

Congresso Nazionale della Società Italiana di Fisica

Roma 21 – 25 Settembre 2015



Oligonucleotidi a DNA come biosensori di K^+

L. Bruni^{1,2,3}, M.Manghi^{2,3}, B. Mauro² e S. Croci^{1,2,3}

¹Centro Fermi – Museo Storico della Fisica e Centro Studi e Ricerche Enrico Fermi – Roma;

²Dipartimento di Neuroscienze, Unità di Biofisica e Fisica Medica, Università di Parma;

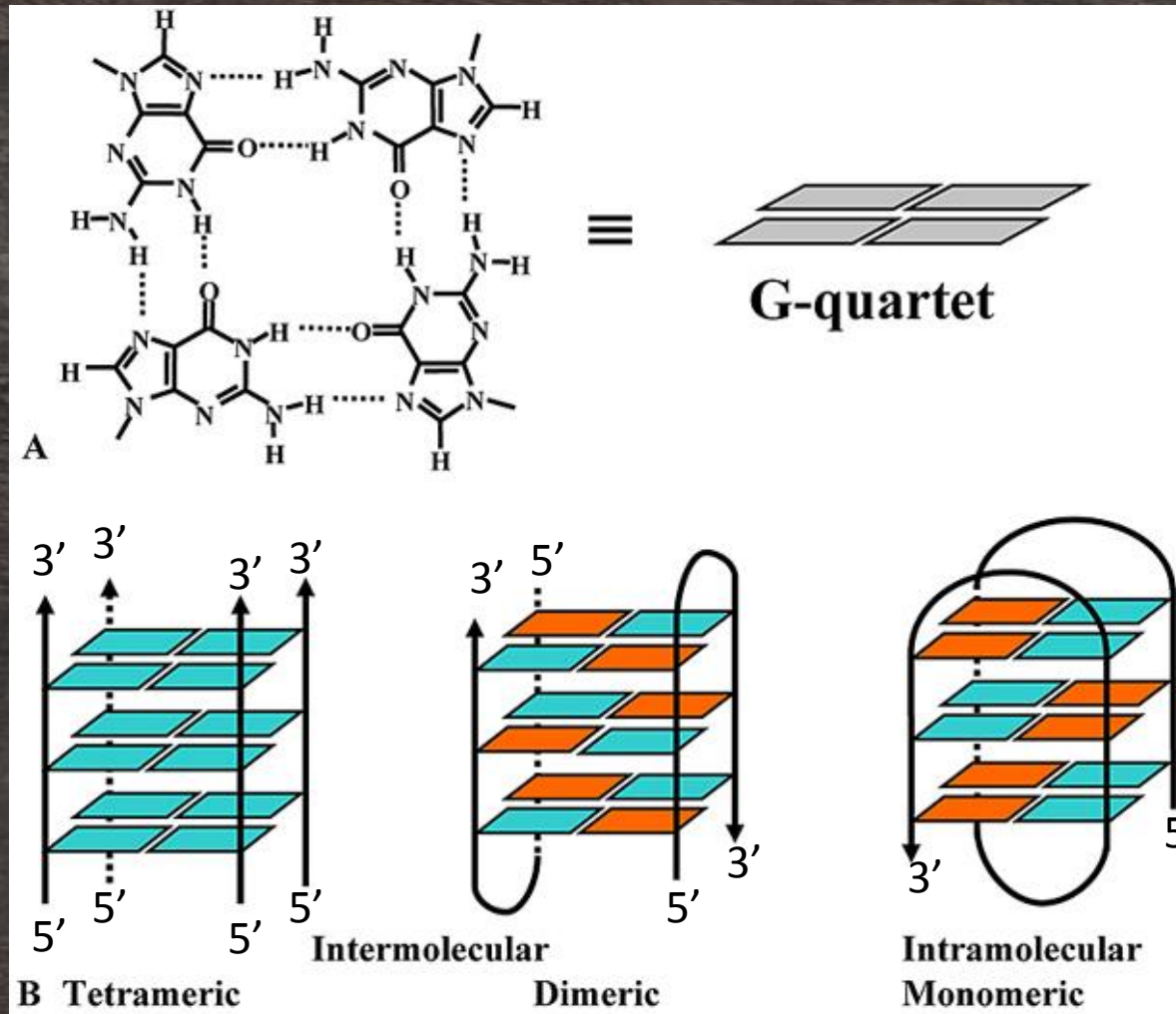
³Istituto Nazionale Biostrutture e Biosistemi – Roma



