POPULARNONAUKOWE STRESZCZENIE PROJEKTU

DNA w pojedynczej komórce może zostać uszkodzone nawet kilkadziesiąt tysięcy razy w ciągu jednego dnia. Powstają różne typy uszkodzeń np.: chemiczne modyfikacje zasad, tworzenie dimerów pirymidynowych przez tworzenie wiązań kowalencyjnych pomiędzy sąsiednimi zasadami. Wiązania przy grupach fosforanowych w szkielecie DNA mogą również ulegać przerwaniu, co prowadzi do pęknięć jednej lub obu nici DNA. Podwójne przerwania są najbardziej niebezpieczne dla komórek. Nienaprawione mogą prowadzić nawet do śmierci komórkowej. Komórki opracowały wiele mechanizmów naprawy uszkodzeń DNA.

Białka zaangażowane w naprawę uszkodzeń DNA są dobrze poznane, ale wiele podstawowych aspektów dotyczących procesów naprawy DNA wciąż wymaga dalszych badań. Ze względu na ograniczenia metodologiczne nie można było bezpośrednio zweryfikować struktur i orientacji kompleksów białkowych biorących udział w naprawie DNA, a także zmian struktury DNA tak zwanej konformacji wywołanych uszkodzeniami i naprawą DNA. Struktura DNA może się lokalnie zmieniać po indukcji uszkodzenia i w wyniku oddziaływania z białkiem naprawczym. Zmiana konformacji wpływa na reaktywność chemiczną i warunkuje wiązanie się DNA i określonego białka naprawczego. W komórkach DNA wraz z białkami zwanymi histonami tworzy chromatynę. Integralność chromatyny ściśle wpływa na lokalne zmiany konformacji DNA.

W tym projekcie chcielibyśmy odpowiedzieć na podstawowe pytania dotyczące wpływu konformacji DNA, a także złożonej struktury chromatyny na powstawanie uszkodzeń DNA i ich naprawę. Zostanie to zrealizowane poprzez zastosowanie spektroskopii Ramana wzmocnionej na ostrzu sondy skanującej (ang. Tip-enhanced Raman spectroscopy TERS). Metoda ta stanowi unikatowe połączenie mikroskopii sił atomowych, która pozwoli na obrazowanie DNA i białek naprawczych oraz spektroskopii Ramana, która dostarczy informacji o strukturze chemicznej i konformacji badanych próbek. Za pomocą TERS można badać strukturę chemiczną z nano-metryczną rozdzielczością przestrzenną. W tym projekcie będziemy bezpośrednio monitorować lokalne zmiany konformacji DNA po indukcji uszkodzenia chemioterapeutykiem (bleomycyną) i interakcji z białkami naprawczymi, takimi jak ligaza DNA IV i MutS. Badania w nanoskali pozwolą na analizę struktury chemicznej pojedynczych cząsteczek DNA i rekonstruowanej chromatyny w warunkach zbliżonych do fizjologicznych.

Dodatkowo planuje się także zastosowanie mikroskopii fluorescencyjnej i spektroskopii w zakresie podczerwieni do detekcji uszkodzeń DNA w komórkach oraz badań odpowiedzi komórek na indukowane uszkodzenia. Dokładnie, za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej spodziewamy się zobrazować fragmentację chromatyny i zlokalizować fosforylację białek histonowych związaną z naprawą podwójnych przerwań nici DNA. Dzięki zastosowaniu spektroskopii w zakresie podczerwieni do badań żywych komórek oraz izolowanych jąder komórkowych i chromosomów możliwa będzie detekcja zmian składu chemicznego i struktury bio-cząsteczek w odpowiedzi na uszkodzenia DNA indukowanie za pomocą bleomycyny. W komórkach traktowanych bleomycyną oraz izolowanych z nich jądrach komórkowych i chromosomach spodziewamy się zaobserwować wzrost ekspresji białek oraz zmiany konformacji DNA związane z jego naprawą.

Proponowany projekt obejmuje komplementarne badania na poziomie, pojedynczych nici DNA i chromatyny, a także chromosomów, jąder komórkowych i komórek. Do każdej z wymienionych próbek zostały odpowiednio dobrane metody obrazowania i metody analityczne, tak aby uzyskać komplementarne informacje o roli zmian konformacji DNA w powstawaniu uszkodzeń DNA i ich naprawy.

Projekt wymaga znaczących optymalizacji technik eksperymentalnych w szczególności techniki TERS do badań w cieczy, która będzie mogła zostać zastosowana przez chemików, biologów i biofizyków do wielu delikatnych układów biologicznych takich jak agregujące neurotoksyczne białka, leki chemoterapeutyczne przyłączające się do DNA czy formułujące się domeny w cienkich warstwach lipidowych pod wpływem oddziaływania z białkami błonowymi.