



Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie
Instytut Biologii

mgr Katarzyna Cecylia Ratajczak

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

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

Rozprawa doktorska

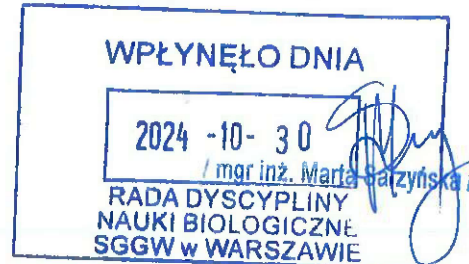
Doctoral thesis

Rozprawa doktorska wykonana pod kierunkiem

dr hab. Magdaleny Stobieckiej, prof. SGGW

Instytut Biologii

Katedra Fizyki i Biofizyki



Warszawa rok 2024

Oświadczenie promotora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że niniejsza rozprawa została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego doktora.

Data 29.10.2024r. Czytelny podpis promotora Magdalena Stobrecka

Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej

Świadoma odpowiedzialności prawnej, w tym odpowiedzialności karnej za złożenie fałszywego oświadczenia, oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została napisana przez mnie samodzielnie i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami prawa, w szczególności z ustawą z dnia 4 lutego 1994 r. o prawie autorskim i prawach pokrewnych (tj. z dnia 28 października 2022 r., Dz.U. z 2022 r. poz. 2509 ze zm.)

Oświadczam, że przedstawiona rozprawa nie była wcześniej podstawą żadnej procedury związanej z uzyskaniem stopnia naukowego doktora.

Oświadczam ponadto, że niniejsza wersja rozprawy jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną.

Przyjmuję do wiadomości, że rozprawa doktorska poddana zostanie procedurze antyplagiatowej.

Data 29.10.2024r. Czytelny podpis autora rozprawy Katarzyna Zatajczak

Praca doktorska realizowana była w Katedrze Fizyki i Biofizyki, Instytutu Biologii, Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, w ramach:

grantu OPUS-13 – nr 2017/25/B/ST4/01362, pt. *„Biosensory oparte o egzosomy - nowe narzędzia w badaniach przesiewowych i diagnostyce raka oraz system do celowego dostarczania leków”*

oraz

grantu PRELUDIUM-19 – nr 2020/37/N/ST4/02567, pt. *„Modulacja produkcji ATP przy użyciu inhibitorów glikolizy w komórkach rakowych monitorowanej za pomocą nowych fluorescencyjnych systemów bioczułnikowych opartych na aptamerach”*.

Granty zostały przyznane przez Narodowe Centrum Nauki (NCN) w Krakowie.

Składam najserdeczniejsze podziękowania mojej Pani Promotor
dr hab. Magdalenie Stobieckiej, prof. SGGW
za bezcenne wsparcie naukowe, pomocne wskazówki i uwagi,
wyzwalanie pozytywnej energii, a szczególnie za motywację i budowanie
przeświadczenia, że wszystko jest możliwe do osiągnięcia, nawet to, co wydaje się poza
naszym zasięgiem.

Dziękuję również
Pracownikom Katedry Fizyki i Biofizyki
za możliwość realizacji badań w przyjaznej i życzliwej atmosferze,

a przede wszystkim
dr. hab. Sławomirowi Jakiele, prof. SGGW
za nieocenioną pomoc naukową i merytoryczną

oraz **dr. Piotrowi Olejnikowi i mgr. inż. Hubertowi Grelowi**
za wspólne godziny spędzone w laboratorium, pasjonujące dyskusje
oraz towarzyszący nam uśmiech na co dzień.

Rodzicom i siostrze

za motywację, cierpliwość
oraz wiarę w moje możliwości.

Babci za nieustające wsparcie,
pomimo dzielącej nas odległości...

Spis treści

Streszczenie	13
Abstract.....	15
Lista publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej	17
Wykaz najważniejszych skrótów	19
I. Wstęp teoretyczny.....	21
1. Choroby nowotworowe.....	21
2. Nowotwór jelita grubego.....	24
3. Cechy nowotworów	24
4. Diagnostyka chorób nowotworowych	26
5. Potencjalne biomarkery nowotworowe.....	28
5.1. Surwiwina	28
5.2. Adenozyno-5'-trifosforan.....	30
6. Spektroskopia fluorescencyjna	33
7. Fluorescencyjne rezonansowe przeniesienie energii	34
8. BioczuJNIKI	35
8.1. Aptamery.....	36
8.2. Sondy nukleotydowe typu „sygnalizator molekularny”	38
9. Nanonośniki.....	40
9.1. Liposomy	40
9.2. Tlenek grafenu.....	41
10. Przykłady zastosowania fluorescencyjnych sond do wykrywania surwiwiny oraz adenozyno-5'-trifosforanu	42
II. Cel rozprawy doktorskiej, zakres badań i hipotezy	45
1. Cel rozprawy doktorskiej i zakres badań	45
2. Hipotezy	47

III. Materiały i metody badań	48
1. Materiały.....	48
1.1. Odczynniki	48
1.2. Linie komórkowe.....	48
1.3. Charakterystyka sond i oligonukleotydów.....	48
2. Metody badań	49
2.1. Pomiary fluorymetryczne.....	49
2.2. Hodowla komórek	49
2.3. Transfekcja komórek	50
2.4. Aparatura i oprogramowanie.....	51
IV. Omówienie najważniejszych wyników otrzymanych podczas wykonywania prac eksperymentalnych	52
Podsumowanie	61
Bibliografia	63
Publikacje stanowiące rozprawę doktorską oraz oświadczenia współautorów	79

Streszczenie

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 biocujnikowych opartych na jednoniciowych sondach oligonukleotydowych, które zastosowano do wykrywania potencjalnych biomarkerów nowotworowych: (i) ekspresji genu surwiwiny na poziomie mRNA oraz (ii) monitorowania poziomu stężenia adenozy-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 biocujnikowego opartego o aptamer, który wiąże się z ATP.

Zakres badań obejmował opracowanie oraz testowanie systemów biocujnikowych 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.

Słowa kluczowe: sondy oligonukleotydowe, ATP, surwiwina, inhibitory syntazy ATP i glikolizy, spektroskopia fluorescencyjna

Abstract

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.

Keywords: oligonucleotide probes, ATP, survivin, ATP synthase and glycolysis inhibitors, fluorescence spectroscopy

Lista publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej

P1. **Ratajczak K.**, Kraziński B.E., Kowalczyk A.E., Dworakowska B., Jakiela S., Stobiecka M.; Hairpin-Hairpin Molecular Beacon Interactions for Detection of Survivin mRNA in Malignant SW480 Cells, *ACS Applied Materials and Interfaces*, (2018) 10(20), 17028-17039
doi: 10.1021/acsami.8b02342

IF*₂₀₁₈: 8,456

Cytowania*: 50

Punkty*_{MNiSW}: 40

P2. **Ratajczak K.**, Kraziński B.E., Kowalczyk A.E., Dworakowska B., Jakiela S., Stobiecka M.; Optical biosensing system for the detection of survivin mRNA in colorectal cancer cells using a graphene oxide carrier-bound oligonucleotide molecular beacon, *Nanomaterials*, (2018) 8(7), 510
doi: 10.3390/nano8070510

IF*₂₀₁₈: 4,034

Cytowania*: 57

Punkty*_{MNiSW}: 35

P3. Stobiecka M., **Ratajczak K.**, Jakiela S.; Toward early cancer detection: Focus on biosensing systems and biosensors for an anti-apoptotic protein survivin and survivin mRNA, *Biosensors and Bioelectronics*, (2019) 137, 58-71
doi: 10.1016/j.bios.2019.04.060

IF*₂₀₁₉: 10,257

Cytowania*: 77

Punkty*_{MEiN}: 200

P4. **Ratajczak K.**, Łukasiak A., Grel H., Dworakowska B., Jakiela S., Stobiecka M.; Monitoring of dynamic ATP level changes by oligomycin-modulated ATP synthase inhibition in SW480 cancer cells using fluorescent “On-Off” switching DNA aptamer, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, (2019) 411(26), 6899-6911
doi: 10.1007/s00216-019-02061-0

IF*₂₀₁₉: 3,637

Cytowania*: 35

Punkty*_{MEiN}: 70

P5. **Ratajczak K.**, Stobiecka M.; DNA Aptamer Beacon Probe (ABP) for Monitoring of Adenosine Triphosphate Level in SW480 Cancer Cells Treated with Glycolysis Inhibitor 2-Deoxyglucose, *International Journal of Molecular Sciences*, (2023) 24(11), 9295

doi: 10.3390/ijms24119295

IF*₂₀₂₃: 4,9

Cytowania*: 6

Punkty*_{MEiN}: 140

*wartość wskaźnika IF oraz punkty MEiN (dawniej MNiSW) podane zgodnie z rokiem publikacji, cytowania podane na dzień: 25.10.2024 według bazy Scopus.

