

Název: **Interakce iontů kovu s nukleovými kyselinami jako  
základ pro G-kvadruplexy tvořící biosenzory**

Školitel: Branislav Ruttkay-Nedecký,

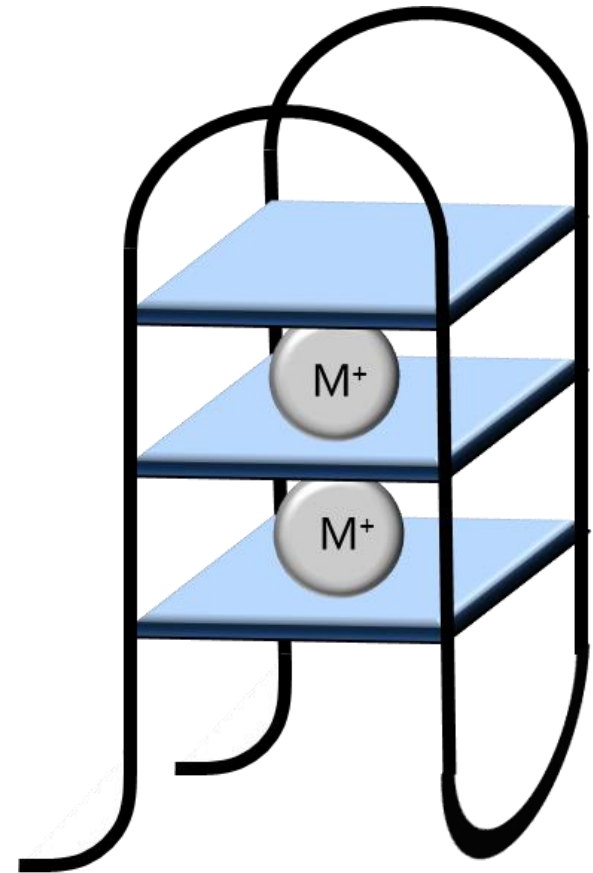
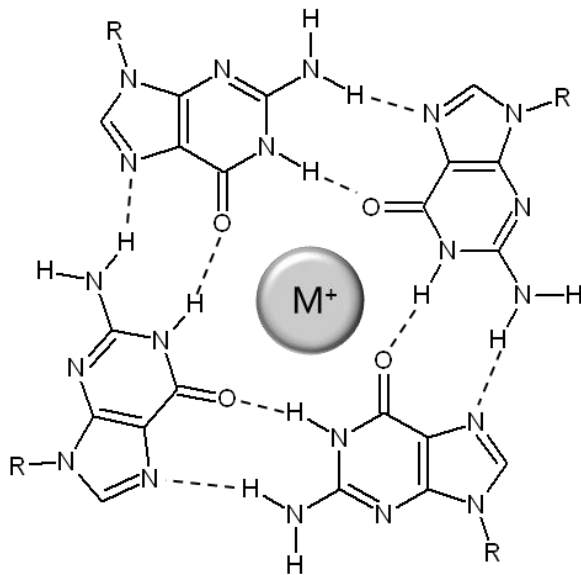
Datum: 6.9.2013

# DNA

- Dynamická molekula
- Vlášeny, homoduplexy, triplexy, kvadruplexy
- Struktury známé desítky let
- Zpočátku malé praktické využití
- Struktury jsou pravděpodobně formovány za fyziologických podmínek – zapojení do mnoha důležitých biologických procesů (genová exprese, rekombinace, replikace DNA)
- Řetězce bohaté purinovými bázemi mohou tvořit řadu konformací
- Nejznámějšími konformacemi jsou guaninové kvadruplexy – G-kvadruplexy

