

Nanocząstki plazmoniczne dekorowane fluorescencyjnie znakowanym mRNA do badania aktywności enzymów zaangażowanych w metabolizm mRNA z wykorzystaniem efektu FRET pojedynczych par

Rezonansowy fluorescencyjny przekaz energii (FRET) jest jednym z podstawowych procesów zachodzącym w nanoskali. W klasycznym opisie, gdy dwie cząsteczki są umieszczone w odległości około 10 nm od siebie, energia może zostać przekazana z jednej do drugiej z wykorzystaniem bezpromienistego przekazu energii. Aby ten proces mógł zajść, konieczne jest zapewnienie przekrywania się widm emisji donora z widmem absorpcji akceptora. Niezbędna jest również właściwa orientacja wzajemna momentów dipolowych tych cząsteczek. Z punktu widzenia własności spektroskopowych, dowodem zachodzenia procesu FRET jest skrócenie zaniku fluorescencji donora i/lub zwiększenie natężenia fluorescencji akceptora. Ponieważ wydajność procesu FRET zależy od szóstej potęgi odwrotności odległości między donorem a akceptorem, koncept FRET stał się szybko jedną z najważniejszych technik w biologii, biochemii i biofizyce do wyznaczania wzajemnych odległości i badania oddziaływań molekularnych. W typowym eksperymencie nakierowanym na badanie dynamiki białka, wyznakowuje się strukturę białkową dwiema cząsteczkami, które wykazują przekaz energii. Na skutek denaturacji białka, odległość między donorem i akceptorem ulega zmianie, wpływając na wydajność procesu FRET. Inną strategią wykorzystania procesu FRET w układach czujnikowych jest wytworzenie sondy w taki sposób, by była ona w stanie oznaczać obecność enzymu. W tym przypadku łańcuch DNA lub sekwencję peptydową oznacza się donorem i akceptorem, jednocześnie zapewniając by łańcuch sondy zawierał element czuły na obecność enzymu. W konfiguracji neutralnej, zachodzi przekaz energii między donorem a akceptorem, jednak po dodaniu enzymu może dojść do przerwania łańcucha łączącego obie cząsteczki, co doprowadzi, że proces FRET nie zajdzie.

Celem projektu jest eksperymentalne wykazanie przy pomocy technik optycznych i określenie ilościowe aktywności enzymów odpowiedzialnych za degradację mRNA, z wykorzystaniem nowatorskich podwójnie znakowanych sond opartych o łańcuchy nukleotydowe i mRNA. Własności optyczne tych sond będą dodatkowo wzmocnione dzięki oddziaływaniu ze wzbudzeniem plazmonowym w nanodrutach srebra. W tym celu zsyntetyzowane zostaną odpowiednie sondy, które po przyłączeniu do nanodrutów srebra posłużą do obserwacji zachodzących w czasie rzeczywistym zmian w wydajności procesu FRET pod wpływem obecności wybranych enzymów. Technikami zastosowanymi do badań będą zaawansowane techniki mikroskopii i spektroskopii fluorescencyjnej.

Szczególne uwaga zostanie poświęcona podwójnie znakowanym sondom opartym o RNA, które wykazują znaczącą aktywność w obecności hydrolaz RNA. Możliwość monitorowania działania różnych enzymów ma kluczowe znaczenie dla regulacji ekspresji informacji genetycznej, odpowiedzi immunologicznej i dostarczania terapeutyków opartych o mRNA.