

Streszczenie

Temat:

Opracowanie systemów bioczuJNIKOWYCH przeznaczonych do wykrywania mRNA surwiwiny i monitorowania poziomu stężenia ATP w komórkach nowotworowych

Choroby nowotworowe stanowią jedną z najczęstszych przyczyn zgonów na świecie, a wykrywalność nowych przypadków z roku na rok ciągle wzrasta. Jednym z podstawowych powodów wysokiego odsetka śmiertelności jest zbyt późna diagnostyka pacjentów. W związku z tym, wciąż poszukuje się potencjalnych biomarkerów nowotworowych, a także nowych metod mających zastosowanie w diagnostyce i leczeniu tej zagrażającej życiu choroby.

Celem rozprawy było opracowanie fluorescencyjnych systemów bioczuJNIKOWYCH opartych na jednoniciowych sondach oligonukleotydowych, które zastosowano do wykrywania potencjalnych biomarkerów nowotworowych: (i) ekspresji genu surwiwiny na poziomie mRNA oraz (ii) monitorowania poziomu stężenia adenozyjno-5'-trifosforanu (ATP) w ludzkich komórkach. W pracy wykorzystano dwie linie komórkowe: komórki nabłonka gruczolakoraka okrężnicy SW480 oraz prawidłowe komórki nabłonka okrężnicy CCD841 CoN.

Przeprowadzone badania miały na celu dokonanie oceny następujących hipotez:

H1: Wykrywanie ekspresji genu surwiwiny w komórkach nowotworowych może być prowadzone za pomocą sondy nukleotydowej typu „sygnalizator molekularny” z sekwencją komplementarną do sekwencji mRNA odpowiadającej za kodowanie surwiwiny.

H2: Zwiększone zapotrzebowanie energetyczne komórek nowotworowych może być wykrywane poprzez monitorowanie poziomu stężenia ATP w komórkach za pomocą systemu bioczuJNIKOWEGO opartego o aptamer, który wiąże się z ATP.

Zakres badań obejmował opracowanie oraz testowanie systemów bioczuJNIKOWYCH znakowanych barwnikiem fluorescencyjnym, opartych o sondy nukleotydowe typu „sygnalizator molekularny” (*ang. molecular beacon*) oraz sondach aptamerowych. W przeprowadzonych badaniach wykorzystano m.in. spektroskopię fluorescencyjną, zjawisko fluorescencyjnego rezonansowego przeniesienia energii oraz mikroskopię optyczną z filtrami fluorescencyjnymi. Pierwszy etap doświadczeń polegał na scharakteryzowaniu działania sond, w tym: wyznaczeniu limitu detekcji, selektywności oraz sprawdzeniu stabilności w różnych temperaturach. W kolejnym etapie opracowano skuteczną metodę transfekcji komórek sondą nukleotydową przy użyciu dwóch nanonośników: tlenku grafenu i liposomów. Ostatecznie umożliwiło to wykrycie ekspresji genu surwiwiny na poziomie mRNA, odróżnienie komórek nowotworowych od prawidłowych, a także monitorowanie poziomu stężenia ATP modulowanego inhibitorami syntazy ATP oraz glikolizy.

Przedstawione wyniki wpisują się w nurt obecnych badań dotyczących poszukiwania nowych metod detekcji oraz terapii chorób nowotworowych. Wskazują możliwość potencjalnego zastosowania systemów fluorescencyjnych do wykrywania biomarkerów nowotworowych, jak również wykorzystania nanomateriałów jako nośników do wprowadzania leków i sond nukleotydowych do komórek.

Development of biosensing systems for survivin mRNA detection and monitoring of ATP level concentration in cancer cells

Cancer is one of the most common causes of death worldwide, and the detection of new cases is constantly increasing every year. One of the main reasons for the high mortality rate is the late diagnosis of patients. Therefore, the potential cancer biomarkers as well as the new methods for diagnostics and treatment of this deadly disease are still being sought.

The aim of this thesis was the development of fluorescent biosensing systems based on single-stranded oligonucleotide probes, which were used for the detection of potential cancer biomarkers: (i) expression of survivin mRNA and (ii) monitoring the level of adenosine-5'-triphosphate (ATP) concentration in human cells. Two cell lines were used in the study: human colon adenocarcinoma cells SW480 and normal epithelial cells CCD841 CoN.

The conducted investigations carried out in this thesis aimed to assess the following hypotheses:

H1: Detection of survivin gene expression in cancer cells can be performed using a molecular beacon probe with a sequence complementary to the mRNA sequence responsible for survivin coding.

H2: Increased energy demand of cancer cells can be detected by the monitoring of ATP concentration level in cells using the biosensing systems based on the aptamer that binds to ATP.

The scope of the research included the development and testing of the biosensing systems attached with a fluorescent dye, based on the molecular beacon and aptamer probes. In conducted research the following methods were used: fluorescence spectroscopy, fluorescence resonance energy transfer and optical microscopy with fluorescent filters. Firstly, the biosensing systems were characterized by determination of the detection limit, selectivity and stability at various temperatures. Then, an effective method of transfecting cells with a nucleotide probe using two nanocarriers: graphene oxide and liposomes was developed. Finally, the expression of survivin mRNA was determined, the tumor cells were distinguished from the normal cells, and the concentration of ATP levels modulated by ATP synthase and glycolysis inhibitors was monitored.

The presented results are consistent with current research concerning the new methods for cancer detection and therapy. They indicate the potential of fluorescent biosensing systems utilizing for the cancer biomarker detection and application of nanomaterials as the carriers for drugs and oligonucleotides probes delivery into cells.