**CENTRO
FERMI**
Museo Storico della Fisica e
Centro Studi e Ricerche Enrico Fermi



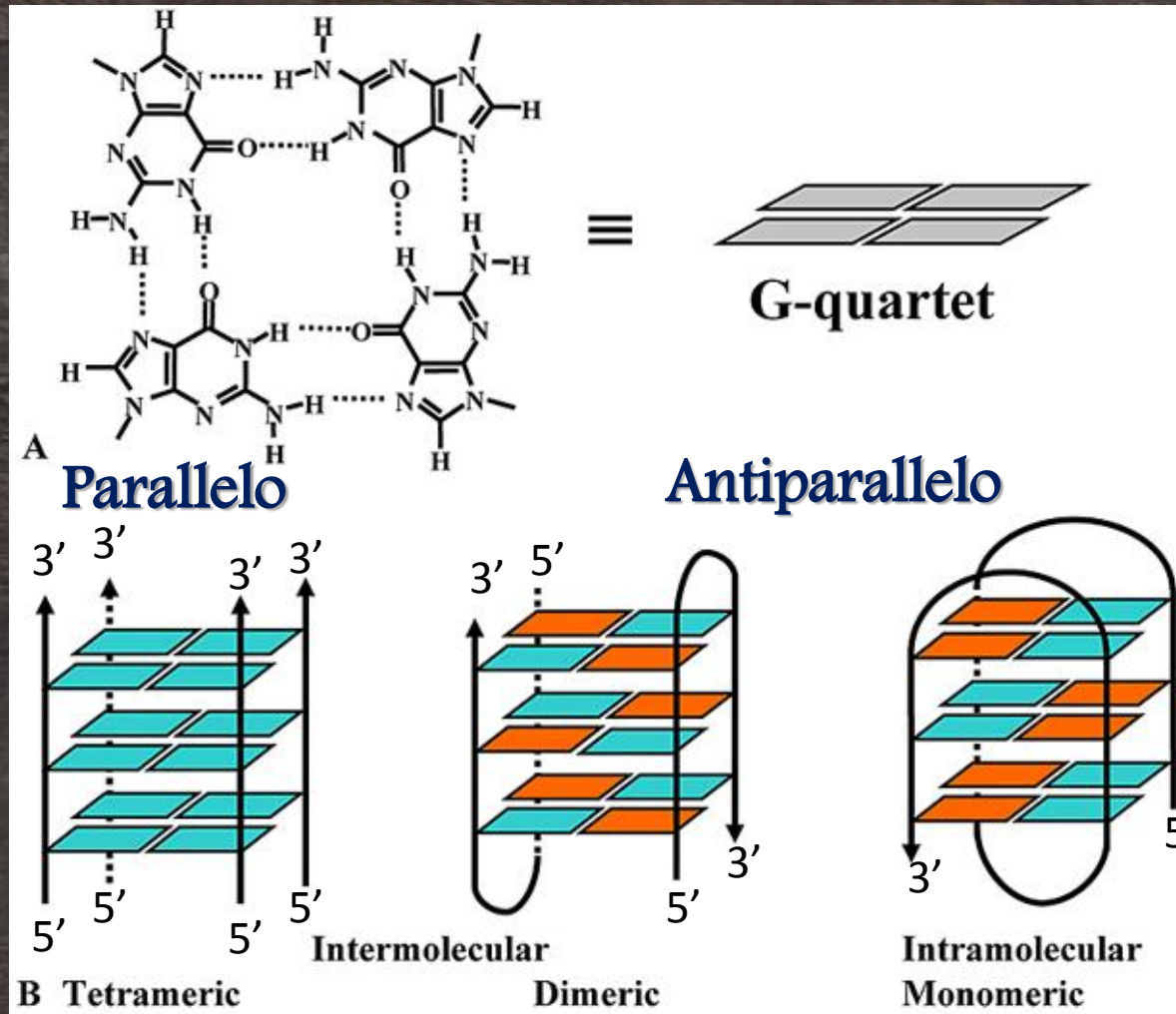
Biosensore – G-quadruplex



Catione monovalente : $K^+ > Na^+ > Rb^+ > NH_4^+ > Cs^+ > Li^+$

Quadruplex DNA: sequence, topology and structure *G. N. Parkinson et al., 2006*

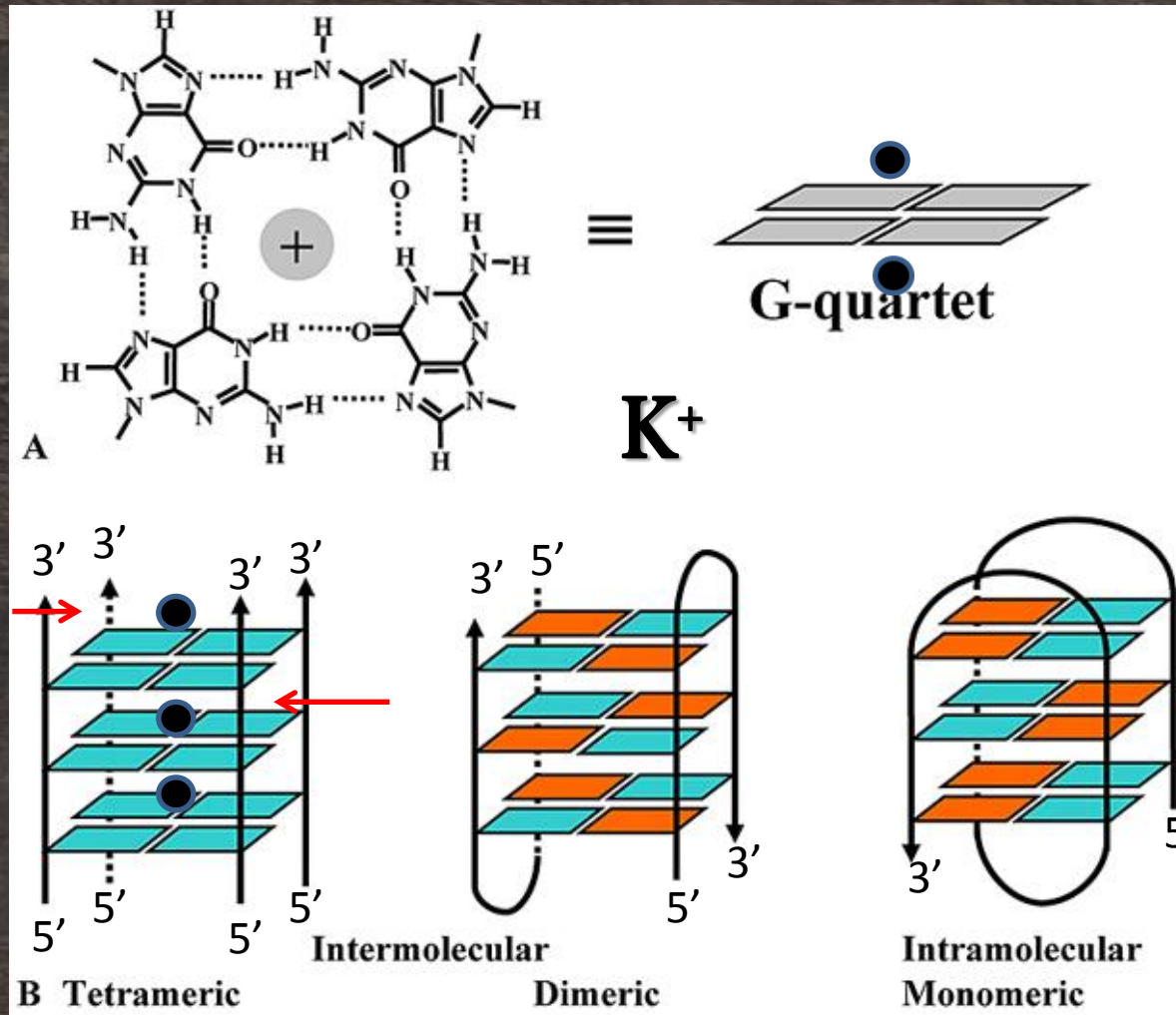
Biosensore – G-quadruplex



Catione monovalente : $K^+ > Na^+ > Rb^+ > NH_4^+ > Cs^+ > Li^+$

Quadruplex DNA: sequence, topology and structure *G. N. Parkinson et al., 2006*

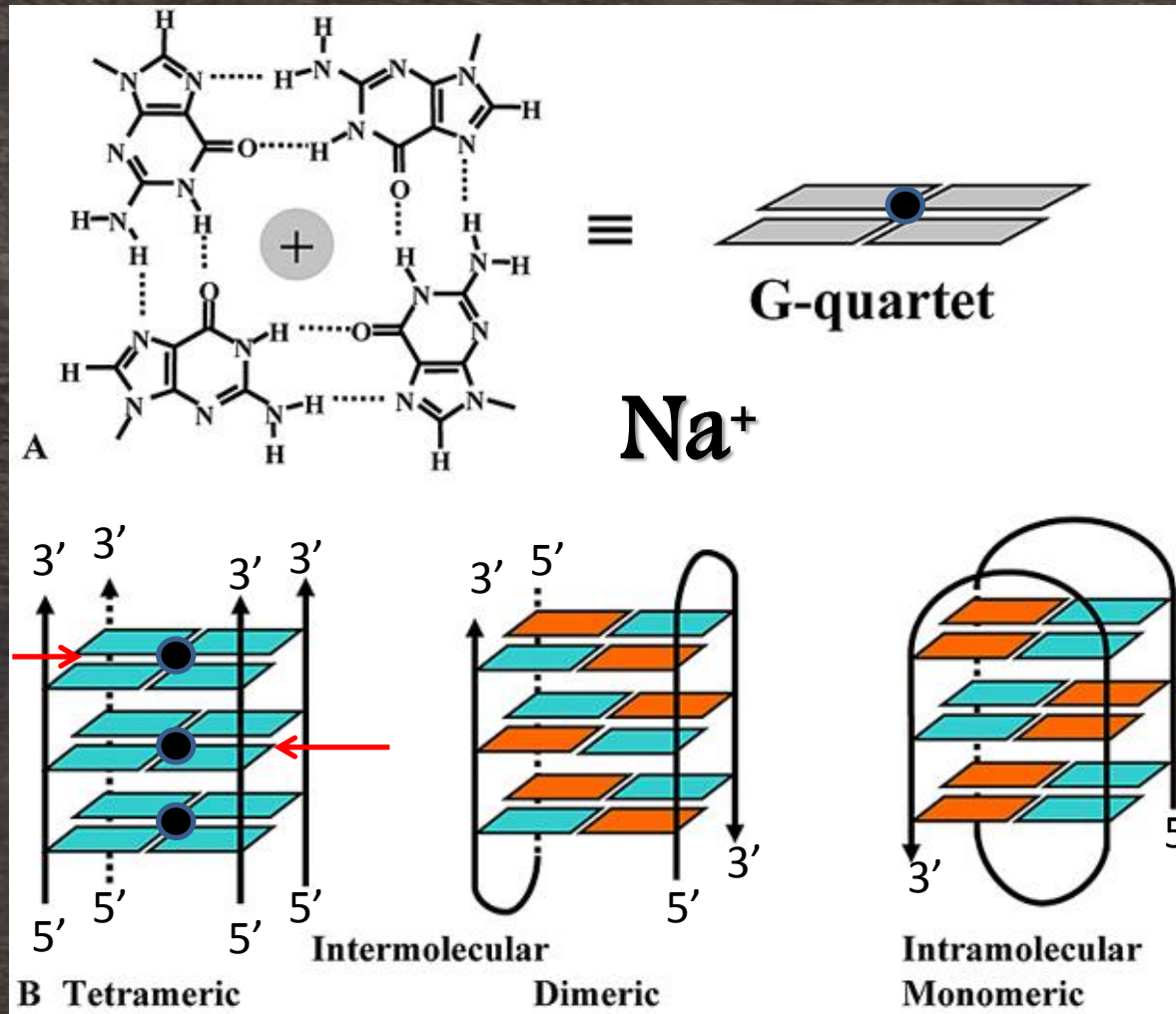
Biosensore – G-quadruplex



Catione monovalente : $K^+ > Na^+ > Rb^+ > NH_4^+ > Cs^+ > Li^+$

Quadruplex DNA: sequence, topology and structure *G. N. Parkinson et al., 2006*

Biosensore – G-quadruplex



Catione monovalente : $K^+ > Na^+ > Rb^+ > NH_4^+ > Cs^+ > Li^+$

Quadruplex DNA: sequence, topology and structure *G. N. Parkinson et al., 2006*

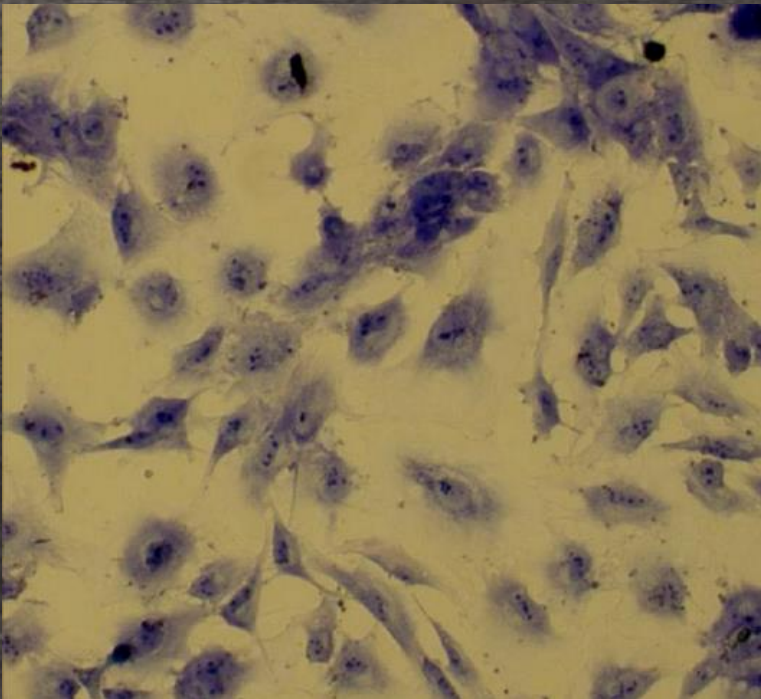
Biosensore – G-quadruplex

PS2.M

5'-GTGGGTAGGGCGGGTTGG-3'

DNA-enhanced peroxidase activity of a DNA aptamer-hemin complex
P. Travascio et al., Chemistry & Biology 1998