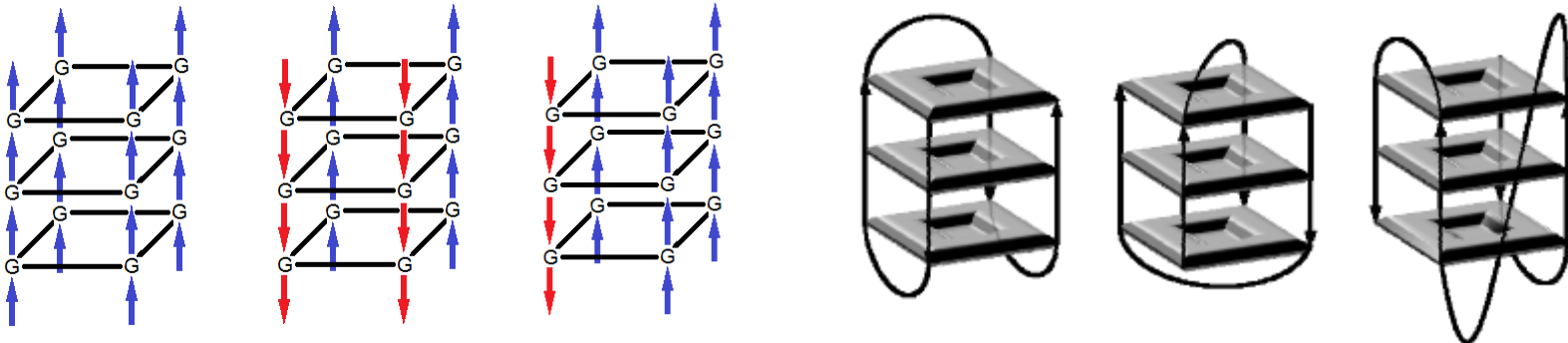
# G-kvadruplexy

- Složené se z guaninových tetrád tvořenými čtyřmi guaninovými bázemi
- Každý guanin je se sousedním guaninem spojen přes dva vodíkové můstky Hoogsteenovým párováním
- G-kvadruplex tvoří několik guaninových tetrád uspořádaných nad sebou
- G-quadruplexy jsou stabilizovány ionty alkalických kovů ( $K^+$ ,  $Na^+$ ), které se nachází mezi dvěma G-tetrádami



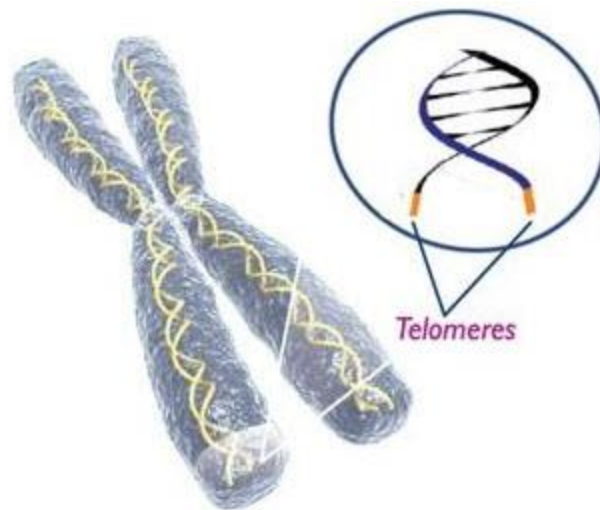
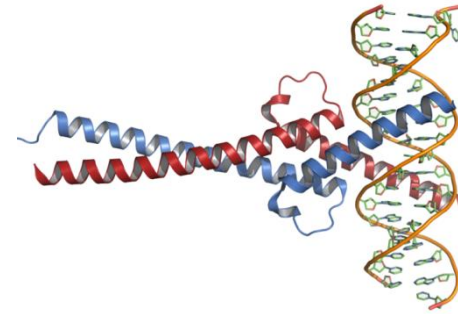
# Kvadruplexy - dělení

- Značný konformační polymorfismus
- Podle počtu molekul – tetramolekulární, bimolekulární, unimolekulární
- Polarita řetězce – paralelní, antiparalelní, smíšený (hybridní)
- Postavení smyček – postranní (židličková), diagonální (košíčková), vrtulovitá smyčka