Wykaz najważniejszych skrótów

Apt(ATP)	-	Sonda aptamerowa (ang. <i>Aptamer ATP</i>)
2-DG	-	2-deoksy-D-glukoza (ang. <i>2-deoxy-D-glucose</i>)
ABP	-	Sonda aptamerowa (ang. <i>Aptamer beacon probe</i>)
ATP	-	Adenozyno-5'-trifosforan (ang. <i>Adenosine-5'-triphosphate</i>)
CCD 841 CoN	-	Linia komórkowa ludzkich komórek nabłonka okrężnicy (ang. <i>Human normal colon epithelial cells</i>)
CTP	-	Cytydino-5'-trifosforan (ang. <i>Cytidine-5'-triphosphate</i>)
Dabcyl	-	Kwas 4-(4'-dimetylo-aminofenyloazo)benzoesowy (ang. <i>4-((4'-(dimethylamino)phenyl)azo)benzoic acid</i>)
DMEM	-	Medium hodowlane, Dulbecco zmodyfikowane przez Eagle'a (ang. <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)
EMEM	-	Medium hodowlane, minimalna niezbędna pożywka Eagle'a (ang. <i>Eagle's minimal essential medium</i>)
FAM	-	6-Karboksyfluoresceina (ang. <i>6-Carboxyfluorescein</i>)
FRET	-	Fluorescencyjne rezonansowe przeniesienie energii (ang. <i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>)
GO	-	Tlenek grafenu (ang. <i>Graphene oxide</i>)
GTP	-	Guanozyno-5'-trifosforan (ang. <i>Guanosine-5'-triphosphate</i>)
I_{FL}	-	Intensywność fluorescencji (ang. <i>Fluorescence intensity</i>)
j.u.	-	Jednostki umowne (ang. <i>Arbitrary units</i>)
Joe	-	5'-dichlorodimetoksyfluoresceina (ang. <i>5'-dichloro-dimethoxy-fluorescein</i>)

Lip	-	Lipofektamina (ang. <i>Lipofectamine</i>)
MB	-	Sonda nukleotydowa typu „sygnaizator molekularny” (ang. <i>Molecular Beacon</i>)
mRNA	-	RNA matrycowy, kwas rybonukleinowy matrycowy (ang. <i>messenger RNA</i>)
OMC	-	Oligomycyna (ang. <i>Oligomycin</i>)
S _t	-	Oligonukleotyd komplementarny do „pętli” sondy (ang. <i>Complementary oligonucleotide, target strand</i>)
S _{t-1}	-	Oligonukleotyd z jednym niekomplementarnym do „pętli” sondy nukleotydem (ang. <i>Target strand with 1-mismatch</i>)
S _{t-2}	-	Oligonukleotyd z dwoma niekomplementarnymi do „pętli” sondy nukleotydami (ang. <i>Target strand with 2-mismatches</i>)
S _{t-nc}	-	Oligonukleotyd niekomplementarny do „pętli” sondy (ang. <i>Noncomplementary oligonucleotide, noncomplementary target strand</i>)
Sur	-	Surwiwina (ang. <i>Survivin</i>)
SW480	-	Linia komórkowa ludzkich komórek nabłonka gruczolakoraka okrężnicy (ang. <i>Human colon cancer cells</i>)
tDNA	-	Docelowy oligonukleotyd, docelowy jednoniciowy fragment DNA (ang. <i>target DNA</i>)