Biosensore – G-quadruplex – PS2.M



Hs 578T

carcinoma mammario umano

Trattato con **K**: **D-rib** 5mM

biosensore di ioni **K⁺**

Biosensore – G-quadruplex – PS2.M

DMEM : $[K^+] = 5\text{mM } K^+ - [Na^+] = 156,3\text{mM } Na^+$

DMEM 5mM K:D-rib $\longrightarrow [K^+] = 20\text{mM} - [Na^+] = 156,3\text{mM}$

Biosensore – G-quadruplex – PS2.M

DMEM: $[K^+] = 5\text{mM } K^+ - [Na^+] = 156,3\text{mM } Na^+$

DMEM 5mM K:D-rib $\longrightarrow [K^+] = 20\text{mM} - [Na^+] = 156,3\text{mM}$

PREPARAZIONE CAMPIONI

DMEM: $[K^+] = 1.6\text{mM} - [Na^+] = 52.1\text{mM}$

DMEM 5mM K:D-rib $\longrightarrow [K^+] = 6.7\text{mM} - [Na^+] = 52.1\text{mM}$

Biosensore – G-quadruplex – PS2.M

DMEM: $[K^+] = 5\text{mM } K^+ - [Na^+] = 156,3\text{mM } Na^+$

DMEM 5mM K:D-rib $\longrightarrow [K^+] = 20\text{mM} - [Na^+] = 156,3\text{mM}$

PREPARAZIONE CAMPIONI

DMEM: $[K^+] = 1.6\text{mM} - [Na^+] = 52.1\text{mM}$

DMEM 5mM K:D-rib $\longrightarrow [K^+] = 6.7\text{mM} - [Na^+] = 52.1\text{mM}$

$[K^+] = 1.6\text{mM} - 6.7\text{mM} \quad [Na^+] = 52.1\text{mM}$

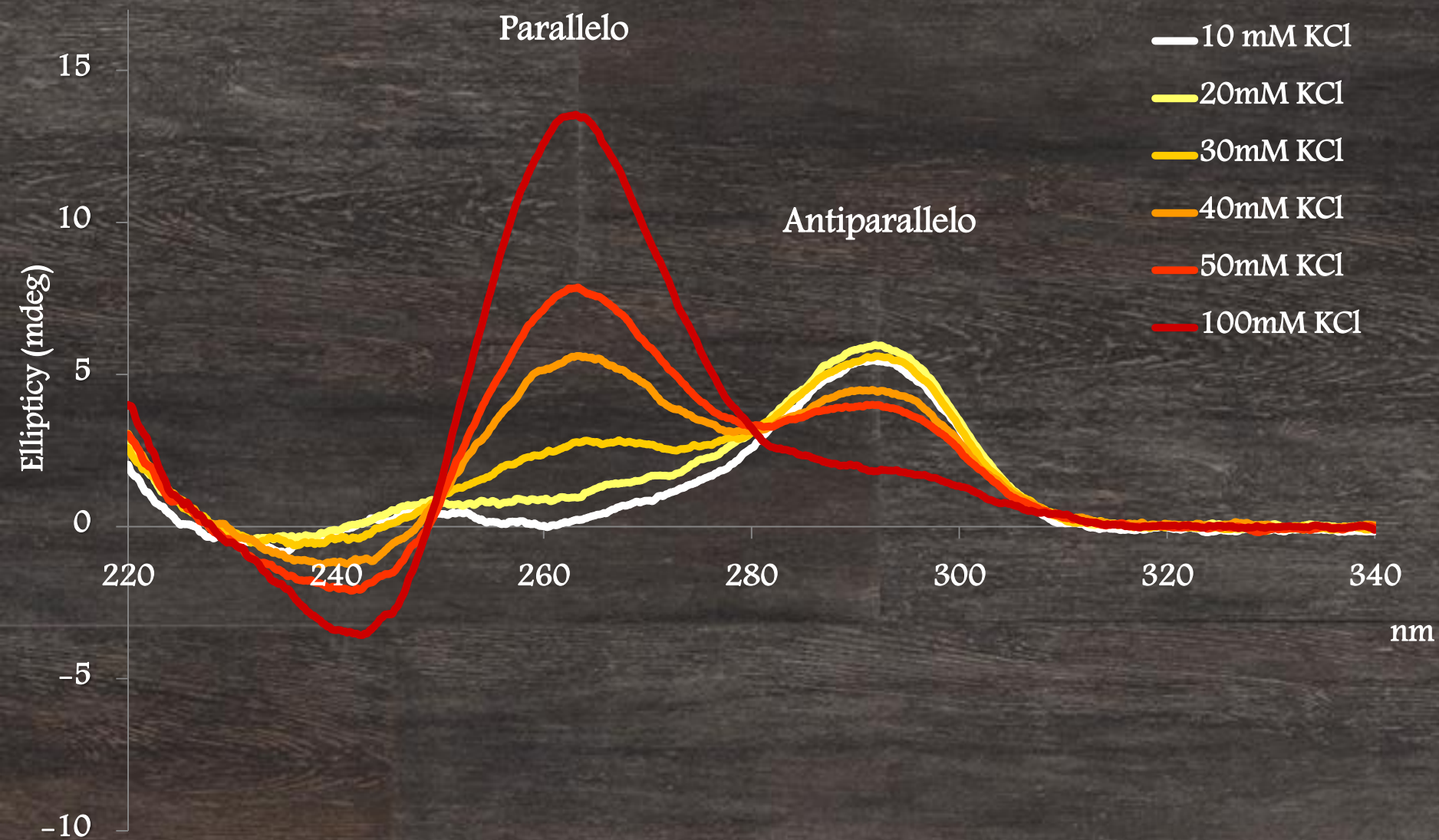
In presenza di K^+ che cosa accade?



PS2.M

Fonte di ioni KCl: 10mM; 20mM; 40mM; 50mM; 100mM

Spettri CD G-quadruplex



CONCLUSIONI

- In presenza di KCl si ha uno *switch* conformazionale da antiparallelo a parallelo.

In presenza di Na^+ che cosa accade?



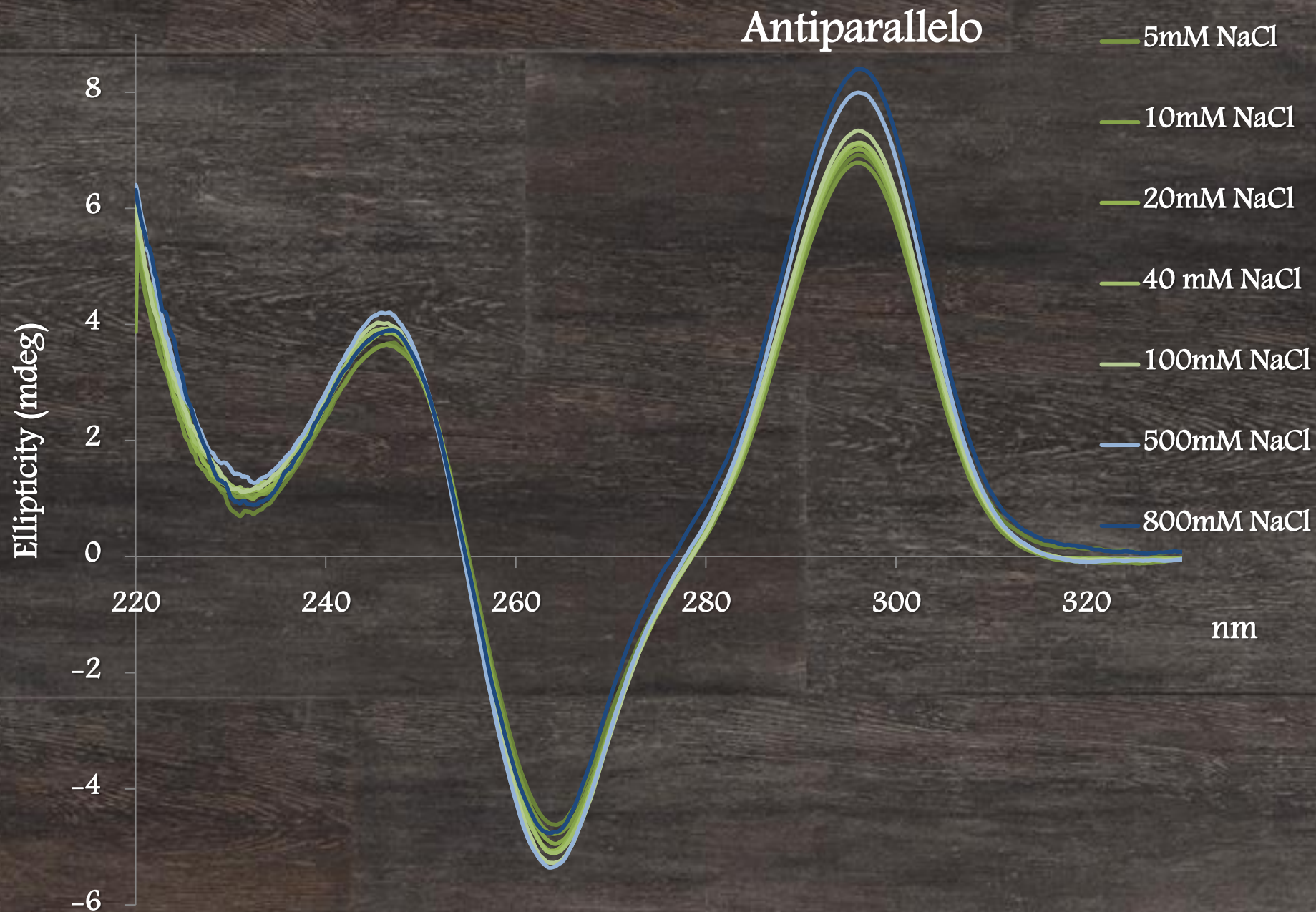
PS2.M

Fonte di ioni KCl: 10mM; 20mM; 40mM; 50mM; 100mM

Fonte di ioni NaCl: 5mM; 10mM; 20mM; 40mM; 100mM; 500mM ed 800mM.

- G-quadruplex foldato nel buffer di folding e poi titolato con NaCl

Spettri CD G-quadruplex



CONCLUSIONI

- In presenza di KCl si ha uno *switch* conformazionale da antiparallelo a parallelo.
- La presenza di solo NaCl porta alla formazione di G-quadruplex con struttura antiparallela.

Ed in presenza sia di Na^+ che di K^+ che
cosa accade?