# Výskyt G-kvadruplexů

- V genomové DNA
- Telomery
- Oblasti imunoglobulinů
- Genové promotory

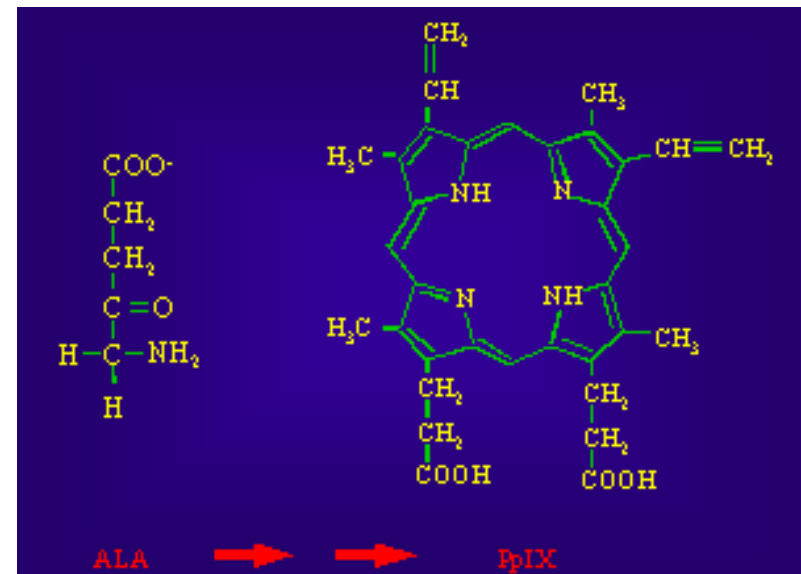
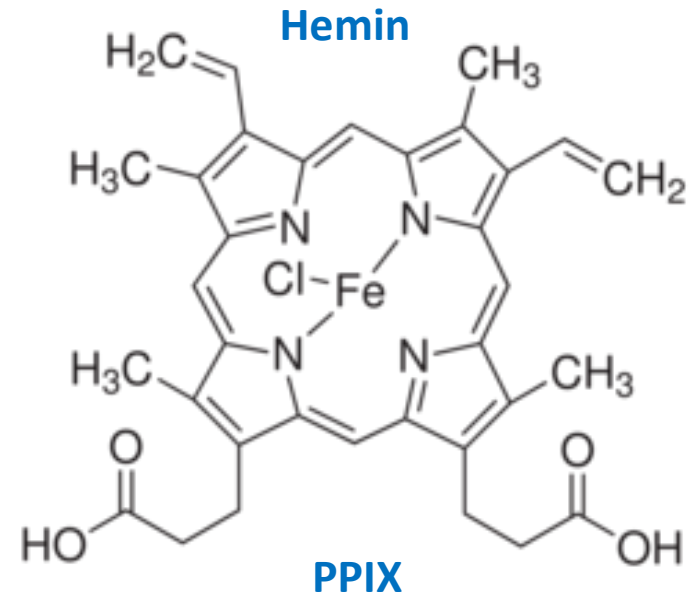


# Metody pro studium G-kvadruplexů

- UV-VIS spektrofotometrie
- CD polarimetrie (Circular Dichroism)
- Molekulová luminiscence pro fluorescenčně značené sekvence
- FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)
- Rentgenová krystalografie
- NMR spektroskopie (Nuclear Magnetic Resonance)
- Mikroskopie atomárních sil (AFM)