I. Wstęp teoretyczny

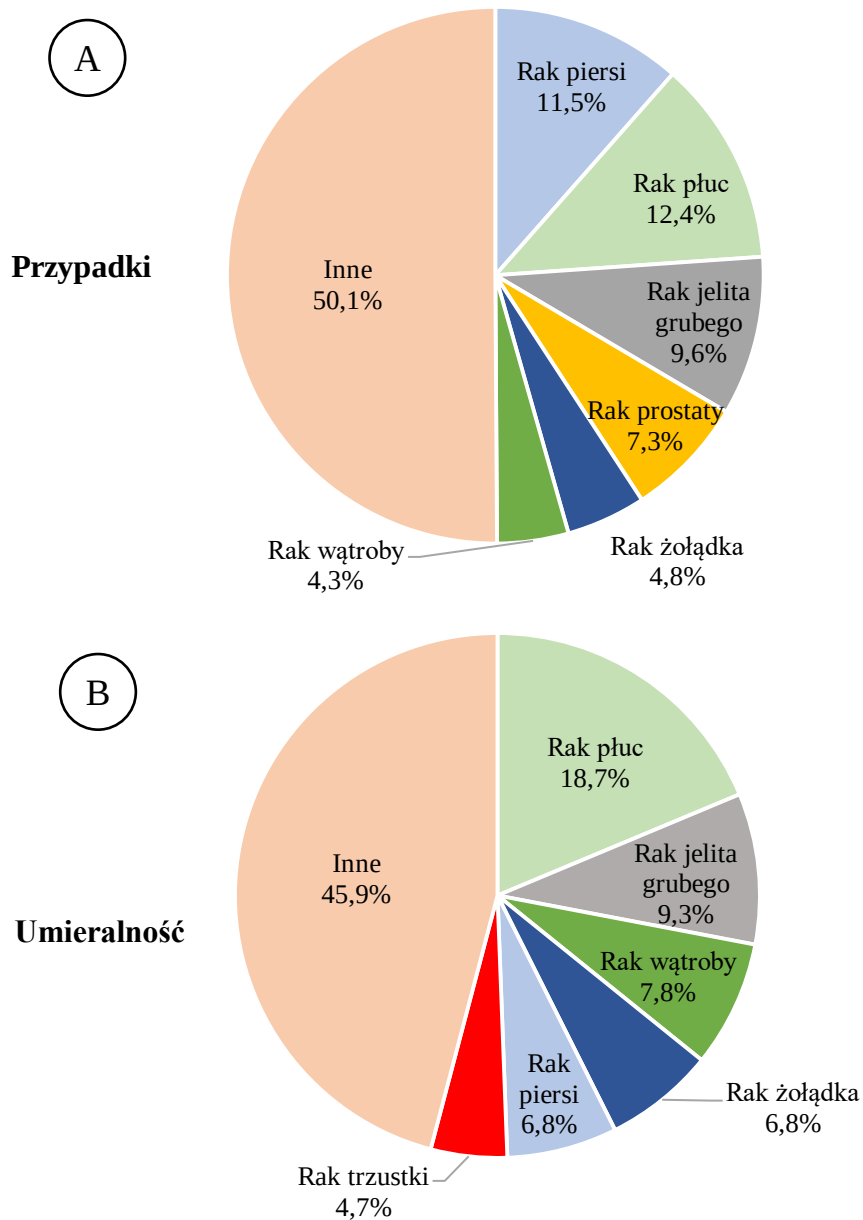
1. Choroby nowotworowe

Choroby nowotworowe są silnie związane z niekontrolowanym oraz nieprawidłowym podziałem komórek organizmu, jak również z unikaniem przez nie apoptozy. Istnieje ponad 100 typów nowotworów, sklasyfikowanych zgodnie z pierwotnym umiejscowieniem w tkankach. Pod względem zachowania biologicznego, można rozróżnić zmiany niezłośliwe (łagodne) oraz złośliwe. Nowotwór łagodny pozostaje w swojej pierwotnej lokalizacji, nie powoduje nacieków na okoliczne tkanki oraz nie rozprzestrzenia się do odległych miejsc w ciele gospodarza. Inaczej jest ze zmianami złośliwymi. Mogą one naciekać na okoliczne zdrowe tkanki. Potrafią również rozprzestrzeniać się po całym ciele poprzez układ krwionośny lub układ limfatyczny, tworząc ogniska wtórne, tzw. przerzuty. Można wyróżnić jeszcze zmiany o złośliwości miejscowej. Są to nowotwory, które nie mają zdolności do dawania przerzutów, jednakże ognisko pierwotne zachowuje się jak zmiana złośliwa, która może powodować naciekania na okoliczne prawidłowe tkanki. Ze względu na rodzaj komórek, z których wywodzą się nowotwory, można wyróżnić: raki (nowotwory złośliwe komórek nabłonka, obejmują około 90% nowotworów ludzkich), mięsaki (nowotwory tkanek miękkich, tj. łącznej: tłuszczowej, chrzęstnej czy kostnej) oraz chłoniaki i białaczki (nowotwory układu krążenia: limfy i krwi, które stanowią około 8% nowotworów ludzkich). Nowotwory klasyfikowane są również według narządów, z których się wywodzą. Wyróżniamy raka płuc, raka piersi, raka jelita grubego czy raka wątroby.

Zdolność nowotworów złośliwych do tworzenia przerzutów sprawia, że choroba ta może być trudna do wyleczenia, a jej rokowania gorsze niż dla nowotworu zlokalizowanego. Rozprzestrzenianie się zmian złośliwych do odległych miejsc ciała często osłabia lub uniemożliwia ich leczenie miejscowe. Zmiany łagodne można zwykle usunąć chirurgicznie (Cooper, 2000; Sapierzyński, 2012).

Według statystyk przedstawionych przez Światową Organizację Zdrowia (ang. *World Health Organization, WHO*) w 2019 roku, choroby układu krążenia i choroby nowotworowe przyczyniły się do największej liczby zgonów na świecie (WHO¹, 2023; Wilcox i wsp., 2024). W Polsce według danych o umieralności i zgonach opublikowanych przez Główny Urząd Statystyczny (GUS), w 2021 roku choroby te również były głównymi przyczynami śmierci i odpowiadały za ponad połowę

wszystkich odnotowanych zgonów (Źródło danych GUS, 2022). Według szacunków opracowanych przez Międzynarodową Agencję Badań nad Rakiem, w 112 na 183 kraje choroby nowotworowe są pierwszą bądź drugą najczęstszą przyczyną śmierci, a w kolejnych 23 krajach zajmują trzecie bądź czwarte miejsce (Sung i wsp., 2021). Fakt ten sprawia, że w wielu krajach nowotwory coraz częściej wymieniane są jako główna przyczyna zgonów, przed umieralnością z powodu udaru mózgu czy choroby wieńcowej (Bray i wsp., 2021). W 2022 roku odnotowano 20 mln nowych przypadków oraz prawie 10 mln zgonów na raka. Wśród najczęściej diagnozowanych typów nowotworów można wyróżnić raka płuc (12,4%), piersi (11,5%), jelita grubego (9,6%), prostaty (7,3%) oraz żołądka (4,8%). Natomiast za główną przyczynę zgonów z powodu raka odpowiadają rak płuc (18,7%), jelita grubego (9,3%), wątroby (7,8%) i piersi u kobiet (6,8%) co graficznie przedstawiono na Rysunku 1. Szacuje się, że w 2050 roku globalne obciążenie chorobami nowotworowymi wyniesie ponad 35 mln przypadków. W porównaniu z 2022 rokiem nastąpi wzrost zachorowalności o 75%. Przewiduje się również, że w 2050 roku śmiertelność na choroby nowotworowe wyniesie ponad 18 mln, co oznacza wzrost względem 2022 roku o 80% (WHO², 2022). Gwałtowny wzrost zachorowań oraz zgonów, niewątpliwie jest spowodowany niezdrowymi i szkodliwymi dla organizmu nawykami żywieniowymi, siedzącym trybem życia oraz zwiększającą się długością życia. Wykazano, że w 2019 roku ludzie żyli o ponad 6 lat dłużej w porównaniu z rokiem 2000. Średni czas życia wzrósł do ponad 73 lat w 2019 roku w porównaniu z poziomem prawie 67 lat w 2000 roku (WHO³, 2020). Wydłużony czas życia może więc powodować większą zachorowalność ludzi na różne choroby, w szczególności na choroby nowotworowe.



Rysunek 1. Procentowe przedstawienie nowych przypadków zachorowań (A) oraz umieralności (B) na różne typy chorób nowotworowych w 2022 r. na świecie. Dane podane dla obu płci oraz całego przekroju wiekowego. Źródło: opracowanie własne na podstawie: danych WHO², 2022.

2. Nowotwór jelita grubego

Jednym z najczęściej występujących nowotworów złośliwych na świecie jest rak jelita grubego. Według statystyk Światowej Organizacji Zdrowia w 2022 roku był diagnozowany u co trzeciego pacjenta. Przewiduje się, że w 2050 roku rak jelita grubego zostanie zdiagnozowany u ponad 3,5 mln osób i przyczyni się do ponad 1,84 mln zgonów (WHO², 2022).

Guz głównie jest umiejscowiony w okrężnicy składającej się z: wstępnicy, poprzecznicy i zstępnicy (Deptała, 2017). Według obserwacji, zachorowalność na raka jelita grubego wzrasta wraz z wiekiem. Większość przypadków jest diagnozowana u osób po 50-tym roku życia, a tylko 12% chorych stanowią osoby młodsze (Siegel i wsp., 2020). Wzrost zachorowalności u osób starszych, zwłaszcza seniorów, sugeruje, że nowotwór ten rozwija się w organizmie przez wiele lat nie dając żadnych objawów. Ponadto ludzie młodzi rzadko poddawani są badaniom przesiewowym tj. inwazyjnemu zabiegowi kolonoskopii. Powoduje to, że rak jelita grubego najczęściej jest wykrywany w późnym stadium choroby, a to przyczynia się do niskiej przeżywalności. Mimo zastosowania zaawansowanego leczenia chirurgicznego czy chemioterapii pojawia się znaczący odsetek nawrotów nowotworu u pacjentów już zdiagnozowanych (Mármol i wsp., 2017; Andrew i wsp., 2018). Chemioterapia może dodatkowo wywołać wiele niepożądanych działań i objawów ubocznych związanych z owrzodzeniem przewodu pokarmowego, uszkodzeniem nerek (Ungprasert i wsp., 2015; Jagieła i wsp., 2021), utratą słuchu, szumami usznymi, brakiem równowagi (Rybak i wsp., 2007; Pearson i wsp., 2021), zwiększoną opornością na leczenie (Siddik, 2003; Alfarouk i wsp., 2015), nadciśnieniem, zmęczeniem, reakcjami alergicznymi skóry dłoni i stóp, biegunką (Zaniboni i wsp., 2016), nudnościami i wymiotami (Gupta i wsp., 2021). Sprawia to, że nieustannie poszukuje się nowych, skutecznych i mniej inwazyjnych metod, które mogą mieć swoje zastosowanie we wczesnej diagnostyce i leczeniu raka jelita grubego.

