.C. Bock, L.C. Griffin, J.A. Latham, E.H. Vermaas, J.J. Toole, *Nature* 355 (1992) 564–566.
9. R.F. Macaya, P. Schultze, F.W. Smith, J.A. Roe, J. Feigon, *Proceedings of the National Academy of Science* 90 (1993) 3745-3749.
10. S. Nagatoishi, T. Nojima, B. Juskowiak, S. Takenaka, *Angew. Chem. Int.* 44 (2005) 5067–5070.
11. H. Hayashida, J. Paczesny, B. Juskowiak, S. Takenaka, *Bioorg. Med. Chem.*, 16 (2008) 9871-9881.
12. Y. Xu, Y. Noguchi, H. Sugiyama, *Bioorg. Med. Chem.* 14 (2006) 5584-5586.
13. J. Dai, M. Carver, D. Yang, *Biochimie* 90(8): (2008) 1172–1183.
14. B. Kierdaszuk, *Spectroscopy* 24 (2010) 399–407.
15. A. Virgilio, A. Russo, T. Amato, G. Russo, L. Mayol, V. Esposito, A. Galeone, *Nucleic Acids Research* 45 (2017) 8156–816.
16. Y.J. Seo , G.T. Hwang, , B.H. Kim, *Tetrahedron Lett.* 47(2006) 4037-4039.
17. G.T. Hwang, Y.J. Seo, B.H. Kim, *Tetrahedron Lett.* 46(2005) 1475-1477.
18. S.T. Gaballah, g. Collier, T.L. Netzel, *J. Phys. Chem. B* 109 (2005) 12175-1281.
19. Gueron, M.; Leroy, J.-L. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10 (2000) 326–331.
20. J.L. Leroy, M. Gueron, J.L. Mergny, C. Helene, *Nucleic Acids Res.* 22 (1994) 1600–1606.
21. S. Nagatoishi, T. Nojima , E. Galezowska, B. Juskowiak, S. Takenaka, *ChemBioChem* 7 (2006) 1730-1737.
22. P. Rzepecka, A. Dembska, B. Juskowiak, Eitor: J. Markoš, In *Proceedings of the 41st International Conference of SSCHE, Tatranské Matliare, Slovakia* (2014) 520–525.
23. T. Simonsson, M. Pribylova, M. Vorlickova, *Bioch. Biophys. Res. Comm.* 278 (2000) 158-166.

24. K. Guo, A. Pourpak, K. Beetz-Rogers, V. Gokhale, D. Sun, L. H. Hurley, *J. Am. Chem. Soc.*, 129 (2007) 10220-10228.
25. S. Benabou, A. Avino, R. Eritja, C. Gonzalez, R. Gargallo, R. RSC Adv. 4 (2014) 26956–26980.
26. Mergny, J.L.; Lacroix, L.; Han, X.; Leroy, J.L.; Helene, C. *J. Am. Chem. Soc.* 117 (1995) 117, 8887–8898.
27. J.J. Christensen, J.H. Rytting, R.M. Izatt, *J. Phys. Chem.* 71 (1967) 2700–2705.
28. T.A. Brooks, S. Kendrick, L. Hurley, *FEBS J.* 277 (2010) 3459–3469.
29. A. Dembska, J. Kosman, *Coll. Symp. Series*, 14 (2014) 305-307.
30. S. Tyagi, F.R. Kramer, *Nat. Biotech.* 14 (1996) 303-308.
31. S. Tyagi, F.R. Kramer, *F1000 Med. Rep.* 4 (2012) 10.
32. K. Fujimoto, H. Shimizu, M.J. Inouye, *J. Org. Chem.* 69 (2004) 3271–3275.
33. I.V. Nesterova, S.O. Elsiddieg, E.E. Nesterov, *J. Phys. Chem. B* 117 (2013) 10115-10121.
34. A.T. Jonstrup, J. Fredsoe, A.H. Andersen, *Sensors* 13 (2013) 5937-5944.
35. Y.A. Lee, A. Durandin, P.C. Dedon, N.E. Geacintov, V. Shafirovich, *J. Phys. Chem. B* 112 (2008) 1834-1844.
36. S.G. Harroun, C. Prevost-Tremblay, D. Lauzon, A. Desrosiers, X. Wang, L. Pedro, A. Vallee-Belisle, *Nanoscale* 10 (2018) 4607-4641.
37. V.I. Nesterova, E.E. Nesterov, *J. Am. Chem. Soc.* 136 (2014) 8843-8846.
38. L.M. Wilhelmsson, A. Holmen, P. Lincoln, P.E. Nielsen, B. Norden, *J. Am. Chem. Soc.* 123 (2001) 2434–2435.
39. I. Johnson & M.T.Z. Spence (Eds.). (2010). *Molecular Probes Handbook, A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies* (11th ed.).
40. C. Homewood, D. Warhurst, W. Peters, V. Baggaley, *Nature* 235 (1972) 50-52.

V. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

W roku 1994 ukończyłam 4-letnie liceum ogólnokształcące (VI LO im. I.J Paderewskiego w Poznaniu), w klasie o profilu biologiczno-chemicznym. W tym samym roku rozpoczęłam 5 letnie studia magisterskie na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza (UAM) w Poznaniu, na kierunku chemia. Od III roku studiowałam w trybie indywidualnym, dzięki czemu mogłam uczęszczać na wykłady i ćwiczenia na Wydziale Biologii UAM. Po III roku studiów, rozpoczęłam współpracę w grupie badawczej prof. UAM dr hab. Bohdana Skalskiego, w Zakładzie Fizyki Chemicznej, Wydziału Chemii UAM. Pracę magisterską zatytułowaną „Synteza 5'-trifosforanów niektórych fluoroforów nukleozydowych jako układów do fluorescencyjnego znakowania DNA metodą enzymatyczną”, wykonałam pod kierunkiem prof. UAM dr hab. Bohdana Skalskiego. W październiku 1999 roku, rozpoczęłam studia doktoranckie na Wydziale Chemii UAM, pod kierunkiem prof. UAM B. Skalskiego. Stopień doktora nauk chemicznych w zakresie chemii, uzyskałam w lutym 2005 podczas publicznej obrony pracy doktorskiej zatytułowanej „Synteza, fotochemia i właściwości fluorescencyjne pochodnych purynowych zawierających w cząsteczce ugrupowanie pirydyniowe.” Celem pracy doktorskiej było: (1) otrzymanie nowych pochodnych N-purynylo-pirydyniowych, zawierających w pozycji 2 pierścienia purynowego podstawniki tj.: metoksyłowy, hydroksyłowy, halogenowy (F, Cl), fenyłowy oraz (2) sprawdzenie ich podatności na przekształcenie fotochemiczne do pochodnych luminarozyny, pod wpływem naświetlania promieniowaniem o długości fali > 300 nm. Część badań wchodzących w skład pracy doktorskiej została opublikowana w pracy zatytułowanej „Solvatochromism of a Novel Betaine Dye Derived from Purine” (zał. 2. poz. II.A.[8]).

W okresie tuż po obronie doktoratu do czasu zatrudnienia na stanowisku adiunkta na UAM, pracowałam jako wolontariusz, w Instytucie Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu, chcąc zapoznać się z techniką PCR oraz QPCR.