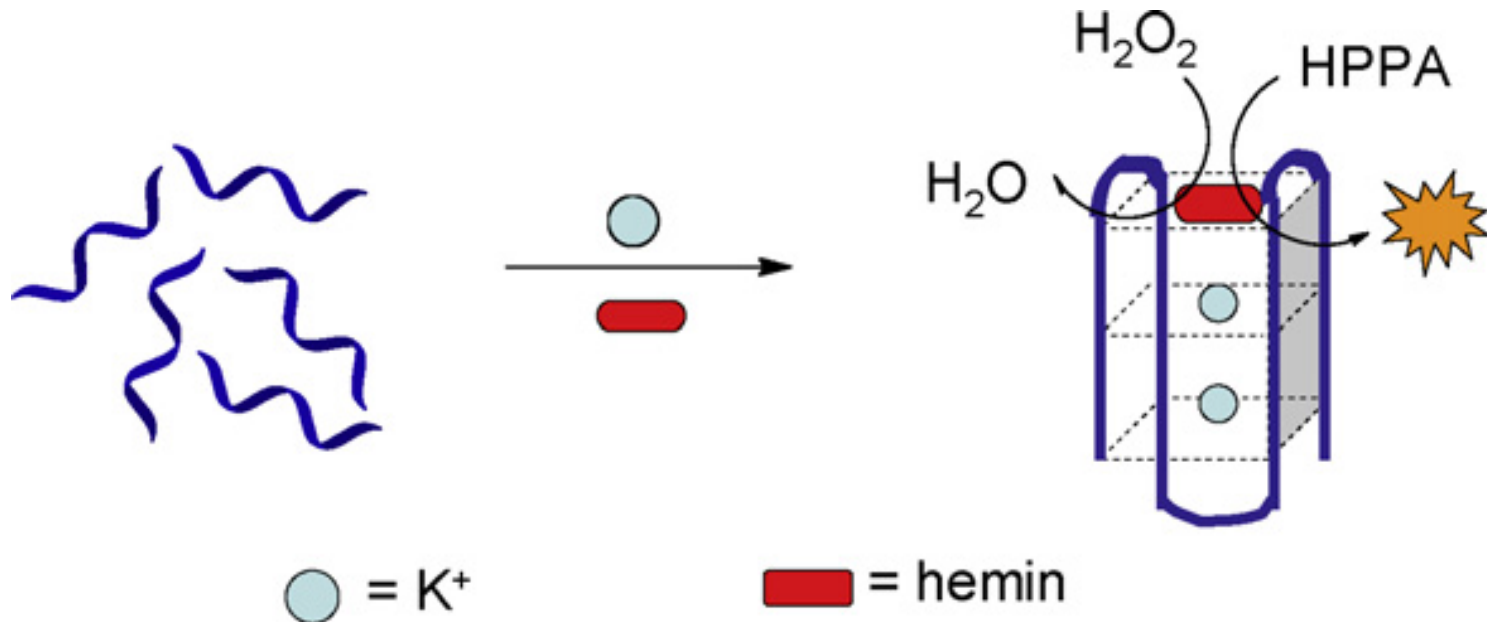
# G-kvadruplexy – detektory kovů

- G-kvadruplexy (G4) tvoří komplexy s aniontovými porfyriny heminem, N-methylmesoporfyrinem IX (NMM) protoporfyrinem IX (PPIX)
- G4/hemin, vykazuje peroxidázovou aktivitu – proto jsou to DNAzy
- Katalyzují oxidaci ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) diammonium salt) prostřednictvím  $H_2O_2$
- Výsledkem je barevná změna roztoku a lze ji spektrofotometricky stanovit
- G4/PPIX, fluorescence
- Detekce of –  $K^+$ ,  $Ag^+$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  (Fan et al. 2012, Li H. et al. 2012, Li T. et al. 2008, 2009, 2010, Wang et al. 2010, Zhou et al. 2010).



# Detekce $K^+$

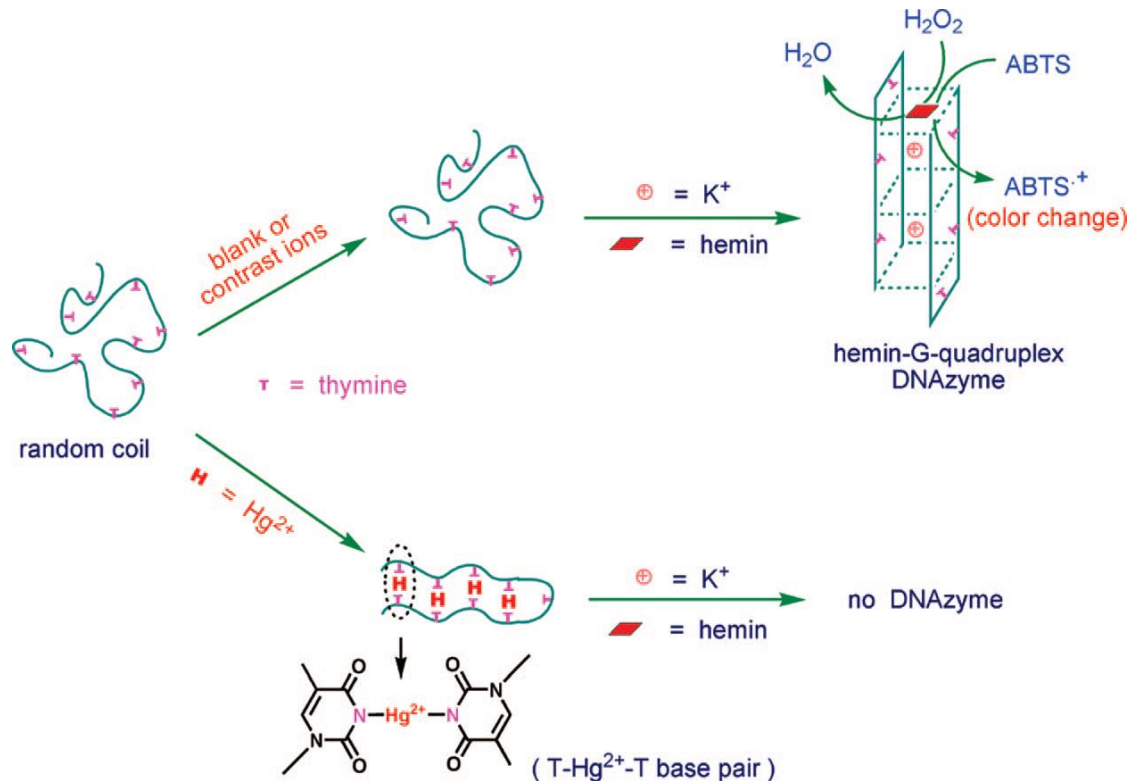
- G-kvadruplex v komplexu s heminem
- Detekce  $K^+$  podle Fan et al. 2012
- $K^+$  stabilizují jednořetězcovou DNA se sekvencí bohatou na guanin
- V přítomnosti  $K^+$  se vytvoří G-kvadruplexová struktura + poté se na ni může vázat hemin
- 3-(p-hydroxyfenyl)-propionová kyselina (HPPA) je oxidována  $H_2O_2$  na fluorescenční product
- Intenzita fluorescence HPPA oxidačního produktu roste se zvyšující se koncentrací  $K^+$