PS2.M

Fonte di ioni KCl: 10mM; 20mM; 40mM; 50mM; 100mM

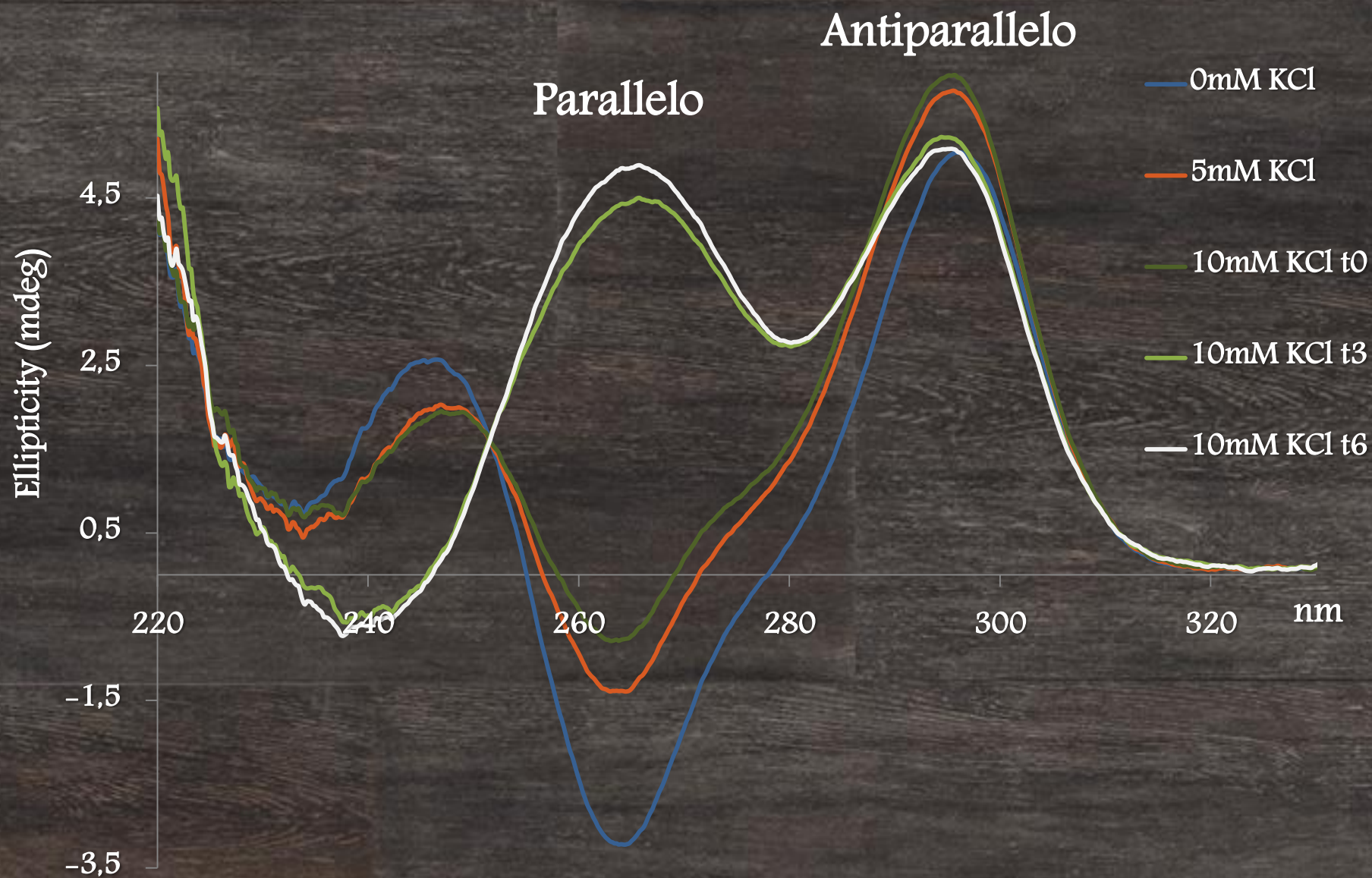
Fonte di ioni NaCl: 5mM; 10mM; 20mM; 40mM; 100mM; 500mM ed 800mM.

- G-quadruplex foldato nel buffer di folding e poi titolato con NaCl

Fonte di ioni: NaCl 50mM; 0mM KCl; 5mM KCl; 10mM KCl

- G-quadruplex foldato prima in presenza di 50mM di NaCl, poi titolato con KCl

Spettri CD G-quadruplex



CONCLUSIONI

- In presenza di KCl si ha uno *switch* conformazionale da antiparallelo a parallelo.
- La presenza di solo NaCl porta alla formazione di G-quadruplex con struttura antiparallela.
- La titolazione con KCl di PS2.M foldato in presenza di 50mM di NaCl porta ad uno *switch* conformazionale da antiparallelo a parallelo.

PS2.M

Fonte di ioni KCl: 10mM; 20mM; 40mM; 50mM; 100mM

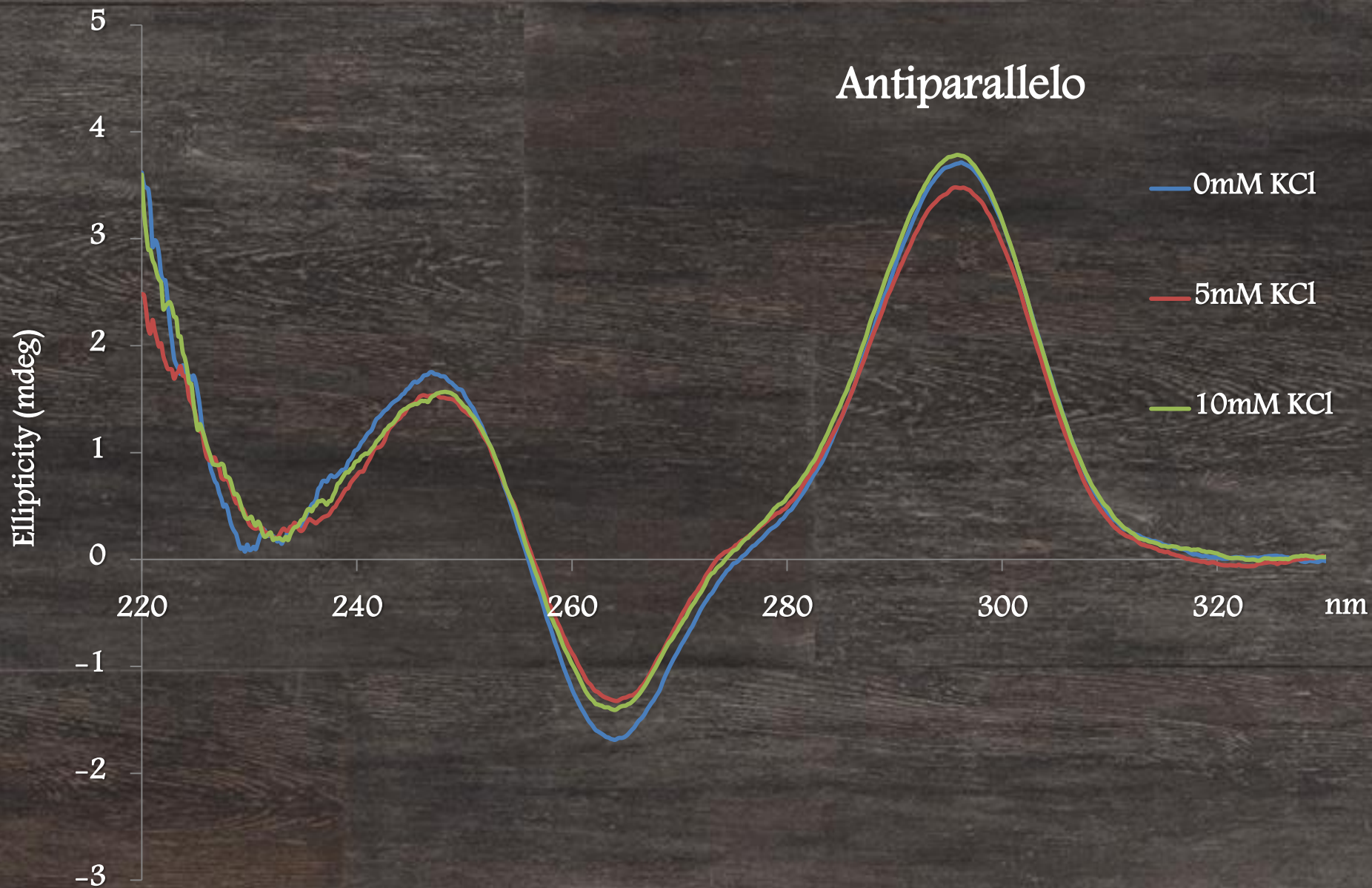
Fonte di ioni NaCl: 5mM; 10mM; 20mM; 40mM; 100mM; 500mM ed 800mM.

- G-quadruplex foldato nel buffer di folding e poi titolato con NaCl

Fonte di ioni: NaCl 50mM; 0mM KCl; 5mM KCl; 10mM KCl

- G-quadruplex foldato prima in presenza di 50mM di NaCl, poi titolato con KCl
- G-quadruplex foldato si in presenza di 50mM di NaCl che di KCl

Spettri CD G-quadruplex



CONCLUSIONI

- In presenza di KCl si ha uno *switch* conformazionale da antiparallelo a parallelo.
- La presenza di solo NaCl porta alla formazione di G-quadruplex con struttura antiparallela.
- La titolazione con KCl di PS2.M foldato in presenza di 50mM di NaCl porta ad uno *switch* conformazionale da antiparallelo a parallelo.
- Il folding con entrambi gli ioni favorisce la formazione di una struttura antiparallela stabile.