3. Cechy nowotworów

Komórki nowotworowe posiadają mechanizmy zabezpieczające je przed zaprogramowaną śmiercią komórki oraz zdolność do nieograniczonej proliferacji, tworzenia własnego układu naczyniowego, przerzutowania i naciekania okolicznych tkanek, przeprogramowania metabolizmu komórkowego, wymykania się spod nadzoru immunologicznego (Hanahan i Weinberg, 2011; Hanahan, 2022). Rozwój nowotworów

i kancerogeneza są uwarunkowane licznymi procesami, które przedstawiono w **Tabeli 1** (Feitelson i wsp., 2015).

Tabela 1. Wykaz najważniejszych czynników wpływających na kancerogenezę. Źródło: opracowanie własne na podstawie: Feitelson i wsp., 2015.

Czynnik	Wpływ na kancerogenezę
<i>Autofagia</i>	Promowanie przetrwania komórek w warunkach stresu np. niedotlenienia, pod wpływem nasilonej glikolizy, w odpowiedzi na rozregulowaną proliferację
<i>Białka cyklu komórkowego</i>	Promowanie niekontrolowanej proliferacji komórek poprzez nieprawidłową ekspresję białek cyklu komórkowego
<i>Hipoksja</i>	Aktywowanie czynników indukowanych hipoksją (HIFs) promujących podziały macierzystych komórek nowotworowych oraz angiogenezę; wywieranie wpływu na metabolizm komórek nowotworowych
<i>Mikrośrodowisko guza</i>	Wpływ na wzrost nowotworu oraz możliwość przerzutowania dzięki interakcji między komórkami zrębu (np. fibroblastami i komórkami układu odpornościowego) a komórkami nowotworowymi
<i>Nowotworowe komórki macierzyste</i>	Powstawanie i nawrót nowotworu oraz jego rozprzestrzenianie następujące dzięki wysokiej samoodnawialności komórek, wysokiej chemiooporności i ograniczonej apoptozie
<i>Przejście epitelialno-mezenchymalne</i>	Promowanie rozwoju nowotworowych komórek macierzystych

<i>Szlaki transdukcji sygnału</i>	Aktywacja szlaków sygnałowych wspierających niekontrolowane podziały komórek nowotworowych (Wnt, Notch, IGF, PI3K/Akt, NF-κB, Hh)
<i>Zaburzenia hormonalne</i>	Promowanie wzrostu nowotworów hormonozależnych poprzez aktywację estrogenowych i androgenowych ścieżek sygnałowych
<i>Zmiana metabolizmu komórkowego</i>	Wspomaganie przeżycia oraz proliferacji komórek nowotworowych w warunkach stresu np. niedotlenienia i wczesnej karcenogenezy

Uzyskanie wszechstronnego zrozumienia oraz poznania wszystkich mechanizmów molekularnych i komórkowych sprzyjających nowotworzeniu, niewątpliwie przyczyni się do wcześniejszego wykrywania chorób nowotworowych, skutecznej diagnostyki, wdrożenia nowych leków i doboru terapii przeciwnowotworowych, a to zapewni pacjentom większy komfort leczenia, zahamowanie postępu choroby lub całkowite wyleczenie.

4. Diagnostyka chorób nowotworowych

W przypadku nowotworów, wczesna diagnostyka i dobrze dobrana terapia może uratować życie. Badania wykazały, że przeżycie pacjentów znacznie wzrasta, gdy rak zostanie wykryty we wczesnym stadium, ponieważ nowotwór można usunąć chirurgicznie lub wykorzystać łagodniejsze metody leczenia. Średnio 5-letnie przeżycie pacjentów po wykryciu choroby na wczesnym etapie wynosi 91%, podczas gdy na późnym etapie wynosi już tylko 26% (Chen^b i wsp., 2020). Niestety wciąż około 50% nowotworów jest rozpoznawanych w zaawansowanym stadium (Crosby i wsp., 2022). Ogromne znaczenie w leczeniu ma wykrycie nowotworu na możliwie najwcześniejszym etapie rozwoju. Obecnie stosowane badania przesiewowe w kierunku kilku typów nowotworów, takich jak: kolonoskopia, tomografia komputerowa, mammografia, badanie antygenu specyficznego dla prostaty, badanie cytologiczne (Galeś i wsp., 2024) wykazują poważne ograniczenia, wśród których wyróżniamy m.in. inwazyjność, wysoki koszt oraz niską dokładność diagnostyczną na wczesnym etapie choroby. W związku

z tym, wciąż poszukuje się skutecznych, nieinwazyjnych metod badania przesiewowego dla różnych typów nowotworów. Opracowywane i testowane w ostatnich latach nowe systemy do wczesnej diagnostyki, dokładnego określania stopnia zaawansowania choroby, określania odpowiedzi nowotworu na działanie zaproponowanego leczenia np. chemioterapii czy monitorowania postępu choroby, bazujące na wykrywaniu biomarkerów nowotworowych m.in. w płynach ustrojowych pacjentów (tj. krew, mocz, łzy) lub wycinkach tkanek organizmu, stanowią ciekawą alternatywę (Bohunicky i Mousa, 2010; Ahmad i wsp., 2023; Das i wsp., 2024). Biomarkery nowotworowe mogą mieć różne pochodzenie molekularne, tj. DNA (np. onkogeny, specyficzna mutacja, translokacja, amplifikacja lub utrata heterozygotyczności), RNA (np. miRNA) lub białko (np. hormony białkowe, autoprzeciwciała). W **Tabeli 2** wymieniono przykłady powszechnie stosowanych biomarkerów nowotworowych w diagnostyce, monitorowaniu terapii, ocenie skuteczności leczenia oraz w wykluczeniu bądź wczesnym wykryciu nawrotu choroby. Pomimo postępów jakie poczyniono w ostatnich latach, wciąż wiele składowych procesów nowotworzenia nie zostało dogłębnie wyjaśnionych. Sukces terapii nowotworowych silnie związany jest ze znalezieniem odpowiednich biomarkerów nowotworowych, które charakteryzują się wysoką ekspresją i swoistością. Niewątpliwie przyczyni się to do ulepszenia medycyny precyzyjnej, terapii spersonalizowanej oraz przyspieszy klasyfikację kliniczną pacjentów chorych na nowotwory.

Tabela 2. Przykłady najczęściej badanych ludzkich biomarkerów nowotworowych. Źródło: opracowanie własne na podstawie: Bohunicky i Mousa, 2010; Alharthi i wsp., 2021; Gawel i wsp., 2022; Zhou i wsp., 2024.

Nowotwór	Biomarker*
Jajnika	CA125, CEA, hCG, HE4
Jelita grubego	CEA, EGFR, CA19-9, KRAS
Piersi	CA15-3, CA27-29, CEA, EGFR, BRCA1, BRCA2,
Pluc	CEA, KRAS
Prostaty	PSA
Przełyku	SCCA
Trzustki	CA19-9, CA27-29, CEA, KRAS
Wątroby	AFP, PIVKA-II
Żołądka	CA27-29, CEA, ZEB2

*AFP: Alfa-fetoproteina; CA: Antygen nowotworowy; CEA: Antygen karcinoembrionalny; EGFR: Receptor nabłonkowego czynnika wzrostu; hCG: Gonadotropina kosmówkowa; HE4: Podfrakcja czwarta ludzkiego białka z komórek nabłonkowych najądrza; LDH: Dehydrogenaza mleczanowa; NSE: Neuroswoista enolaza; PIVKA-II: Białka indukowane niedoborem witaminy K-II; PSA: Swoisty antygen sterczowy; SCCA: płaskonabłonkowy antygen nowotworowy

5. Potencjalne biomarkery nowotworowe

5.1. Surwiwina

Hamowanie apoptozy w rozwoju nowotworu pełni kluczową rolę. Nie tylko przyspiesza nowotworzenie, ale także prowadzi do oporności na działanie leków (Shahar i Larisch, 2020; Cetraro i wsp., 2022; Shi i wsp., 2024). W związku z tym, wiele terapii przeciwnowotworowych opiera się na przywróceniu skuteczności procesu apoptozy, która pozwoli na wyeliminowanie komórek nowotworowych.