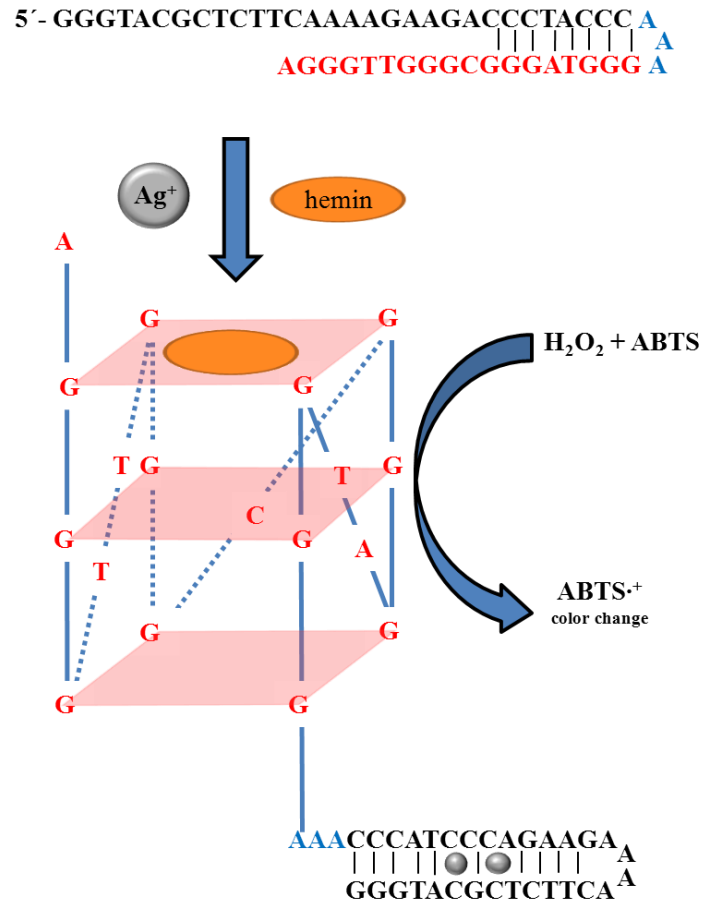
# Detekce $\text{Hg}^{2+}$

- G-kvadruplex v komplexu s heminem
- Detekce  $\text{Hg}^{2+}$  podle Li et al. 2009
- $\text{Hg}^{2+}$  se váže specificky na thymin-thymin (T-T) (chybné párování) mismatch v DNA duplexu
- Na G-bohatá DNA vytváří přítomnosti draselných iontů G-kvadruplex a je schopná vázat hemin a vykazuje peroxidázovou aktivitu - DNAzym
- Po přidání  $\text{Hg}^{2+}$ , je vznik G-kvadruplexu inhibován v důsledku tvorby T- $\text{Hg}^{2+}$ -T komplexu
- Výsledkem  $\text{Hg}^{2+}$  inhibice je prudký pokles v katalytické aktivitě, v  $\text{H}_2\text{O}_2$  zprostředkované oxidaci ABTS