PS2.M

Fonte di ioni KCl: 10mM; 20mM; 40mM; 50mM; 100mM

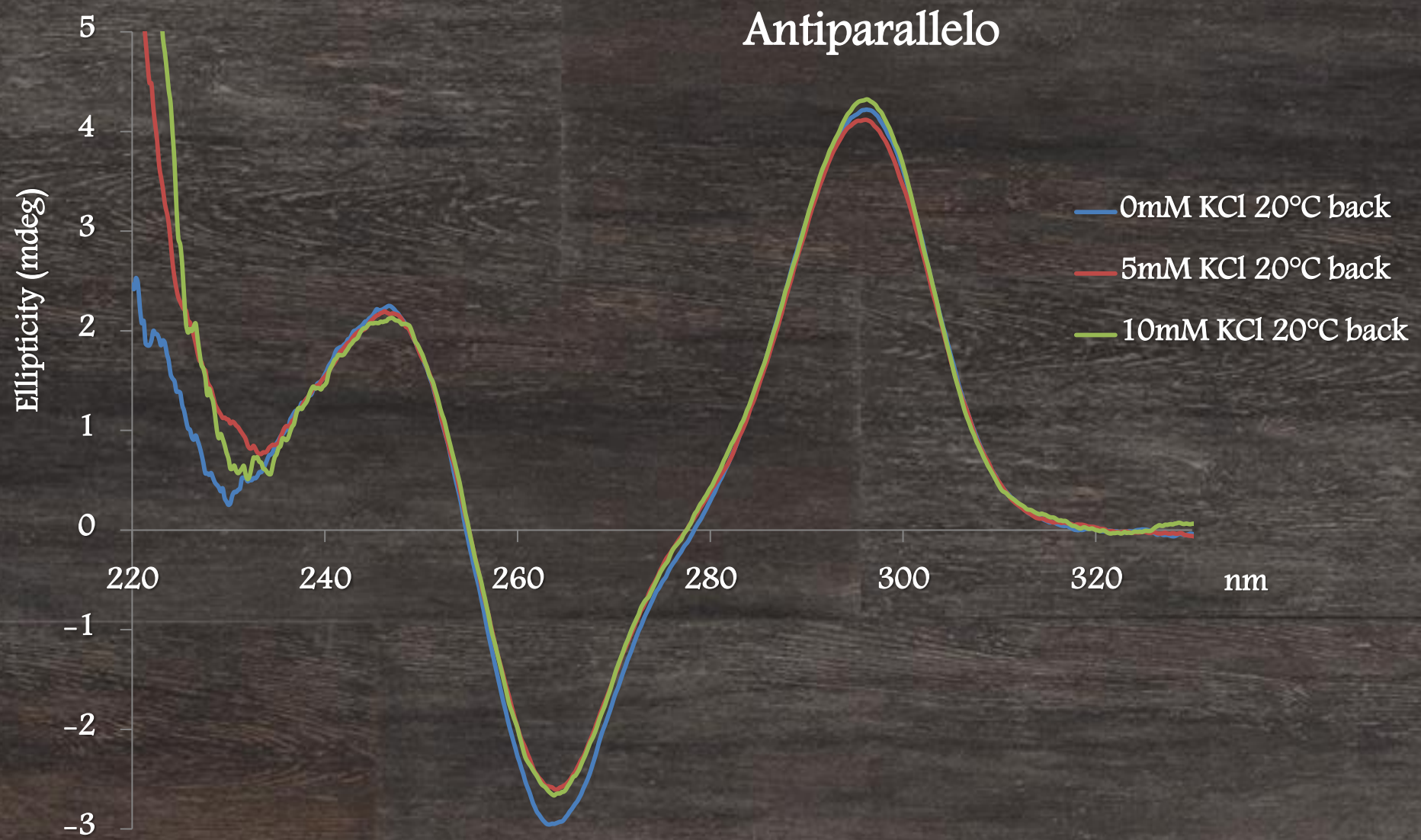
Fonte di ioni NaCl: 5mM; 10mM; 20mM; 40mM; 100mM; 500mM ed 800mM.

- G-quadruplex foldato nel buffer di folding e poi titolato con NaCl

Fonte di ioni: NaCl 50mM; 0mM KCl; 5mM KCl; 10mM KCl

- G-quadruplex foldato prima in presenza di 50mM di NaCl, poi titolato con KCl
- G-quadruplex foldato sia in presenza di 50mM di NaCl che di KCl
- G-quadruplex foldato sia in presenza di 50mM di NaCl che KCl scaldato fino ad 80°C e raffreddato fino a 20°C

Spettri CD G-quadruplex



CONCLUSIONI

- In presenza di KCl si ha uno *switch* conformazionale da antiparallelo a parallelo.
- La presenza di solo NaCl porta alla formazione di G-quadruplex con struttura antiparallela.
- La titolazione con KCl di PS2.M foldato in presenza di 50mM di NaCl porta ad uno *switch* conformazionale da antiparallelo a parallelo.
- Il folding con entrambi gli ioni favorisce la formazione di una struttura antiparallela stabile.
- Il riscaldamento da 20°C fino ad 80°C ed raffreddamento successivo non altera significativamente la struttura antiparallela.

Biosensore – G-quadruplex

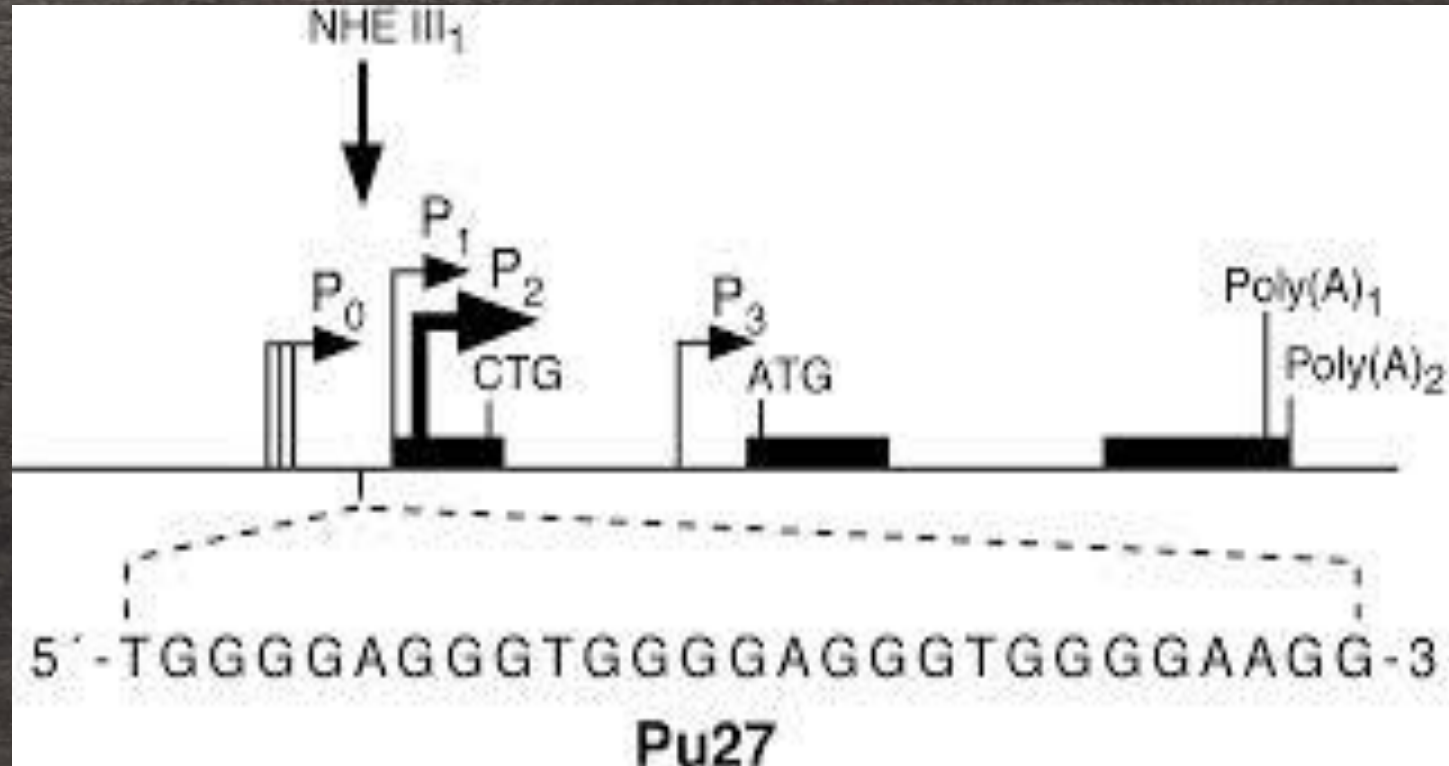
DNA PS2.M

5'-GTGGGTAGGGCGGGTTGG-3'

PU27

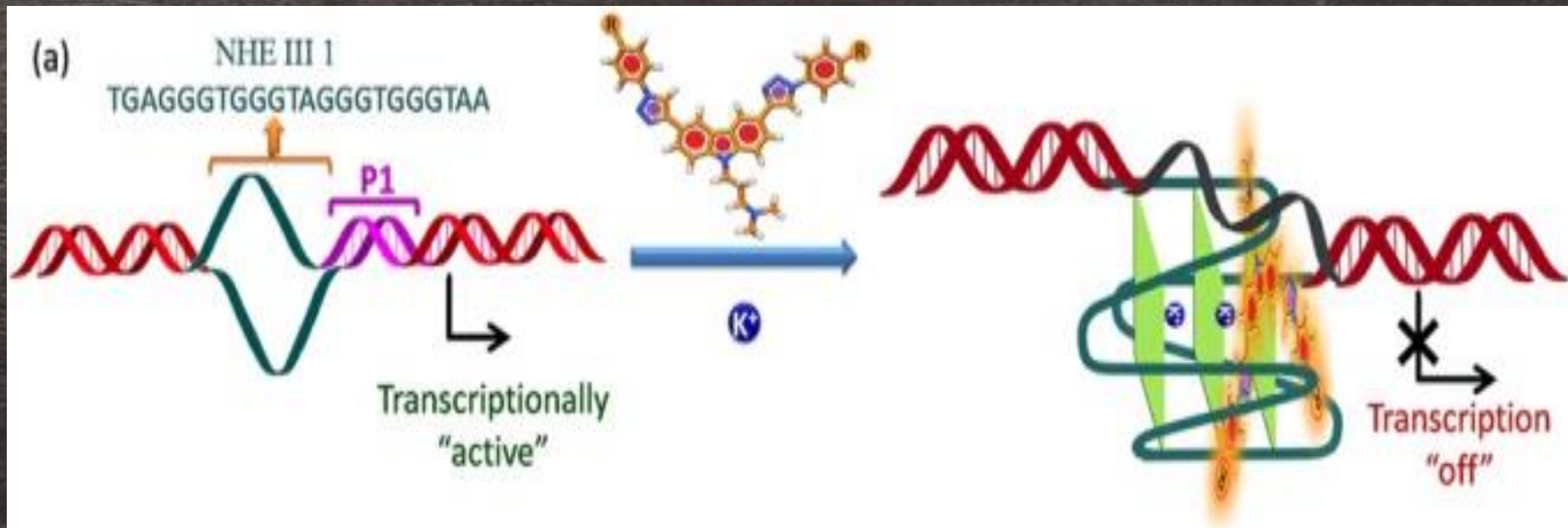
5'-TGGGGAGGGTGGGGAGGGTGGGGAAGG-3'

Biosensore – G-quadruplex



Structure of the Biologically Relevant G-Quadruplex in The c-MYC Promoter.
Yang D. et al., 2006

Biosensore – G-quadruplex



A Nucleus – imaging Probe That Selectively Stabilizes a Minor Conformation of c-MYC G-quadruplex And Down-regulates c-MYC Transcription in Human Cancer Cells *Deepanjan P. et al., 2015*

In presenza di K^+ che cosa accade?



PS2.M

Fonte di ioni KCl: 10mM; 20mM; 40mM; 50mM; 100mM

Fonte di ioni NaCl: 5mM; 10mM; 20mM; 40mM; 100mM; 500mM ed 800mM.