Od 1 października 2005 roku do 30 września 2006 roku pracowałam na stanowisku adiunkta w Zakładzie Fizyki Chemicznej na Wydziale Chemii UAM w Poznaniu. Uczestniczyłam wówczas w pracach badawczych dotyczących reakcji fotochemicznych 6-azydonebularyny i 6-azydo-9-metylopuryny oraz reakcji fotochemicznych 5-chloro-4-tiourydyny z nukleozydami. W pierwszym projekcie, 6-azydo-9-metylopurynę oraz 6-azydonebularynę poddałam naświetlaniu promieniowaniem o długości fali, $\lambda \geq 300$ nm. W obu przypadkach zaobserwowałam powstawanie mieszaniny fotoproduktów podobnej pod względem jakościowym, lecz różnej pod względem ich dystrybucji. W oparciu o widma

NMR zaproponowano strukturę powstałego fotoproduktu, charakteryzującego się widmem absorpcji z maksimum około 370 nm. Celem uzyskania więcej informacji dotyczących mechanizmu reakcji prowadzącej do zaproponowanej struktury, powtórzono syntezę wychodząc z [¹⁵N]-1-inozyny. Dodatkowo, znakowanie azotem [¹⁵N] pozwoliło na badanie równowagi pomiędzy dwoma formami tautomerycznymi 6-azydonebularyny w roztworze (zał. 2. poz. II.A.[7]). Wyniki tych badań zostały zaprezentowane na konferencji (zał. 2. poz. III.B.[54]) oraz część weszła w skład 1 publikacji (zał. 2. poz. II.A.[7]). W drugim projekcie, uczestniczyłam w badaniach nad reaktywnością fotochemiczną 5-chloro-4-tiourydyny wobec naturalnych nukleozydów tj. adenozyne, guanozyna, cytydina, urydina oraz tymidyna, podczas naświetlania promieniowaniem o długości fali 366 nm (w odtlenionych roztworach wodnych). Stwierdzono, iż 5-chloro-4-tiourydyna reaguje z dużą wydajnością jedynie z tymidyną, tworząc dwa silnie fluoryzujące fotoprodukty. Otrzymane fotoprodukty zidentyfikowano jako dwa diastereoizomeryczne fotocykloaddukty, identyczne z otrzymanymi podczas naświetlania 5-fluoro-4-tiourydyny w obecności tymidyny. Rezultaty tych badań zostały zaprezentowane na konferencji (zał. 2. poz. III.B.[56]) i weszły w skład 1 publikacji (zał. 2. poz. II.A.[4]).

Następnie od 1 października 2006 zostałam zatrudniona na stanowisku adiunkta w grupie badawczej prof. dr hab. Bernarda Juskowiaka, która to grupa w 2007 roku wyodrębniła się jako Pracownia Chemii Bioanalitycznej na Wydziale Chemii UAM w Poznaniu.

Od tego czasu moja praca naukowa zalicza się do nurtu badań skoncentrowanych na tworzeniu inteligentnych narzędzi bioanalitycznych, bazujących na elementach strukturalnych kwasów nukleinowych, w szczególności takich sekwencji DNA, które są zdolne do formowania w odpowiednich warunkach struktur czteroniciowych (tj. G-kwadrupeksów oraz i-motywów). Jestem autorem/współautorem **17** artykułów naukowych (z wyłączeniem komunikatów i streszczeń konferencyjnych), z których 16 znajduje się na liście Journal Citation Reports. Łączna liczba punktów MNiSW₂₀₁₆ wynosi **465**, a sumaryczny Impact Factor **44,71**. Moje prace były do tej pory cytowane 208 razy, z czego 192 bez autocytowań. Indeks Hirscha* wynosi **8**. Za osiągnięcia w pracy naukowej zostałam wyróżniona nagrodą zespołową III stopnia przez Rektora Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu w 2011 roku, 2016 roku oraz 2017 roku. Szczegółowy wykaz wszystkich moich prac naukowych,

* obliczając Indeks Hirscha uwzględniono prace pod nazwiskiem rodzinnym Masternak

informacje o referatach i posterach prezentowanych na konferencjach tematycznych oraz o udziale w realizacji projektów badawczych oraz informacja o działalności organizatorskiej i dydaktycznej został przedstawiony w Załączniku 2.