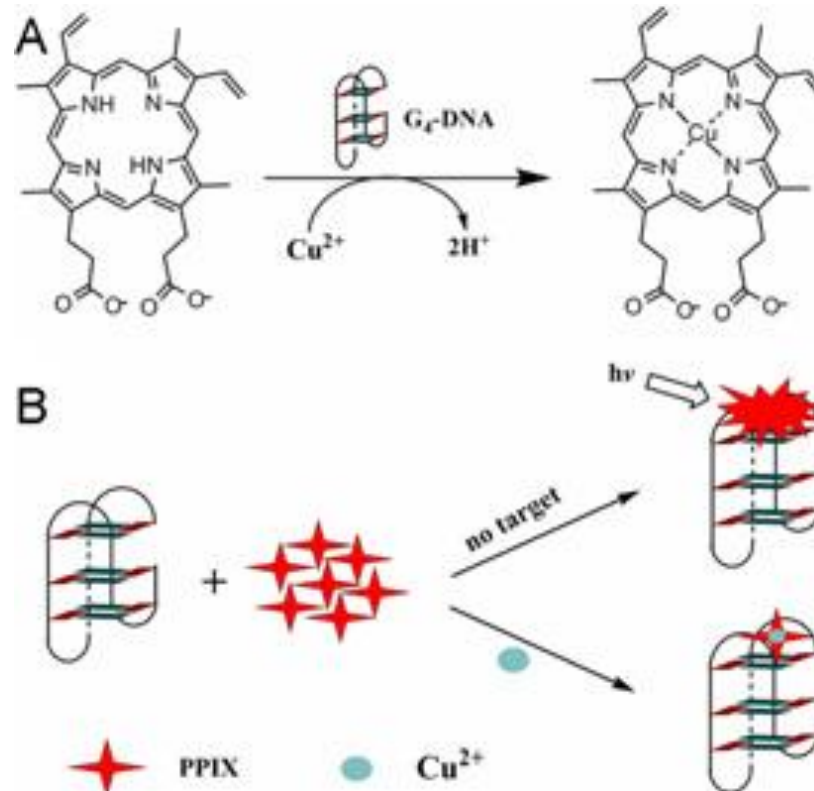
# Detekce Ag<sup>+</sup>

- G-kvadruplex v komplexu s heminem
- Detekce Ag<sup>+</sup> podle Zhou et al. 2010
- Ag<sup>+</sup> stabilizuje cytosin-cytosin (C–C) mismatch (chybné párování) tím, že sprostředkuje jejich vazbu C–Ag<sup>+</sup>–C
- Bez Ag<sup>+</sup>, oligonukleotidové vlákno vytváří intramolekulární duplex
- Po přidání Ag<sup>+</sup> na guanin bohaté sekvenční se složí do G-kvadruplexu, který váže hemin a vykazuje katalyticky aktivní DNAzym, který je možné detekovat spektrofotometricky.
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxiduje ABTS na ABTS<sup>•+</sup> a bezbarevný roztok se mění na modrozelený, který lze spektrofotometricky stanovit



