# DNAzima. un biosensore per gli ioni K+ in soluzioni acquose

#### L. Bruni<sup>1,2,3</sup>, S. Croci<sup>1,2,3</sup>



<sup>1</sup>Centro Fermi – Museo Storico della Fisica e Centro Studi e Ricerche Enrico Fermi – Roma; <sup>2</sup>Dipartimento di Neuroscienze, Unità di Biofisica e Fisica Medica, Università di Parma, <sup>3</sup>Istituto Nazionale Biostrutture e Biosistemi – Roma

Workshop : Biosensori innovativi per l'ambiente e la salute. 14 Novembre 2014 Roma



#### Enzima a DNA

G-quadruplex - apoenzima

Emina – gruppo prostetico

Attività catalitica perossidasica

## Gruppo prostetico - emina

Gruppo prostetico di alcune proteine

Quattro anelli pirrolici

Ponti metinici

Atomo di Fe che coordina 4 N

emina



Seguire il folding del G-quadruplex, tramite spettroscopia UV-VIS e spettroscopia di fluorescenza

## Apoenzima – G-quadruplex

#### G-quadruplex





**Guanine Tetrad** 

A-GGG-T-GGG-GA-GGG-T-GGG-GA

Quadruplex-Forming Sequence (QFS)



G Quadruplex

Cationi monovalenti  $K^+ > Na^+ > Rb^+ > NH_4^+ > Cs^+ > Li^+$ 

Fundamentals of Quadruplex Structures G. N. Parkinson

## Apoenzima – G-quadruplex

#### Perchè il K+?



Figure 5 Counter ion coordination between tetrad bases shown with twist between bases. (a) Potassium metal ion is shown coordinated between eight carbonyl oxygens with an average 2.73 coordination distance. (b) A space filling model with potassium counter ions

#### Apoenzima – G–quadruplex



Phthalocyanines: a new class of G-quadruplex-ligands with many potential applications. H. Yaku et al., Molecules 2012.

## Apoenzima – G-quadruplex



Chem. Comm., 1467 (2008)





DNAzima utilizzato come biosensore per misurare la concentrazione di K<sup>+</sup> in soluzioni acquose

#### Range di concentrazione

Sensibilità

Limite di rivelazione

## DNAzima

DNA-enhanced peroxidase activity of a DNA aptamer-hemin complex

Paola Travascio, Yingfu Li and Dipankar Sen Chemistry and Biology 5.505–517

DNA PS2.M 5'-GTGGGTAGGGCGGGTTGG-3'

Buffer di folding 30'

G-quadruplex + emina 30' DNAzima DNAzima



DNAzima foldato in presenza di [Na+] - 30 mM – buffer di folding

## TECNICHE

#### Dicroismo Circolare

#### Formazione G-quadruplex e topologia

#### Formazione DNAzima (legame emina G-quadruplex)

Spettroscopia UV-VIS

## Fonti di ioni K<sup>+</sup>

K.Cl 10 mM - 100 mM CD; 0 mM - 100 mM UV-VIS

### Spettri CD G-quadruplex









Abs



Abs





Abs







## Fonti di ioni K<sup>+</sup> KCL 5mM – 100 mM CD; 0 mM – 100 mM UV–VIS

 $\frac{\mathbf{K} \cdot \mathbf{D} - \mathbf{rib}}{5} 5 \mathbf{m} \mathbf{M} = 15 \mathbf{m} \mathbf{M} \mathbf{K}^{+}$ 



Abs



## Fonti di ioni K+



Hs 578T carcinoma mammario umano con crescita in adesione

#### Trattato con K: D-rib 5mM 48h

### DNAzima come biosensore di ioni K<sup>+</sup>

### Fonti di ioni K<sup>+</sup>

KCL 5mM – 100 mM CD; 0 mM – 100 mM UV–VIS

 $K_{\bullet}D-rib 5mM = 15 mM K^{+}$ 

Surnatante linea cellulare Hs 578T trattata con K.D-rib 5mM per 48h

DMEM trattato con K.D-rib 5mM incubato a 37° 48h (DMEM [K+] = 5mM)

Surnatante linea cellulare Hs 578T di controllo

DMEM incubato a  $37^{\circ} 48h$  (DMEM [K<sup>+</sup>] = 5mM)











#### Ed in presenza di Na<sup>+</sup> che cosa accade?

#### [Na<sup>+</sup>] ~ 30 mM Nel buffer di spettroscopia

#### [Na<sup>+</sup>] nel mezzo extracellulare 155 mM













Abs

## CONCLUSIONI

Folding del DNAzima in presenza di diverse tipologie di soluzioni, anche complesse (DMEM e surnatante cellulare);

Biosensore sensibile solo nell'intervallo 0 mM KCl – 0.5 mM di KCl anche in presenza di altri ioni (es.  $[Na^+] \sim 30$  mM) con spettroscopia UV–VIS; con CD abbiamo differenze significative tra 30 mM di KCl e 40 mM KCl con il solo G–quadruplex;

Sia il CD che la spettroscopia UV–VIS non rilevano differenze di concentrazione di K<sup>+</sup> tra DMEM trattato e surnatante cellulare trattato;

### **Prospettive Future**

Studio della sensibilità del biosensore attraverso aumento del rapporto tra variazione del valore misurato e la variazione del valore reale (concentrazione di K<sup>+</sup>) modificando la concentrazione degli ioni Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup>;

Calibrazione del biosensore all'interno del range di concentrazioni di lavoro

Studio dettagliato del ruolo strutturale dello ione Na+