W październiku 2007 roku wyjechałam na czteromiesięczny staż badawczy w Nuclear Physics Institute, Lund University, w Szwecji; w ramach międzynarodowego projektu CELLION MRTN-CT-2003-503923 (2004/2008); finansowanego w 6 Programie Ramowym Unii Europejskiej jako Sieć Badawczo-Treningowa (Marie Curie Action: Research Training Network, MC RTN). Podczas tego pobytu w ramach realizacji programu badań radiobiologicznych uczestniczyłam w eksperymentach z naświetlaniem żywych komórek za pomocą precyzyjnie zlokalizowanej i bardzo dobrze kontrolowanej ilościowo wiązki pojedynczych jonów. Celem tych badań była obserwacja, czy komórki, które nie były poddane bezpośredniemu działaniu wiązki jonów będą wykazywały tzw. efekt widza (ang. *bystander effect*) indukowany przez medium. Moim zadaniem było przygotowanie hodowli komórkowych, rozmieszczenie komórek na specjalnie zaprojektowanych płytkach tak, iż komórki rosły w konkretnych miejscach, odizolowane od siebie. Następnie wykonywałam i analizowałam zdjęcia pod mikroskopem przed i po naświetlaniu komórek. Rezultaty tych badań zostały zaprezentowane na konferencji (zał. 2. poz. III.B.[50]) i opublikowane (zał. 2. poz. II.A.[5]).

Po powrocie ze Szwecji, zaangażowałam się w projekt dotyczący pomiarów czasów życia G-kwadruksów na bazie ludzkiego telomerowego DNA oraz TBA, co zaowocowało kilkoma komunikatami na konferencjach (zał. 2. poz. III.B.[41]-[42] oraz [45]-[46]) oraz 3 publikacjami (w tym prace [H1] i [H2]). Początkowo badania w ramach tego projektu były wykonywane we współpracy z prof. S. Takenaką (Kyotushu University, Fukuoka, Japonia) oraz dr. hab. Tomaszem Pędzińskim (Zakład Fizyki Chemicznej, UAM) (zał. 2. poz. II.A.[3]). Dodatkowo, celem podwyższenia umiejętności z technik czasowo-rozdzielczej fluorescencji, wzięłam udział w kursie „Principles and Applications of Time-resolved Fluorescence Spectroscopy”; organizowanym przez PicoQuant GmbH w Berlinie. W międzyczasie aktywnie starałam się o uzyskanie finansowania moich badań dotyczących fluorescencyjnych sond na bazie i-motywów (w latach 2008-2010 złożyłam 5 wniosków do MNiSzW).

Od 1 lutego 2010 do 31 sierpnia 2011 przebywałam na stażu podoktorskim w grupie badawczej prof. B. Armitage w Carnegie Mellon University (Pittsburgh) w USA. Uczestniczyłam tam w projekcie tzw. „DNA Nanotag”, którego jednym z celów było uzyskanie fotostabilnych, mocno świecących nanostruktur DNA. Jednym z moich zadań była optymalizacja syntezy prowadzącej do uzyskania sondy, znakowanej równocześnie kilkoma