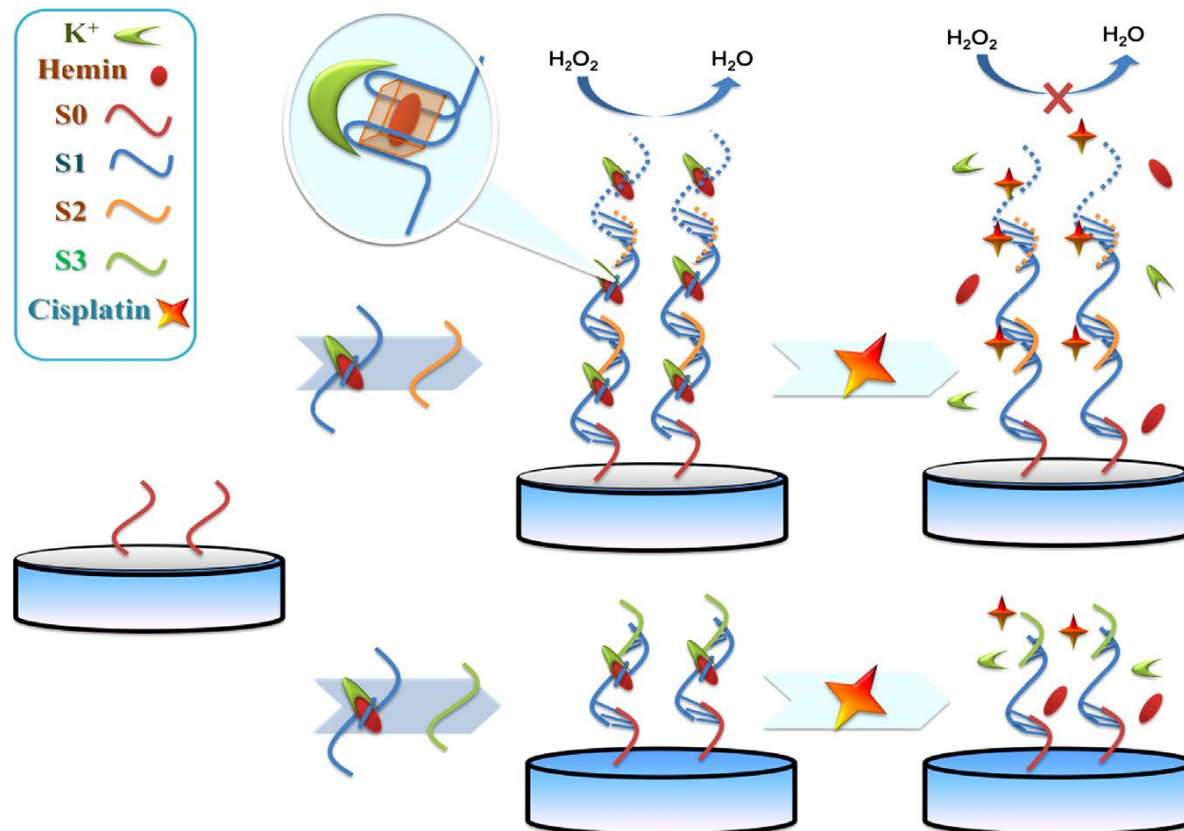
# Detekce $\text{Cu}^{2+}$

- G-kvadruplex v komplexu s protoporphyrinem IX (PPIX)
- Detekce  $\text{Cu}^{2+}$  podle Zhang et al. 2013
- G-kvadruplex/PPIX intenzita fluorescence se zvyšuje
- V přítomnosti  $\text{Cu}^{2+}$  intenzita fluorescence se snižuje
- Metoda se ukázala být vysoce specifickou



# Elektrochemická detekce cisplatiny

- G-kvadruplex v komplexu s heminem
- Detekce cisplatiny podle Wang et al. 2013
- Tiolovaná ssDNA (S0) se přichytí na Au elektrodě, S1 v přítomnosti  $K^+$  vytvoří G-kvadruplex, naváže hemin a váže se na S2 a peroxidázovou aktivitou se  $H_2O_2$  redukuje na  $H_2O$ , za vzniku elektrochemického signálu
- Cisplatina naruší tvorbu G-kvadruplexu a dochází ke snížení elektrochemického signálu