Surwiwina jest białkiem, które należy do rodziny inhibitorów apoptozy (IAP, *ang. inhibitors of apoptosis*). Składa się ze 142 aminokwasów i kodowana jest przez gen BIRC5 zlokalizowany na chromosomie 17q25 zawierający 3 introny i 4 eksony (Warrier i wsp., 2020). Oprócz działania antyapoptycznego, białko to odgrywa rolę w proliferacji, przerzutowaniu i angiogenezie (Sanhueza i wsp., 2015). W największym stopniu ulega ekspresji w fazie G2/M cyklu komórkowego (Zhao i wsp., 2000). Odkrycie i charakterystykę genu surwiwiny w 1997 roku przypisuje się laboratorium Profesora Altieri (Ambrosini i wsp., 1997).

Surwiwina ulega ekspresji w tkankach embrionalnych i płodowych. W zróżnicowanych komórkach dojrzałego organizmu wykazuje natomiast niską ekspresję. Wysoką ekspresję surwiwiny odnotowano w prawie wszystkich ludzkich nowotworach złośliwych, w tym m.in. raku jajnika, raku jelita grubego, raku pęcherza moczowego, raku płuc i raku piersi (Sanhueza i wsp., 2015; Pachimatla i wsp., 2024; Wang^b i Greene, 2024). **Tabela 3**, przedstawia wyniki pomiarów ekspresji surwiwiny na poziomie mRNA i białka, uzyskane za pomocą immunohistochemii i technik reakcji łańcuchowej polimerazy (RT-PCR, RT-qPCR). Przedstawione wyniki wskazują, że surwiwina zarówno na poziomie mRNA jak i białka może stanowić potencjalny biomarker nowotworowy.

Tabela 3 Ekspresja genu surwiwiny w różnych typach nowotworów na poziomie mRNA i białka

Nowotwór	Ekspresja (%)	Literatura
Jajnika	74	(Cohen i wsp., 2003)
Jelita grubego	88,3-93	(Kalliakmanis i wsp., 2010; Hernandez i wsp., 2011)
Piersi	70,7-90,2	(Tanaka i wsp., 2000; Nasu i wsp., 2002)
Płuc	85,5-88,7	(Monzó i wsp., 1999; Cho i wsp., 2015)
Pęcherza moczowego	57,8-94	(Lehner i wsp., 2002; Shariat i wsp., 2007)
Przełyku	80	(Grabowski i wsp., 2003)
Trzustki	76,9-88	(Sarela i wsp., 2000; Satoh i wsp., 2001)
Żołądka	68	(Yu i wsp., 2002)

W ostatnich latach wykazano zwiększoną ekspresję genu surwiwiny na poziomie mRNA (Ratajczak^b i wsp., 2018; Ratajczak^c i wsp., 2018; Chavoshi i wsp., 2023) oraz białka (Hernandez i wsp., 2011; Jakubowska i wsp., 2016) w komórkach nabłonka raka jelita grubego. Chen i wsp. na podstawie uzyskanych wyników stwierdzili, że częstość występowania ekspresji mRNA surwiwiny dobrze koreluje z ekspresją białka (Chen^a i wsp., 2004). Kruszniewska-Rajs i wsp. wykazali zwiększoną ekspresję surwiwiny na poziomie mRNA i białka w surowicy krwi i płynie otrzewnowym u pacjentek z surowiczym rakiem jajnika (Kruszniewska-Rajs i wsp., 2023). Al -Yahya i wsp. pokazali natomiast zwiększoną ekspresję mRNA i białka surwiwiny w komórkach raka piersi (Al-Yahya i wsp., 2024).

Surwiwina jest wykrywana zarówno w cytoplazmie, jak i jądrze komórkowym. W zależności od swojej lokalizacji w komórce wykazuje różne funkcje. W jądrze, białko to reguluje podział komórek, podczas gdy ekspresja cytoplazmatyczna jest związana z cytoprotekcją i żywotnością komórek nowotworowych (Stauber i wsp., 2007). Ponnelle i wsp. wykazali wyższą częstość występowania ekspresji surwiwiny w cytoplazmie

(41%) w porównaniu z jej lokalizacją w jądrze (39%) w komórkach raka jelita grubego (Ponnelle i wsp., 2005). Podobny rezultat otrzymali Jakubowska i wsp. u pacjentów z rakiem jelita grubego. Ekspresja surwiwiny była częstsza w cytoplazmie komórek (81,5%) w porównaniu z jądrem komórkowym (63,1%) (Jakubowska i wsp., 2016). Shintani i wsp. (Shintani i wsp., 2013) oraz Qi i wsp. (Qi i wsp., 2009), wykazali natomiast częstsze występowanie dodatniej ekspresji surwiwiny w jądrze komórkowym w porównaniu z cytoplazmą komórek nowotworowych. Dodatkowo Qi i wsp. zaobserwowali, że nadmierna ekspresja surwiwiny cytoplazmatycznej wiąże się z gorszym rokowaniem, w stosunku do ekspresji surwiwiny jądrowej (Qi i wsp., 2009). Zwiększenie ekspresji surwiwiny zarówno cytoplazmatycznej, jak i jądrowej wskazuje na bardziej agresywne fenotypy nowotworów z zaawansowanymi stadiami choroby, którym stosunkowo często towarzyszą synchroniczne odległe przerzuty (Vay i wsp., 2022). Niestety, nadmierna ekspresja surwiwiny u pacjentów z chorobami nowotworowymi, wiąże się ze zwiększoną opornością na chemioterapię, nawrotami choroby i krótszą przeżywalnością pacjentów (Wang i Greene, 2024). W związku z tym, istotnym wydaje się opracowanie nowych systemów służących do szybkiego wykrywania ekspresji surwiwiny na poziomie mRNA lub białka. Ułatwią one odpowiednie leczenie na najwcześniejszym etapie rozwoju choroby nowotworowej. Ponadto, obniżenie ekspresji surwiwiny w komórkach, może być przedmiotem badań terapii przeciwnowotworowej. W wyniku zastosowania inhibitorów surwiwiny możliwe będzie wznowienie procesu apoptozy komórek i zahamowanie rozwoju nowotworu.

5.2. Adenozyno-5'-trifosforan

Przeprogramowanie głównych szlaków metabolicznych stanowi kluczową cechę większości komórek nowotworowych. Badania przeprowadzone w ciągu ostatniej dekady wykazały, że adaptacje metaboliczne są ściśle wymagane do wzrostu i progresji guza (Herst i wsp., 2022; Nakahara i wsp., 2023). Przeprogramowanie metaboliczne stało się również znakiem rozpoznawczym komórek nowotworowych (Hanahan i Weinberg, 2011). Wykazano, że komórki nowotworowe pozyskują ogromną ilość energii potrzebnej do nieprzerwanej proliferacji, głównie na drodze glikolizy nawet w warunkach normoksji. Zjawisko to zwane jest efektem Warburga (glikolizą tlenową) i zostało zaproponowane przez niemieckiego biochemika Otto Warburga w 1920 roku (Pelicano i wsp., 2006; Hanahan i Weinberg, 2011; Bononi i wsp., 2022). Jego wynikiem jest synteza mleczanu z glukozy w procesie fermentacji mlekowej. Przedstawiony

metabolizm komórek nowotworowych jest odmienny od metabolizmu komórek prawidłowych, które produkują uniwersalne nośniki energii - cząsteczki adenozy-5'-trifosforanu (*ang. Adenozyno-5'-trifosforan, ATP*) na drodze mitochondrialnej fosforylacji oksydacyjnej (*ang. Oxidative phosphorylation, OXPHOS*). Wstępne obserwacje Warburga sugerowały, że metabolizm komórek nowotworowych został zmieniony w wyniku uszkodzenia mitochondriów. Późniejsze badania wykazały jednak, że mitochondrialna fosforylacja oksydacyjna występuje w wielu liniach komórek nowotworowych. Preferowana glikoliza tlenowa jest więc wynikiem zachodzących mutacji oraz zmian w szlakach sygnałowych, które regulują pobieranie i wykorzystanie glukozy, a nie defektu mitochondriów (Yeung i wsp., 2008; Gogvadze i wsp., 2010; Martins Pinto i wsp., 2023).