interkalatorami tj. TO (ang. *thiazole orange*), przy wykorzystaniu tzw. chemii “click”, a konkretnie reakcji 1,3-dipolarnej cykloaddycji Huisgena katalizowanej jonami Cu (I) (reakcja CuAAC). Podczas swojego stażu, opanowałam także syntezę krótkich sond fluorescencyjnych na bazie szkieletu PNA (ang. *Peptide Nucleic Acid*). Sondy na bazie PNA są atrakcyjną alternatywą do oligonukleotydowych sond wykorzystujących łańcuch DNA czy RNA, zaś niewiele grup badawczych w Polsce zajmuje się syntezą PNA. Otrzymałam szereg krótkich sond (4-6-merowych) na bazie szkieletu PNA (tzw. miniPNA) oraz gammaPNA (tzw. g-miniPNA) znakowanych na N-końcu różnymi pochodnymi barwnika TO. Oprócz syntezy zajmowałam się charakterystyką spektroskopową otrzymanych sond, która obejmowała rejestrację ich widm MALDI TOF, absorpcji i fluorescencji oraz wyznaczenie wydajności kwantowych. Ponadto analizowałam profile topnienia otrzymanych układów, między innymi dupleksów DNA/DNA oraz DNA/PNA. Stwierdziłam, iż (a) długość linkera oraz miejsce jego przyłączenia do szkieletu TO ma wpływ na właściwości fluorescencyjne układu DNA/PNA; (b) wydajność zjawiska FRET między wybranymi sondami miniPNA (znakowanymi TO (donor) oraz jego pochodną TO-3 (akceptor)) zależy od ich ułożenia na matrycy DNA (ułożenie typu AABBA lub ABABAB). Zaprojektowałam modelowy system 3WJ (ang. *three way junction*) do wykrywania oligonukleotydów o konkretnej sekwencji, gdzie dwa ramiona 3WJ są utworzone przez tandemowe DNA i sondy miniPNA, między którymi zachodzi zjawisko FRET. Wyniki moich badań zaprezentowałam podczas wystąpienia na konferencji Photochemistry Gordon-Kenan RS w 2011 roku, a część weszła w skład 2 publikacji (zał. 2. poz. II.A.[1] oraz [2]).

W międzyczasie uzyskałam środki na realizację własnego projektu badawczego, którego byłam kierownikiem, zatytułowanego: „Fluorescencyjne sondy oligonukleotydowe znakowane pirenem czułe na zmiany pH” (Nr. Rej. N N204 220040); który uzyskał finansowanie w 40 konkursie Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MNiSzW). Najważniejsze publikacje powstałe w wyniku prac naukowo-badawczych wykonanych w ramach niniejszego grantu zostały ujęte w cyklu prac habilitacyjnych ([H3], [H4], [H5]). Ponadto, w ramach tych prac nawiązałam współpracę badawczą z dr. hab. Elżbietą Kierzek (IChB PAN, Poznań) oraz dr. A. Fedoruk-Wyszomirską (IChB PAN, Poznań).

W ramach projektu KNOW - Poznańskie Konsorcjum RNA, wygłosiłam w dniu 6 lutego 2015 (wraz z dr. Joanną Kosman) wykład pt. „Bioanalytical applications of i-motifs and G-quadruplexes”.

Przygotowałam wniosek grantowy zatytułowany „Znakowane pirenem sondy molekularne zbudowane z dwóch zintegrowanych części: i-motywu oraz latarni

molekularnej” (kierownik projektu: prof. dr hab. B. Juskowiak; numer: UMO-2015/17/B/ST4/03627). Grant ten został zakwalifikowany w konkursie OPUS 8 do finansowania i jest obecnie realizowany przeze mnie jako głównego wykonawcę we współpracy z dr hab. E. Kierzek (IChB PAN, Poznań), dr A. Fedoruk-Wyszomirską (IChB PAN, Poznań), prof. dr hab. J. Gapińskim (Wydział Fizyki, UAM, Poznań) oraz dr hab. B. Rubisiem (Uniwersytet Medyczny, Poznań). Właśnie w ramach tego projektu studiowałam wpływ stabilności dwuniciowego rdzenia na właściwości obustronnie znakowanych pirenami latarni molekularnych z i-motywwem w pętli [H7]. Dzięki współpracy z dr hab. E. Kierzek oraz dr A. Fedoruk-Wyszomirską, udało się udowodnić, iż otrzymane przeze mnie sondy typu latarni molekularnych z i-motywwem w pętli są trwałe *in cellulo* oraz emitują fluorescencję obserwowaną pod mikroskopem konfokalnym [H7]. Warto wspomnieć, że celem podwyższenia kompetencji w tej technice wzięłam udział w kursie „Principles and Applications of Time-resolved Fluorescence Spectroscopy” organizowanym przez PicoQuant GmbH w Berlinie.