# Souhrn

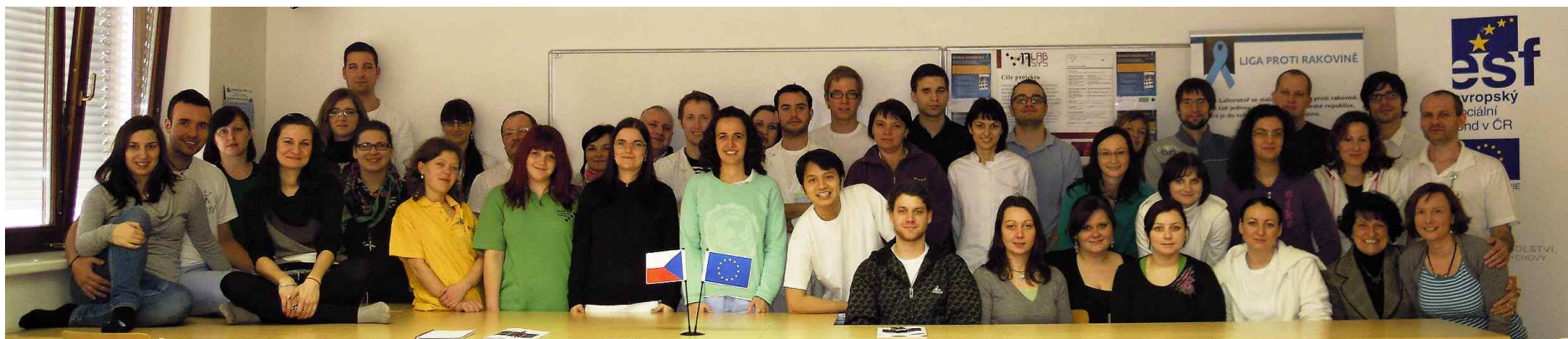
- G-kvadruplexy lze využít jako detektory těžkých kovů
- Kromě těžkých kovů lze také G-kvadruplexy využít k detekci dalších analytů, například aminokyselin, DNA, mikro RNA, cisplatiny, glukózy, cholesterolu a GMO
- Základem detekce pomocí G-kvadruplexů je DNA konformační změna, která je vyvolaná přítomností analytu což má za následek snížení anebo zvýšení peroxidázové aktivity, fluorescence anebo electrochemického signálu použitých sond
- Ve srovnání s jinými detekčními metodami, je detekce s využitím G-kvadruplexů mnohem jednodušší, rychlejší, citlivější a méně nákladná bez drahých nástrojů a fluorescenčně značených oligonukleotidů
- Často zkoumaný materiál může být detekován ve velmi nízkých koncentracích
- G-kvadruplexy se tak v poslední době stávají stále populárnějším detekčním systémem

# Literatura

- Chen, C., et al., *Enzymatic Manipulation of DNA-Modified Gold Nanoparticles for Screening G-Quadruplex Ligands and Evaluating Selectivities*. *Advanced Materials*, 2010. **22**(3): p. 389-393.
- Fan, X.Y., et al., *A novel label-free fluorescent sensor for the detection of potassium ion based on DNAzyme*. *Talanta*, 2012. **89**: p. 57-62.
- Li, H., et al., *G-quadruplex-based ultrasensitive and selective detection of histidine and cysteine*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2013. **41**(0): p. 563-568.
- Li, R., et al., *Colorimetric detection of cholesterol with G-quadruplex-based DNAzymes and ABTS2-*. *Analytica Chimica Acta*, 2012. **724**(0): p. 80-85.
- Li, T., E. Wang, and S. Dong, *G-quadruplex-based DNAzyme for facile colorimetric detection of thrombin*. *Chemical Communications*, 2008. **0**(31): p. 3654-3656.
- Li, T., S. Dong, and E. Wang, *Label-Free Colorimetric Detection of Aqueous Mercury Ion (Hg<sup>2+</sup>) Using Hg<sup>2+</sup>-Modulated G-Quadruplex-Based DNAzymes*. *Analytical Chemistry*, 2009. **81**(6): p. 2144-2149.
- Li, T., E. Wang, and S. Dong, *Lead(II)-Induced Allosteric G-Quadruplex DNAzyme as a Colorimetric and Chemiluminescence Sensor for Highly Sensitive and Selective Pb<sup>2+</sup> Detection*. *Analytical Chemistry*, 2010. **82**(4): p. 1515-1520.
- Qiu, B., et al., *A novel fluorescent biosensor for detection of target DNA fragment from the transgene cauliflower mosaic virus 35S promoter*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2013. **41**(0): p. 168-171.
- Wang, G.; He, X.; Chen, L.; Zhu, Y.; Zhang, X.; Wang, L., *Conformational switch for cisplatin with hemin/G-quadruplex DNAzyme supersandwich structure*. *Biosens. Bioelectron.* 2013, **50**, 210-216.
- Zhang, L., et al., *Label-free G-quadruplex-specific fluorescent probe for sensitive detection of copper(II) ion*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2013. **39**(1): p. 268-273.
- Zhou, X.-H., D.-M. Kong, and H.-X. Shen, *G-quadruplex-hemin DNAzyme-amplified colorimetric detection of Ag<sup>+</sup> ion*. *Analytica Chimica Acta*, 2010. **678**(1): p. 124-127.

# Poděkování

Děkuji kolegům a za finanční podporu projektům CEITEC CZ.1.05/1.1.00/02.0068 , Nanobiotecel a NanoBioMetalNet



central european institute of technology  
BRNO | CZECH REPUBLIC

# Děkuji za pozornost.

