

Streszczenie

Rozprawa doktorska poświęcona została problematyce zmodyfikowanych układów G-kwadrupeks/hemina jako nowych DNAzymów o aktywności peroksydazowej. Ponieważ niezmodyfikowane DNAzy wykazują niższą aktywność katalityczną niż zwyczajowo używana w diagnostyce medycznej peroksydaza chrzanowa (HRP), wciąż poszukuje się nowych strategii modyfikacji tych katalizatorów w celu poprawienia ich zdolności katalitycznych. Przedstawione w pracy badania skupiają się na dwóch rodzajach modyfikacji tych układów. Jedną ze strategii było kowalencyjne przyłączenie heminy do oligonukleotydu, które miało na celu zniwelowanie sygnału analitycznego pochodzącego od próby referencyjnej w potencjalnych biosensorach opartych na DNAzymach, ponieważ w przypadku niekowalencyjnych układów obecna w tej próbie jest hemina, która posiada niewielką aktywność peroksydazową zwiększając sygnał tła. Modyfikacja ta miała również na celu zwiększenie stabilności temperaturowej DNAzymu oraz poprawę siły oddziaływań między heminą a G-kwadrupeksem, a co za tym idzie również zwiększenie aktywności peroksydazowej. Drugim typem modyfikacji było przyłączenie do oligonukleotydu kropki kwantowej jako generatora reaktywnych form tlenu. Modyfikacja ta miała na celu uniknięcie dodatku nadtlenu wodoru do medium reakcyjnego oraz możliwość przeprowadzenia reakcji indukowanej światłem wobec odpowiednich substratów organicznych.

Kowalencyjne przyłączenie heminy przeprowadzona na trzech sekwencjach (PS2.M, CatG4 i HT22) w różnych wariantach długości łącznika oraz pozycji przyłączenia heminy do oligonukleotydu (koniec 5', 3' oraz wewnątrz pętli G-kwadrupeksu). Modyfikacji większości badanych koniugatów dokonano z wykorzystaniem bezmiedziowej reakcji chemii „click”. Otrzymane produkty scharakteryzowano metodami spektroskopowymi (UV-Vis, spektroskopia CD) w celu określenia topologii stabilności temperaturowej G-kwadrupeksów oraz wyznaczenie stałej dysocjacji (pKa) cząsteczki wody skoordynowanej w pozycji aksjalnej heminy. Przeprowadzono reakcje peroksydacji z wykorzystaniem otrzymanych katalizatorów wobec trzech substratów (ABTS, Amplex Red i MNBDH) w celu określenia ich aktywności katalitycznej oraz selektywności wobec badanych indykatorów. Przeprowadzone badania pozwoliły na ocenę wpływu długości łącznika oraz pozycji przyłączenia na strukturę i aktywność katalityczną DNAzymu.

Przyłączenie oligonukleotydu do powierzchni kropki kwantowej przeprowadzona została z wykorzystaniem reakcji amidowania między kropką kwantową sfunkcjonalizowaną grupami karboksylowymi (CdTe@COOH) oraz oligonukleotydem zmodyfikowanym grupą heksyloaminową (CatG4-NH₂) z użyciem EDC i NHS jako odczynników sprzęgających. Otrzymane produkty scharakteryzowano transmisyjną mikroskopią elektronową, elektroforezą agarozową oraz metodami spektroskopowymi (UV-Vis, CD, fluorescencja, DLS) oraz zbadano właściwości katalityczne w reakcji oksydacji z udziałem generowanych reaktywnych form tlenu przez kropkę kwantową wobec substratów Amplex Red i ABTS. Przeprowadzone badania pozwoliły na ocenę wpływu kowalencyjnego przyłączenia DNA do QD na aktywność oksydacyjną układu QD-DNAzym oraz zbadanie możliwości przeprowadzenia reakcji oksydacji kontrolowanej światłem.