- G-quadruplex foldato nel buffer di folding e poi titolato con NaCl

Fonte di ioni: NaCl 50mM; 0mM KCl; 5mM KCl; 10mM KCl

- G-quadruplex foldato prima in presenza di 50mM di NaCl, poi titolato con KCl
- G-quadruplex foldato sia in presenza di 50mM di NaCl che di KCl
- G-quadruplex foldato sia in presenza di 50mM di NaCl che KCl scaldato fino ad 80°C e raffreddato fino a 20°C

PU27

Fonte di Ioni KCl: 5mM ; 10mM ; 20mM; 50mM; 70mM; 150mM

CONCLUSIONI

- In presenza di KCl si ha uno *switch* conformazionale da antiparallelo a parallelo.
- La presenza di solo NaCl porta alla formazione di G-quadruplex con struttura antiparallela.
- La titolazione con KCl di PS2.M foldato in presenza di 50mM di NaCl porta ad uno *switch* conformazionale da antiparallelo a parallelo.
- Il folding con entrambi gli ioni favorisce la formazione di una struttura antiparallela stabile.
- Il riscaldamento da 20°C fino ad 80°C ed raffreddamento successivo non altera significativamente la struttura antiparallela.
- Pu27 anche a basse concentrazioni di K⁺ mostra un segnale CD tipico di una struttura parallela.

Prospettive Future

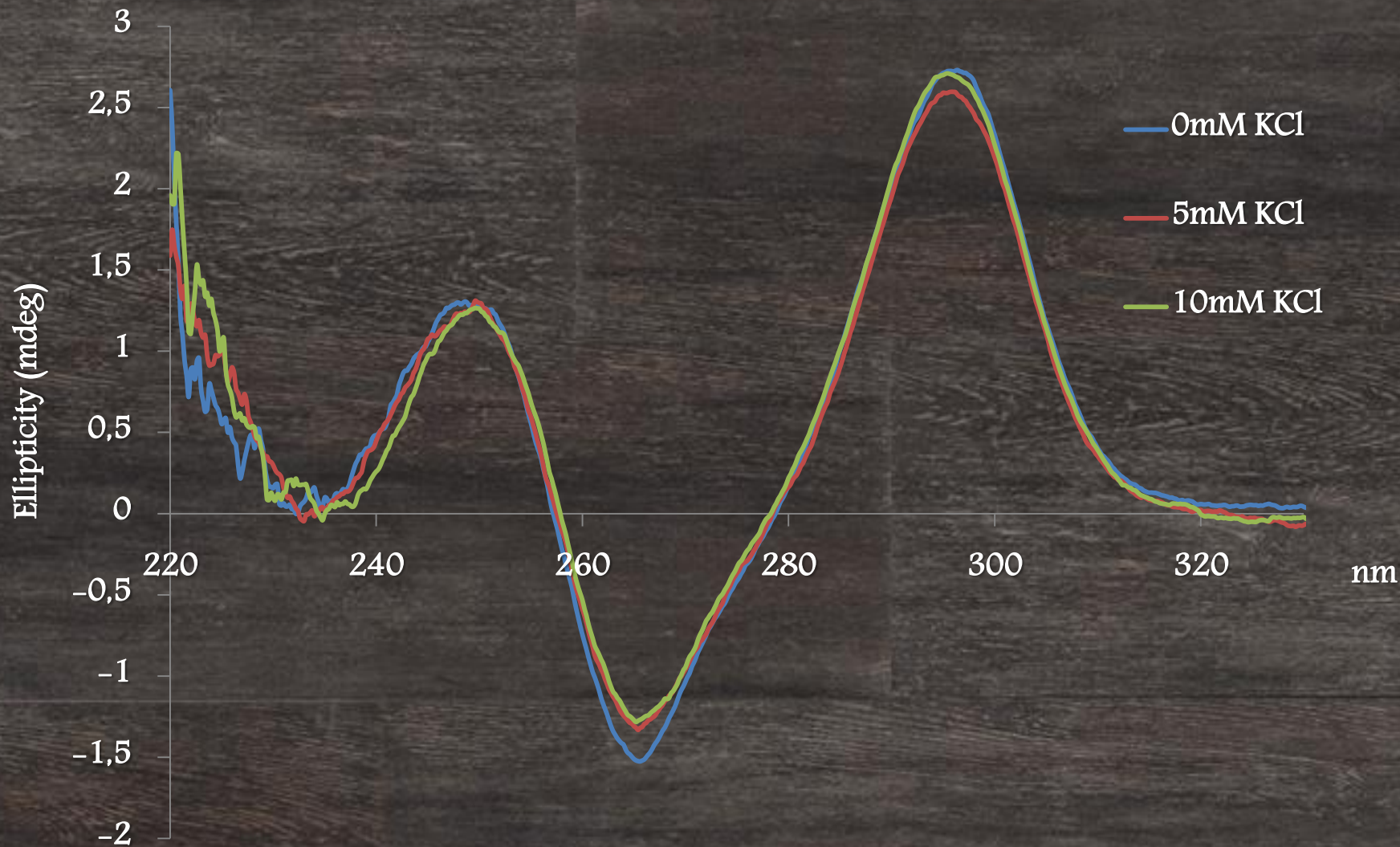
Calibrazione del biosensore PU27 nei range di potassio in cui le cellule sono mantenute e trattate (1.6mM – 6.7mM)

Cercare una correlazione fra sequenza nucleotidica, lunghezza del filamento e stabilità di folding

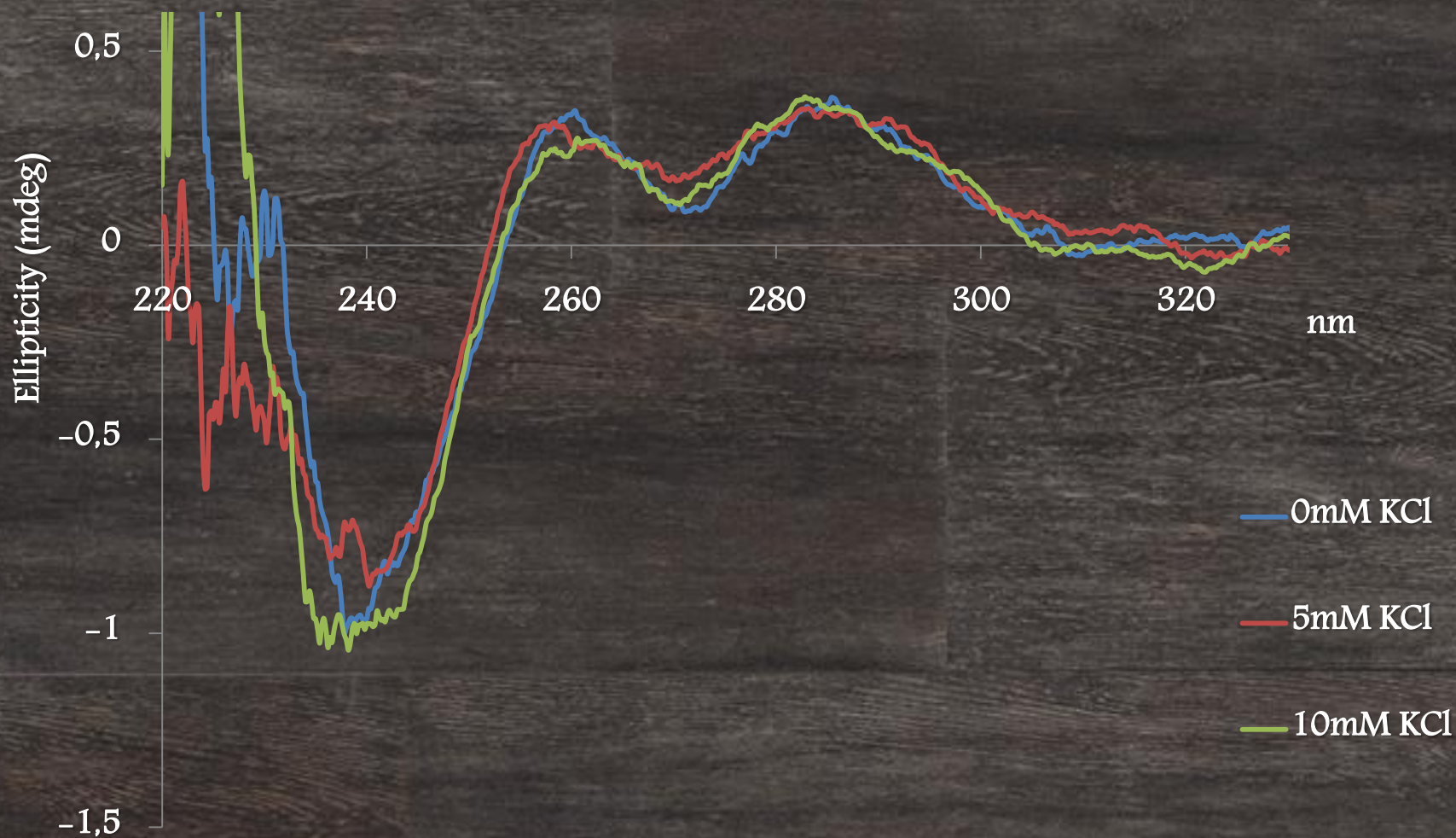
Studio di altre sequenze oligonucleotidiche a DNA ricche in guanina