Wykazano również, że komórki nowotworowe wywołujące przerzuty do innych narządów wymagają zwiększonej produkcji ATP (Elia i wsp., 2018). Adaptacja metaboliczna ogranicza się więc nie tylko do metabolizmu glukozy. Wiąże się również z uzależnieniem komórek od dodatkowych składników odżywczych, w tym aminokwasów i lipidów, które służą jako inne źródła energii niż cukier. Badania przeprowadzone na mysich komórkach raka nabłonka okrężnicy, wykazały specyficzny mechanizm adaptacyjny tych komórek. Komórki powodujące przerzuty do wątroby uwalniały kinazę kreatynową typu B do przestrzeni zewnątrzkomórkowej wątroby, która katalizowała reakcję kreatyny produkowanej przez wątrobę i zewnątrzkomórkowego ATP. Prowadziło to do wytworzenia fosfokreatyny i ADP. Fosfokreatyna była następnie wychwytywana przez komórki przerzutowe raka okrężnicy i wykorzystywana do wewnątrzkomórkowej fosforylacji ADP do ATP (Loo i wsp., 2015; Bergers i Fendt, 2021).

Xie i wsp. wykazali, że rodzaj metabolizmu komórek nowotworowych silnie zależy od środowiska. W normalnych warunkach hodowli komórkowej dominuje efekt Warburga. Po dodaniu kwasu mlekowego do pożywki hodowlanej i stworzeniu warunków kwasicy mleczanowej, komórki rakowe wykazują fenotyp nieglikolityczny. Dominuje wtedy zużycie tlenu i wytwarzanie znikomych ilości mleczanu. Pokazuje to wyjątkową zdolność komórek nowotworowych do przystosowania się do zmieniającego środowiska, co umożliwia ich przeżywalność i rozwój (Xie i wsp., 2014).

Ostatnie badania wykazały, że w niektórych typach nowotworów tj. białaczkach, chłoniakach, gruczolakoraku przewodowym trzustki, czerniaku z wysokim podtypem

OXPHOS i raku endometrium, może wystąpić wytwarzanie cząsteczek ATP podczas mitochondrialnej fosforylacji oksydacyjnej nawet podczas aktywnej glikolizy (Ashton i wsp., 2018). Mostoslavsky i wsp. wskazali, że komórki, które przeprowadzały glikolizę nie dzieliły się. Ich głównym zadaniem była ochrona przed nadmierną akumulacją reaktywnych form tlenu oraz wspieranie nowotworowych komórek macierzystych. Prowadziło to do rozrostu nowotworu (Sebastian i wsp., 2022).

Zrozumienie w jaki sposób komórki nowotworowe regulują metabolizm, może być więc kluczem do skutecznego ukierunkowania terapii przeciwnowotworowej (Li^a i wsp., 2020).

Ze względu na wysokie stężenie ATP w mikrośrodku guza, może stać się ono potencjalnym celem terapeutycznym w leczeniu chorób nowotworowych (Fiorillo i wsp., 2021). Wykazano podwyższony zewnątrzkomórkowy poziom ATP w zakresie 100 μ M w mikrośrodku nowotworu, podczas gdy w prawidłowych warunkach fizjologicznych, ATP występuje w znikomych ilościach od 10 do 100 nM (Gilbert i wsp., 2019; Mimoto i wsp., 2020). Monitorowanie produkcji ATP wydaje się więc być ważnym aspektem w ocenie progresji, a także agresywności nowotworu oraz określenia stadium jego rozwoju.

Terapia lekowa jest ważną metodą leczenia pacjentów chorych na nowotwory. Lekooporność poważnie wpływa na czas przeżycia i jakość życia pacjentów. Coraz więcej dowodów wskazuje, że główne szlaki metaboliczne komórek nowotworowych, zarówno fosforylacja oksydacyjna jak i glikoliza, mogą leżeć u podstaw oporności na leki i wywierać znaczący wpływ na skuteczność terapii przeciwnowotworowych (Marcucci i Rumio, 2021; Zhao i wsp., 2022). Leczenie ukierunkowane na fosforylację oksydacyjną oraz glikolizę może w szczególności wyeliminować nowotworowe komórki macierzyste i opóźnić nabycie lekooporności. Wykazano, że zastosowanie inhibitorów mitochondrialnej syntazy ATP oraz glikolizy, zakłóca adaptację metaboliczną komórek nowotworowych. Hamowanie produkcji ATP, może więc prowadzić do skutecznej terapii przeciwnowotworowej (Sheng i wsp., 2024).

Odkryto wiele naturalnych i syntetycznych inhibitorów syntazy ATP. Wśród nich można wymienić, m.in. oligomycynę (*ang. Oligomycin*) oraz aurowertynę B (*ang. Aurovertin B*) (Wang^c i wsp., 2021). Do inhibitorów glikolizy zaliczamy m.in. 2-deoksy-D-glukozę (*ang. 2-deoxy-D-glucose*, 2-DG) i 3-bromopirogronian (*ang. 3-bromopyruvate*, 3-BP) (Cunha i wsp., 2023). Pacheco-Valázquez i wsp. zaobserwowali, że inkubacja komórek MDA-MB-231 i MDA-MB-468 z oligomycyną,

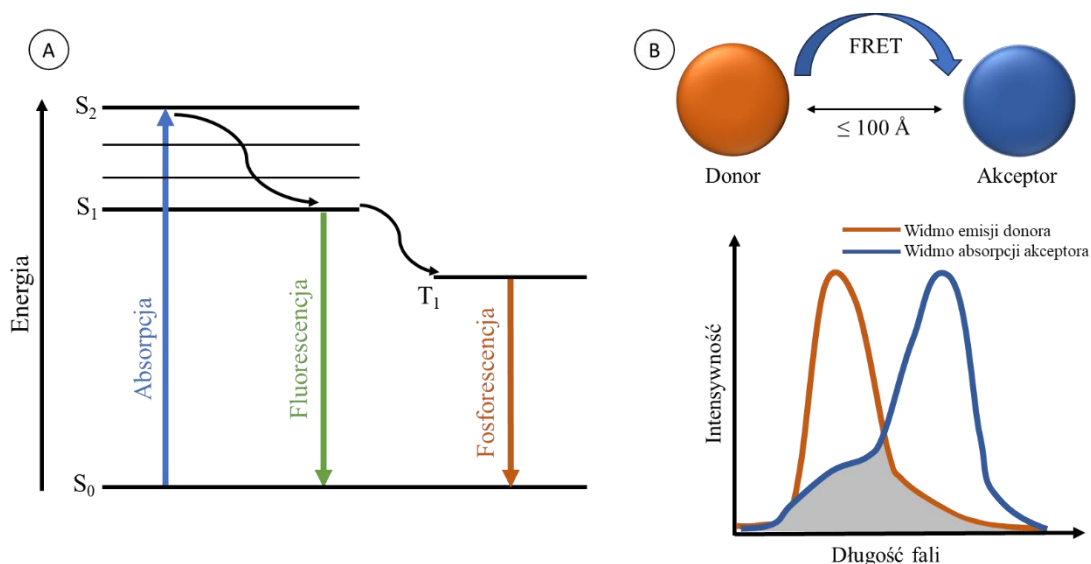
zmniejsza proliferację, a także zdolność do migracji i inwazji komórek będących modelem do badania potrójnie ujemnego raka piersi (Pacheco-Velázquez i wsp., 2018). Podobny wynik otrzymali Lin i wsp. pracując na komórkach raka jelita grubego SW480 i SW620 (Lin i wsp., 2018). W przypadku aurowertyny B, również wykazano silne działanie antyproliferacyjne na komórki MDA-MB-231 (Wu i wsp., 2020). Dodatkowo inhibitor ten umożliwia wykrywanie komórek raka okrężnicy, ponieważ stymuluje ekspresję ligandów NKG2D na komórkach nowotworowych. Wpływa to na rozpoznawanie ich przez komórki NK (*ang. Natural killer cells*, „naturalni zabójcy”) układu odpornościowego (Zhu i wsp., 2018). Simón i wsp. wykazali natomiast, że zastosowanie inhibitora 2-DG powoduje zahamowanie glikolizy w komórkach czerniaka B16-F10 oraz raka piersi MDA-MB-231 i zapobiega metastazie komórek (Simón i wsp., 2024). Badania Lei i wsp. pokazały, że leczenie skojarzone 2-DG z α -TOC (bursztynian α -tokoferolu, *ang. α -tocopheryl succinate*) znacząco zwiększyło skuteczność terapii przeciwnowotworowej, w porównaniu z monoterapią. Badanie to przeprowadzono na komórkach nabłonka raka okrężnicy HT29 (Lei i wsp., 2017). Ponadto, pokazano obiecujące działanie przeciwnowotworowe inhibitora 3-BP w mysich komórkach raka trzustki Panc-2. Inhibitor hamował enzym heksokinazy II (HK2) szlaku glikolitycznego w komórkach nowotworowych powodując zahamowanie produkcji ATP (Roy i wsp., 2022). Przedstawione wyniki pokazują, że wykorzystanie zmian w metabolizmie komórek nowotworowych jako celu terapeutycznego, może być szansą na wyleczenie pacjentów i ulepszenie konwencjonalnych metod leczenia chorób nowotworowych.