Obecnie kontynuuję ten kierunek studiów, gdyż badam właściwości latarni molekularnych obustronnie znakowanych pochodnymi pirenu, zawierającymi i-motywwem w pętli i dwuniciowy rdzeń zbudowany z jednostek 2'OMe RNA. Ponadto, w ramach realizacji w/w grantu opiekuję się dwoma studentkami, które pod moim kierunkiem otrzymały szereg latarni molekularnych z i-motywwem w pętli znakowanych pirenem/pirenami na obu końcach nici lub w pętli. Odpowiednio funkcjonalizowane oligonukleotydy były sprzęgane z azydkiem pirenu z wykorzystaniem reakcji typu „click”, zarówno katalizowanej jonami miedzi (CuAAC), jak i bez udziału katalizatora (ang. *Strain-Promoted Azide - Alkyne Click Chemistry*, SPAAC). Wyniki dotyczące tej części badań zostały zaprezentowane na konferencjach (zał. 2. poz. III.B.[1], [3], [4] i [7].) i są przygotowywane do publikacji. Ponadto, w ramach współpracy z dr. hab. B. Rubisiem wykonywane są badania dotyczące możliwości wykorzystania i-motywwów oraz latarni molekularnych z i-motywwem w pętli jako sond fluorescencyjnych do monitorowania zmian w metabolizmie komórek nowotworowych (MCF7 i MDA-MB231), wywołanych działaniem wybranego leku (doksorubicyna). Spodziewamy się, iż w efekcie końcowym ulegnie zmianie pH płynu wewnątrzkomórkowego, co wpłynie na zmianę sygnału fluorescencyjnego sond na bazie i-motywwów.

W ramach dalszych prac badawczych zamierzam kontynuować badania związane z opracowaniem i optymalizacją zestawu sond do pomiarów zewnątrz- i wewnątrzkomórkowych opartych na sekwencjach G-kwadrupleksów oraz i-motywwów, w tym także DNazymów. Prace badawcze chciałabym poszerzyć o użycie takich technik jak

spektroskopia korelacji fluorescencji (FCS) czy mikroskopia obrazowania czasów życia fluorescencji (FLIM).

Równoległe oprócz pracy badawczej byłam zaangażowana w organizację i prowadzenie dydaktyki na Wydziale Chemii UAM – szczegółowe informacje na ten temat zawarte są w załączniku 2.

Poniżej zebrałam w punktach dane bibliometryczne dotyczące mojego dorobku publikacyjnego do dnia 28.02.2018, który obejmuje 31 pozycji, w tym:

- 16 publikacji w czasopismach naukowych (wykaz A Ministra MNiSW i/lub lista ERIH / JCR)
- 1 publikację w pozostałych czasopismach naukowych
- 6 monografii lub rozdziałów w monografiach
- 8 komunikatów naukowych

Sumaryczna liczba punktów MNiSW₂₀₁₆:

- liczba punktów przed uzyskaniem stopnia doktora: **30**
- liczba punktów po uzyskaniu stopnia doktora: **425**

Sumaryczny Impact Factor według listy JCR, zgodnie z rokiem opublikowania: **44,71**

- IF przed uzyskaniem stopnia doktora: **2,898**
- IF po uzyskaniu stopnia doktora: **41,813**

Liczba cytowań według:

- bazy Web of Science (WoS)** : **208**
- bazy Scopus: **205**

Indeks Hirscha* według:

- bazy Web of Science: **8**
- bazy Scopus: **7**

Anna Dembska

Poznań, 15 marca 2018

** praca [H8] jest błędnie indeksowana w bazie WoS, co zostało zgłoszone do korekty

* obliczając Indeks Hirscha uwzględniono prace pod nazwiskiem rodzonym Masternak