

POPULARNONAUKOWE STRESZCZENIE PROJEKTU

W ciągu zaledwie jednego dnia DNA pojedynczej komórki może zostać uszkodzone nawet kilkadziesiąt tysięcy razy. Na szczególną uwagę zasługują uszkodzenia oksydacyjne (powodowane przez reaktywne formy tlenu, głównie rodniki hydroksylowe) powstałe w wyniku stresu oksydacyjnego, który ma znacznie w wielu chorobach cywilizacyjnych takich jak miażdżyca, choroba Alzheimera czy Parkinsona. W wyniku uszkodzeń DNA: 1) struktura chemiczna zasad purynowych i pirymidynowych może ulec zmianie, ii) tworzą się wiązania kowalencyjne pomiędzy sąsiednimi zasadami tzw. dimery pirymidynowe, iii) wiązania grup fosforanowych w szkieletcie DNA mogą ulegać przerwaniu, co prowadzi do pęknięć jednej lub obu nici kwasu nukleinowego. Najbardziej niebezpieczne dla komórek są przerwania obu nici podwójnej helisy DNA (ang. DSBs Double Strand Breaks). Nienaprawione lub niewłaściwie naprawione DSBs mogą prowadzić nawet do śmierci komórkowej. Istnieje wiele mechanizmów naprawy uszkodzeń DNA.

Mimo, iż białka uczestniczące w naprawie uszkodzeń DNA są dobrze poznane, to wiedza dotycząca wielu podstawowych aspektów naprawy DNA wciąż nie jest kompletna. Z powodu ograniczeń metodologicznych bezpośrednia weryfikacja struktur i orientacji kompleksów białek naprawczych z DNA nie była możliwa. Dotychczas również postulowane lokalne zmiany konformacji DNA wywołane uszkodzeniami i naprawą nie zostały zbadane. Zmiany konformacji DNA wpływają na jego reaktywność chemiczną i determinują przyłączanie się białek naprawczych. DNA wraz z tzw. białkami histonowymi tworzy chromatynę. Struktura chromatyny ma duży wpływ na indukcje lokalnych zmian konformacji DNA pod wpływem uszkodzeń.

W ramach realizacji niniejszego projektu planuje się odpowiedzieć na podstawowe pytania, które dotyczą wpływu struktury chromatyny i konformacji DNA na indukcje uszkodzeń i ich naprawę. Będzie to możliwe dzięki zastosowaniu niezwykle czułej techniki analitycznej jaką jest spektroskopia Ramana wzmocniona na ostrzu sondy skanującej (ang. Tip-enhanced Raman spectroscopy TERS). Metoda ta stanowi unikatowe połączenie nanometrycznej zdolności rozdzielczej typowej dla mikroskopii sił atomowych, oraz selektywności chemicznej spektroskopii Ramana. TERS umożliwi obrazowanie DNA i białek naprawczych oraz zbadanie ich struktury chemicznej i konformacji. Planuje się także bezpośrednie monitorowanie lokalnych zmian konformacji DNA po indukcji uszkodzeń oksydacyjnych i interakcji z białkami naprawczymi, takimi jak ligaza DNA IV i MutS. Badania w nanoskali pozwolą na analizę lokalnych zmian struktury chemicznej pojedynczych cząsteczek DNA i rekonstruowanej chromatyny. Integralną częścią niniejszego projektu jest implementacja techniki TERS w warunkach imitujących fizjologiczne (bufor).

Dodatkowo planuje się także zastosowanie spektroskopii Ramana i w zakresie podczerwieni do detekcji uszkodzeń DNA w komórkach oraz badanie odpowiedzi komórkowej wywołanej oksydacyjnymi uszkodzeniami DNA. Spektroskopia w zakresie podczerwieni umożliwi detekcję zmian składu chemicznego i struktury bio-cząsteczek w odpowiedzi na oksydacyjne uszkodzenia DNA w żywych komórkach oraz w izolowanych jądrach komórkowych. Spodziewamy się zaobserwować zmiany w widmach w zakresie podczerwieni związanych z ekspresją białek naprawczych (wzrost intensywności pasm amidowych) oraz ze zmianami konformacji DNA (przesunięcia pasm pochodzących od grup fosforanowych szkieletu DNA).

Proponowany projekt obejmuje analizę chemiczną w nanoskali na poziomie pojedynczych nici DNA i chromatyny, a także mikrospektroskopowe badania złożonych próbek takich jak chromosomy, jądra komórkowe i komórki. Metody obrazowania i metody analityczne zostały dobrane tak, aby uzyskać nowe, a zarazem komplementarne informacje o roli lokalnych zmian konformacji DNA w powstawaniu uszkodzeń DNA i ich naprawy. Integralną częścią projektu jest jednoczesna wielowymiarowa analiza otrzymanych danych, która pozwoli na porównanie widm otrzymanych w nano- oraz mikroskali.

Projekt obejmuje optymalizację technik eksperymentalnych w szczególności techniki TERS do pomiarów w cieczy. Optymalizacja ta znajdzie zastosowanie w badaniach wielu delikatnych układów biologicznych takich jak agregujące neurodegeneracyjne białka, przyłączanie się leków chemoterapeutycznych do DNA czy powstawanie domen w cienkich warstwach lipidowych pod wpływem oddziaływania z białkami błonowymi.