6. Spektroskopia fluorescencyjna

Spektroskopia fluorescencyjna wykorzystuje zjawisko fluorescencji polegające na promienistym oddaniu energii zaabsorbowanej przez cząsteczkę (fluorofor). Cząsteczka nieabsorbująca energii jest głównie ograniczona do singletowego stanu podstawowego S_0 . Kiedy pochłonie kwant światła (foton) o wystarczającej energii przechodzi na singletowy stan wzbudzony (S_1). Powrót do podstawowego stanu singletowego (S_0) poprzez przejście promieniste wiąże się z emisją promieniowania. Energia wyemitowanych fotonów jest niższa niż energia fotonów zaabsorbowanych, ponieważ część zaabsorbowanej energii zostaje rozproszona w procesach niepromienistych. Widmo fluorescencji jest więc przesunięte w kierunku fal dłuższych w stosunku do widma absorpcji. Czas trwania fluorescencji jest rzędu 10^{-10} s do 10^{-7} s.

Drugim rodzajem przejścia promienistego związanego z emisją fotonów jest fosforescencja. Polega ona na przejściu ze wzbudzonego stanu trypletowego (T_1) na podstawowy stan singletowy (S_0), co następuje po przejściu międzysystemowym ze wzbudzonego stanu S_1 . Widmo fosforescencji jest przesunięte jeszcze mocniej w kierunku fal dłuższych. Fluorescencja zanika jednocześnie z końcem wzbudzenia, natomiast w przypadku fosforescencji emitowane światło utrzymuje się jeszcze po jego zakończeniu (Valeur i Berberan-Santos, 2011; Zacharioudaki i wsp., 2022). Opisane powyższe zjawiska zachodzące we fluoroforze, schematycznie przedstawił Aleksander Jabłoński w 1933 roku, na tzw. diagramie Jabłońskiego (Rysunek 2A) (Frąckowiak, 1988).

Spektroskopia fluorescencyjna jest jedną z najbardziej wszechstronnych technik biofizycznych stosowanych w wielu dziedzinach nauki, np. naukach chemicznych, biologicznych, medycznych. W tej czulej metodzie można badać zmiany konformacyjne i strukturę biomolekuł oraz oddziaływania międzycząsteczkowe na poziomie nanoskopowym. Analizowane jest to poprzez otrzymane widma wzbudzenia i emisji oraz maksima emisji, a także zjawisko wygaszania i anizotropię fluorescencji (Lakowicz, 1980; Camarca i wsp., 2021; Dos Santos Rodrigues i wsp., 2023).



Rysunek 2. (A) Diagram Jabłońskiego; (B) Schemat fluorescencyjnego rezonansowego przeniesienia energii (FRET). Źródło: opracowanie własne na podstawie: Frąckowiak, 1988; Šimková i Staněk, 2012.

7. Fluorescencyjne rezonansowe przeniesienie energii

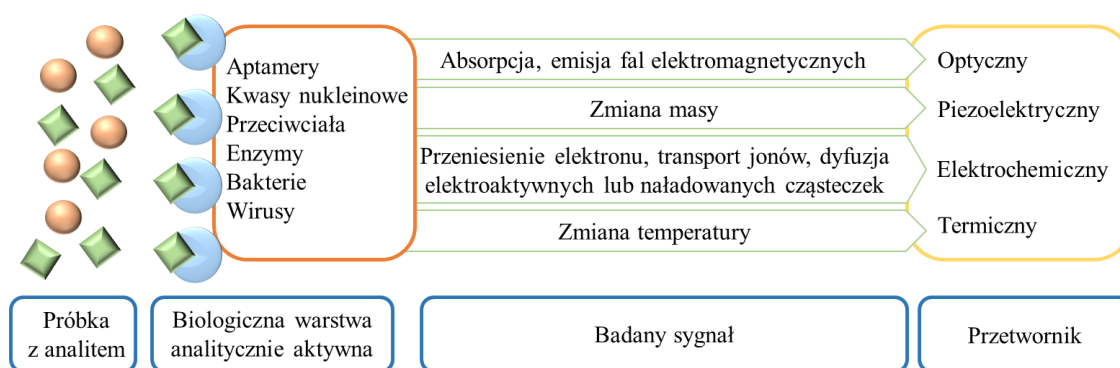
Proces fluorescencyjnego rezonansowego przeniesienia energii (ang. *Fluorescence Resonance Energy Transfer*, FRET), występuje pomiędzy dwoma

rodzajami światłoczułych cząsteczek: donorem i akceptorem (Rysunek 2B). Zjawisko to opiera się na mechanizmie bezpromienistego przeniesienia energii od donora (fluorofor) znajdującego się w stanie wzbudzonym do akceptora będącego w stanie podstawowym. Fluorofor przechodzi do stanu wzbudzonego w wyniku absorpcji nadmiaru energii, a podczas powrotu do elektronowego stanu podstawowego, emituje promieniowanie. Jeśli cząsteczki znajdują się blisko siebie, akceptor o niższym stanie energii wzbudzonej może przyjąć energię wyemitowaną przez fluorofor (donor) i emitować fotony o niższej energii niż fotony, które emitowałby donor. Jeżeli akceptorem jest cząsteczka wygaszacza, to w wyniku zderzenia ze wzbudzonym donorem następuje jego deekscytacja i zjawisko wygaszania fluorescencji. Zjawisko to po raz pierwszy zostało zaobserwowane i opisane przez niemieckiego fizyka Theodora Förstera w latach czterdziestych XX wieku (Förster, 1948; Park i wsp., 2023; Liang i wsp., 2024). Do najważniejszych warunków jakie muszą być spełnione, aby nastąpiło zjawisko FRET należą: (i) bliska odległość cząsteczki donora i akceptora (zazwyczaj $\leq 100 \text{ \AA}$) oraz (ii) nałożenie widma emisji donora z widmem absorpcji akceptora.

Zjawisko FRET bardzo często wykorzystywane jest w badaniach dotyczących oddziaływań między biomolekułami i ich dynamiki.