GRAZIE A TUTTI PER L'ATTENZIONE

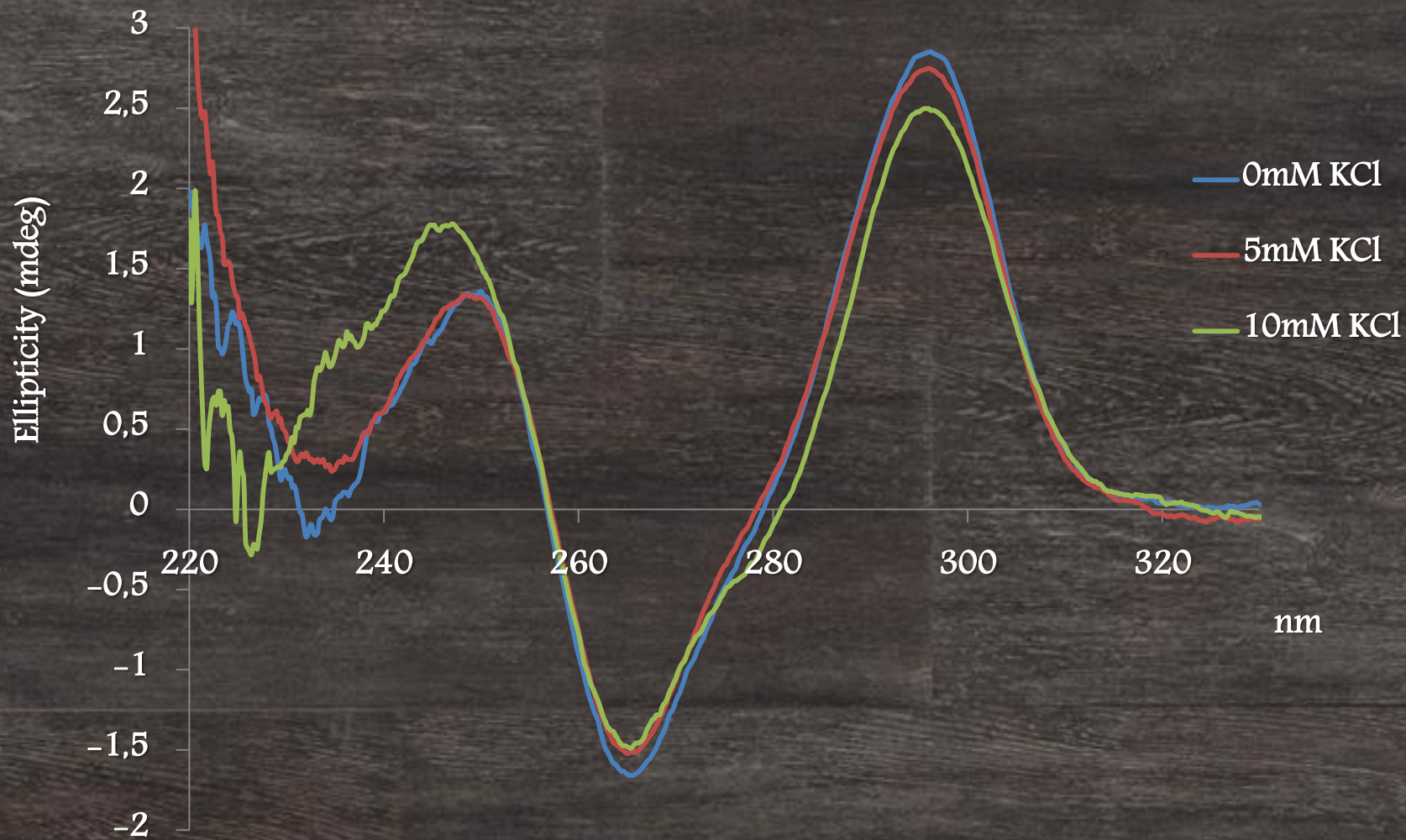
Spettri CD G-quadruplex (40°C)



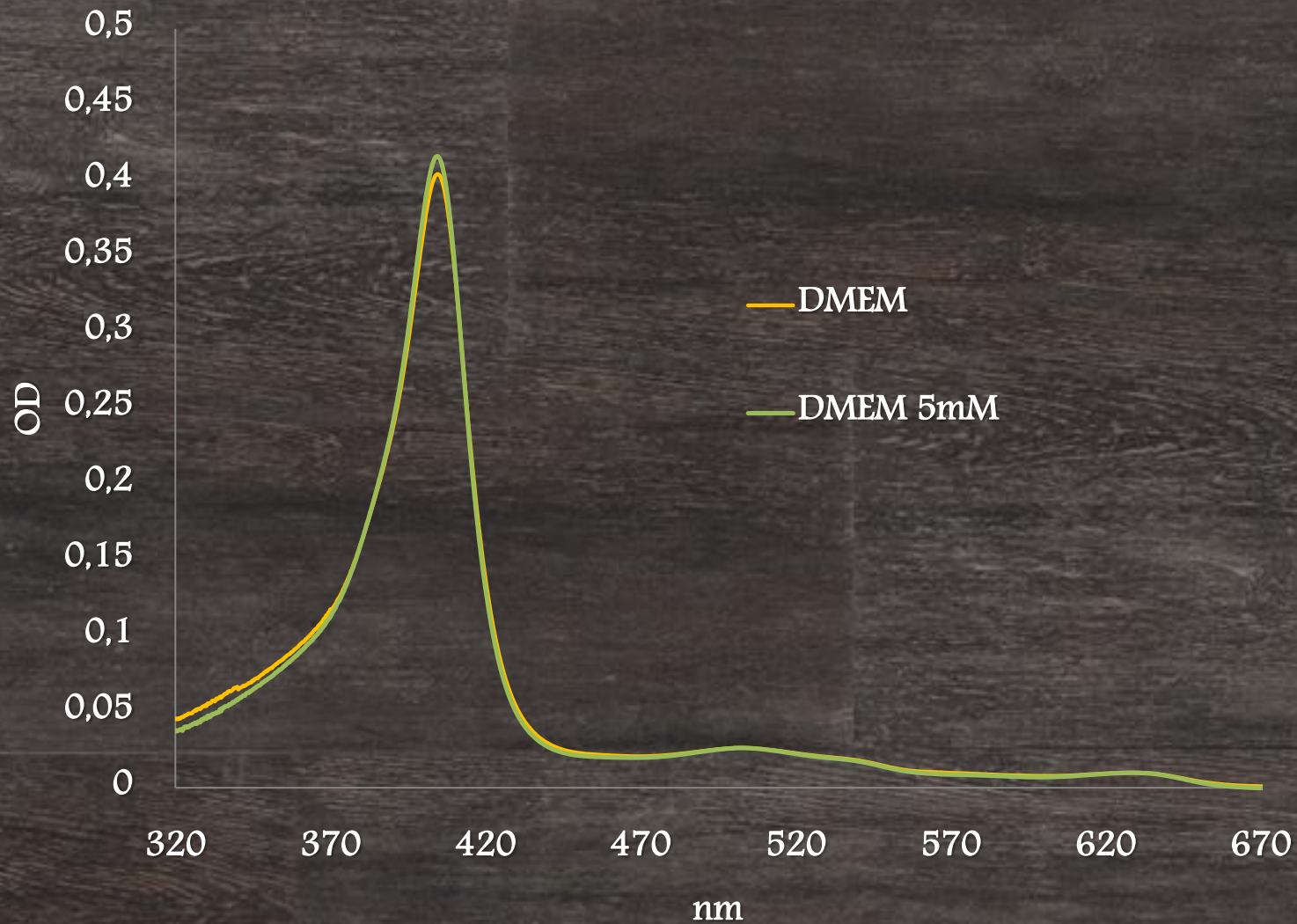
Spettri CD G-quadruplex (80°C)



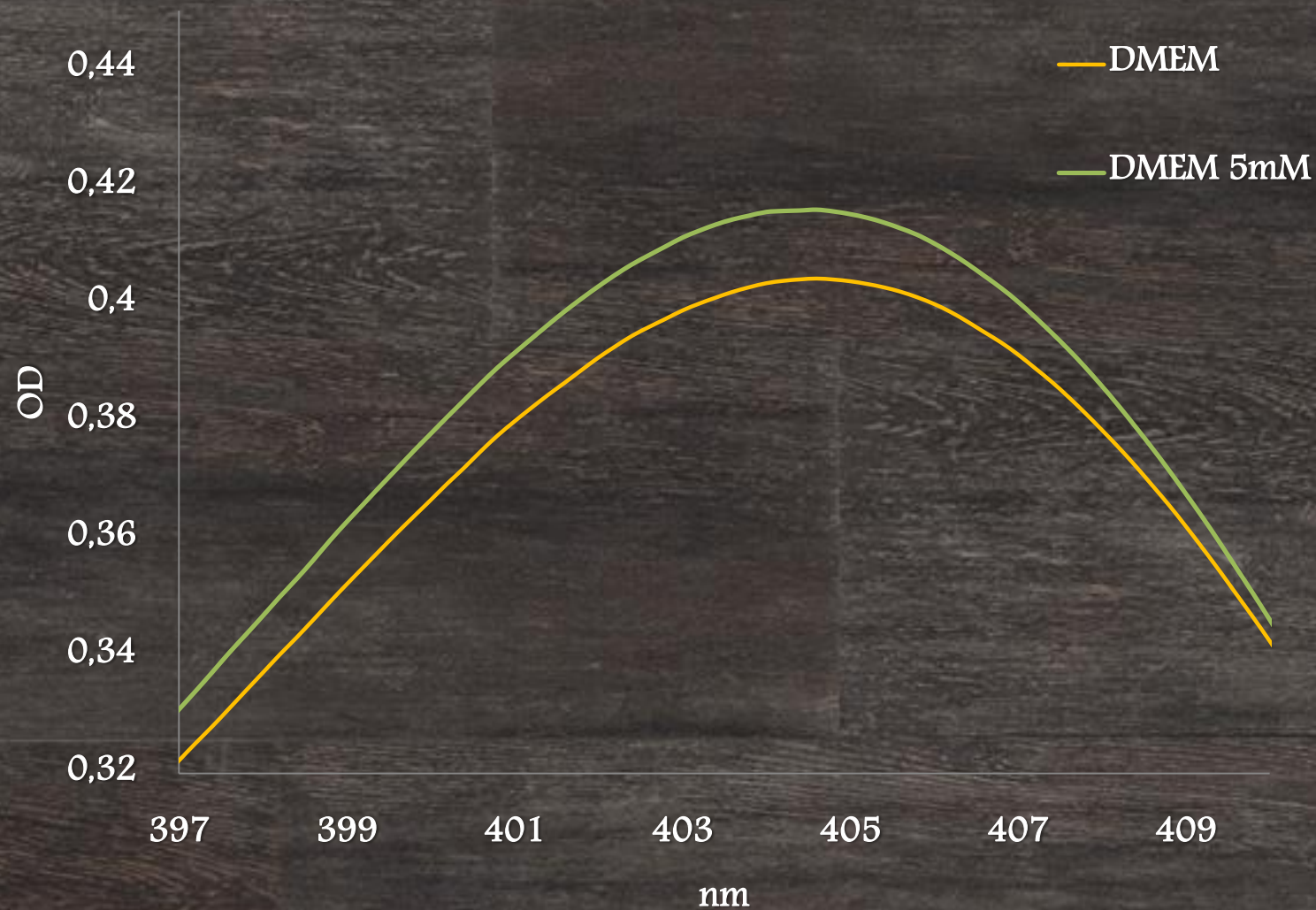
Spettri CD G-quadruplex (40° C back)



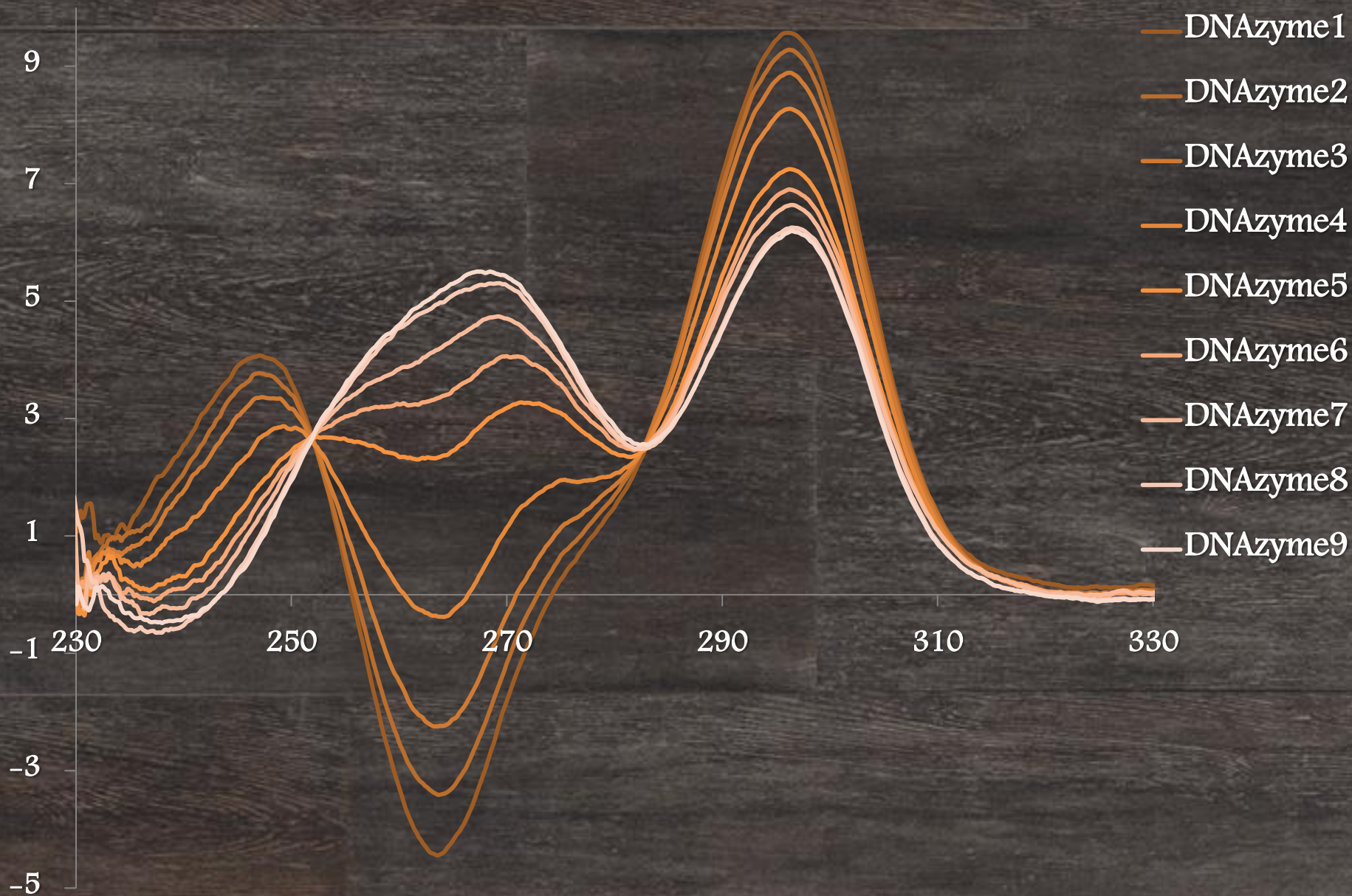
Spettri UV-VIS DNazima



Spettri UV-VIS DNazima

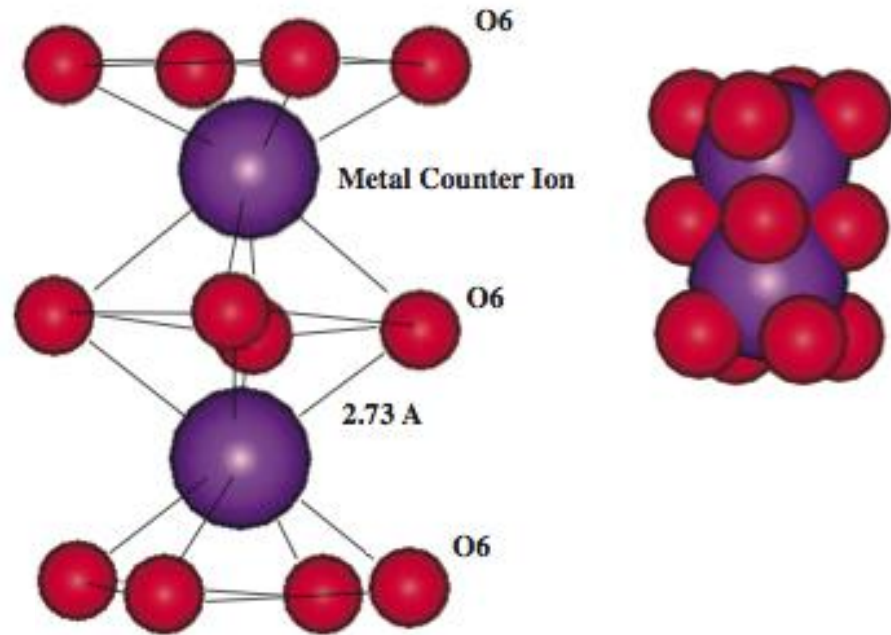


Spettri CD DNazima – 800mM NaCl

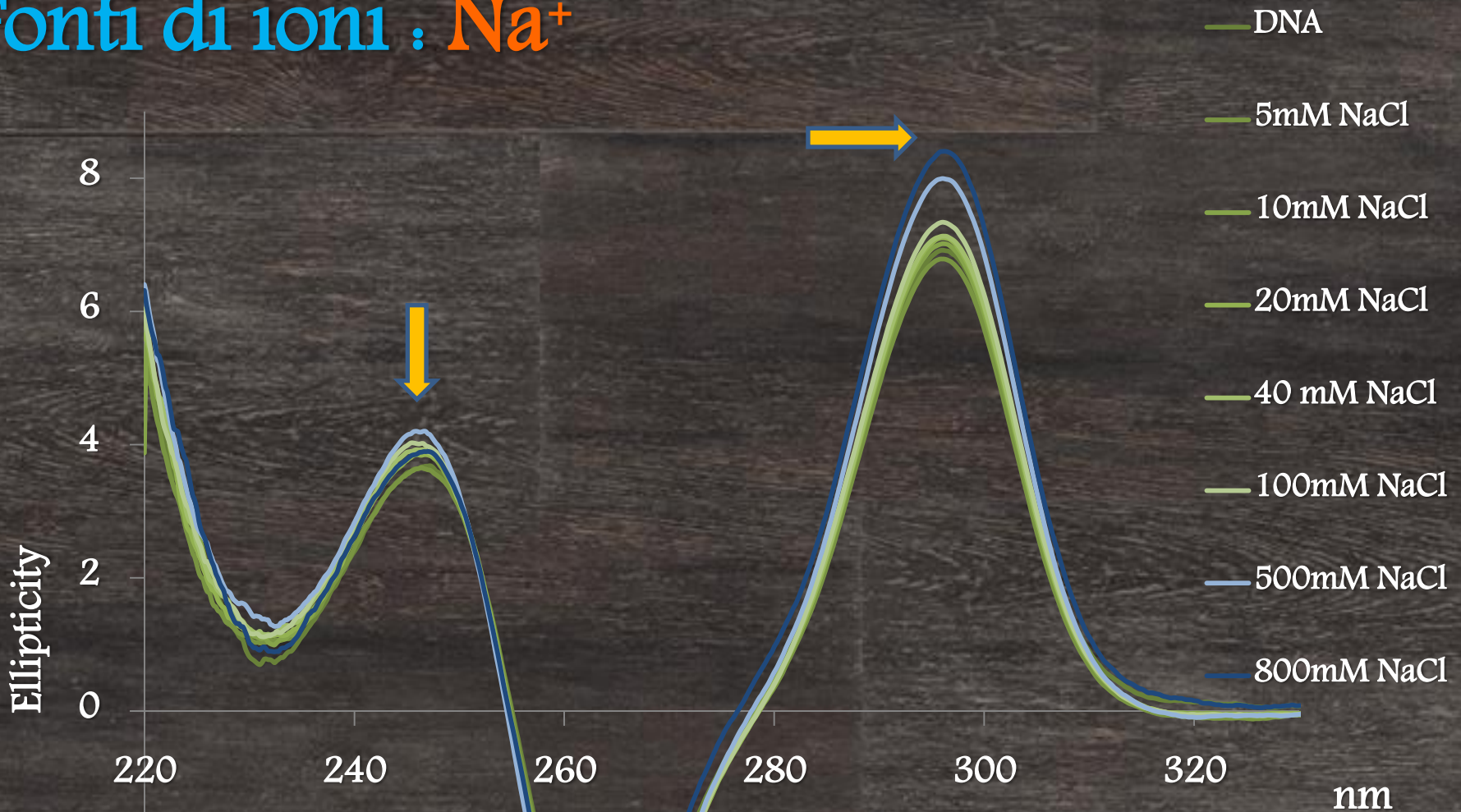


Biosensore – G-quadruplex

Perchè il K^+ ?



Fonti di ioni : Na^+



G-quadruplex foldato in presenza sia di 0mM NaCl e poi titolato

Fonti di ioni Na^+