8. Bioczujniki

Bezustannie poszukuje się szybkich, tanich, dokładnych i mało inwazyjnych metod służących do wykrywania biomarkerów nowotworowych. Wydaje się, że wszystkie powyższe kryteria spełniają bioczujniki (*ang. biosensors*). Zgodnie z nomenklaturą Międzynarodowej Unii Chemii Czystej i Stosowanej (*ang. International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC*) bioczujniki to „urządzenia, które wykorzystują określone reakcje biochemiczne, w których pośredniczą izolowane enzymy, układy odpornościowe, tkanki, organelle lub całe komórki, w celu wykrywania związków chemicznych, zwykle za pomocą sygnałów elektrycznych, termicznych lub optycznych” (IUPAC, 1992). Bioczujniki są zbudowane z dwóch podstawowych części: (i) warstwy analitycznie aktywnej (warstwy receptorowej), która rozpoznaje badany analit i świadczy o selektywności bioczujnika oraz (ii) przetwornika, który przetwarza otrzymany sygnał chemiczny na mierzalny parametr analitycznie użyteczny i odpowiada za czułość biosensora (Cicha i wsp., 2022; Polat i wsp., 2022). Na Rysunku 3, przedstawiono schemat budowy typowego bioczujnika.



Rysunek 3. Schemat budowy bioczułnika. Źródło: opracowanie własne na podstawie: Huanga i wsp., 2021.

Bioczułniki najczęściej klasyfikowane są ze względu na użyty element biologiczny, który znajduje się w warstwie receptorowej oraz na rodzaj zastosowanego przetwornika. W związku z tym, wyróżniamy m.in.:

- (i) bioczułniki oparte o kwasy nukleinowe, których działanie opiera się na komplementarności zasad nukleotydowych występujących w reagujących ze sobą pojedynczych niciach DNA i RNA,
- (ii) immunoczułniki, których działanie oparte jest na reakcji typu antygen-przeciwciało,
- (iii) biosensory enzymatyczne należące do grupy bioczułników katalitycznych, których działanie opiera się na reakcji enzymu z substratem,
- (iv) bioczułniki optyczne, w których mierzone są zmiany właściwości fal elektromagnetycznych. Należą do nich np. bioczułniki fluorescencyjne, kolorymetryczne, bioczułniki wykorzystujące technikę powierzchniowo wzmocnionej spektroskopii Ramana,
- (v) bioczułniki elektrochemiczne mierzące m.in. zależność prądu od przyłożonego potencjału, do których zaliczamy np. bioczułniki amperometryczne,
- (vi) bioczułniki piezoelektryczne, w których mierzona jest częstotliwość drgań kryształu kwarcu w zależności od masy zaadsorbowanej/zdesorbowanej na/z powierzchni elektrody napylonej na kryształ.

8.1. Aptamery

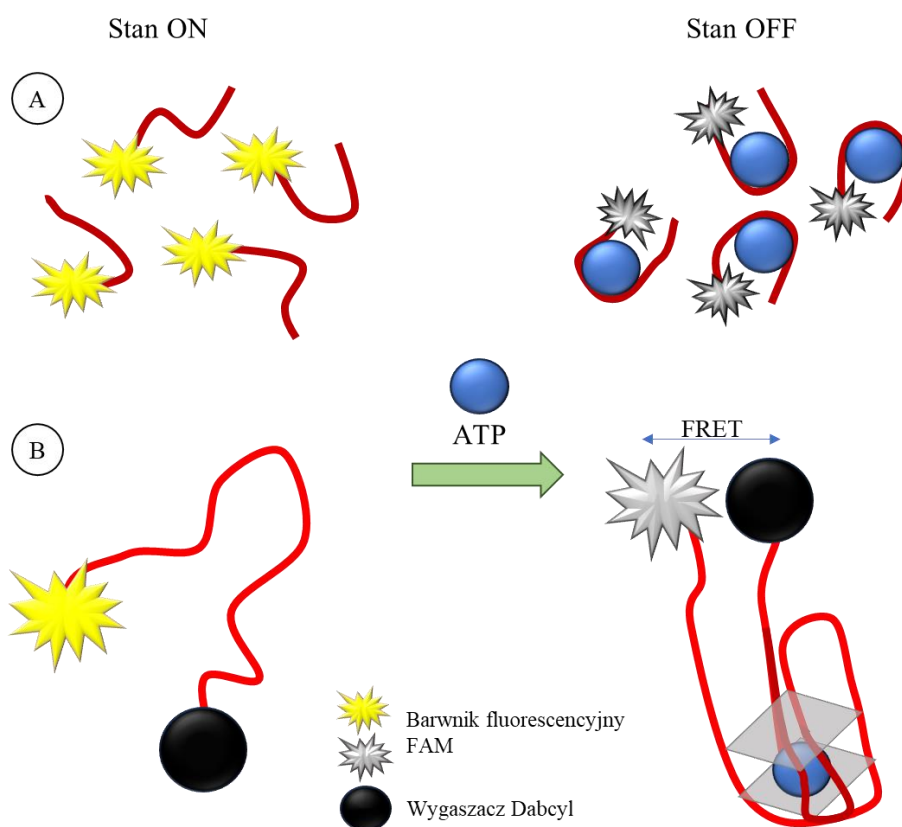
Aptamery (łac. „aptus” - przyczepiony, dopasowany) to krótkie fragmenty jednoniciowych kwasów nukleinowych DNA lub RNA (oligonukleotydy). Wiążą się one z cząsteczkami docelowymi z dużym powinowactwem (nawet ~ 10 pM)

i specyficznością. Aptamery uzyskuje się dzięki mechanizmowi selekcji *in vitro* w procesie SELEX (*ang. Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment*), poprzez izolację z bibliotek kombinatorycznych zawierających 10^{15} różnych oligonukleotydów (Famulok i Mayer, 1999; Canoura i wsp., 2022; Yang i wsp., 2023). Aptamery są strukturalnie i funkcjonalnie stabilne w szerokim zakresie warunków pomiarowych: siły jonowej, pH i temperatur. Ponadto, łatwo ulegają modyfikacji chemicznej i funkcjonalizacji. Aptamery mogą łączyć się z kwasami nukleinowymi (siRNA, miRNA), białkami, cząsteczkami leków, nanocząstkami, barwnikami fluorescencyjnymi (FAM) czy cząsteczkami wygaszaczy, które rozpraszają zaabsorbowaną energię świetlną w postaci ciepła (Dabcyl) (Rysunek 4). Sprawia to, że aptamery stały się interesującym narzędziem w badaniach mających zastosowanie w diagnostyce, monitorowaniu zmian chorobowych, a nawet celowanej terapii przeciwnowotworowej (Venkatesan i wsp., 2023). W zależności od modyfikacji aptamery mogą być wykorzystywane jako elementy receptorowe w biologicznej warstwie detekcyjnej bioczuJNIKÓW optycznych, elektrochemicznych lub piezoelektrycznych i systemach bioczuJNIKOWYCH.

W ostatnich latach dużym zainteresowaniem cieszy się zastosowanie sond aptamerowych bogatych w guaniny, zdolnych do fałdowania się w stabilne struktury G-kwadrupleksu (G-4). Formy G-4 układają się w warstwowe kwartety guaninowe, gdzie cztery guaniny ułożone są w jednej płaszczyźnie i są stabilizowane przez wiązania wodorowe Hoogsteena. Wykazano, że tego rodzaju sondy wyróżniają się większą selektywnością i czułością (Roxo i wsp., 2019; Figueiredo i wsp., 2023; Xiao i wsp., 2023).

Sekwencje DNA i RNA specyficzne do wiązania cząsteczek ATP były odkryte w latach 90-tych ubiegłego wieku przez grupę profesora Szostaka (Huizenga i Szostak, 1995). W wyniku wiązania z ATP, sondy aptamerowe zmieniają swoją konformację

tworząc strukturę G-4. Obserwowane jest także fluorescencyjne rezonansowe przeniesienie energii między obiema molekułami (Rysunek 4B)

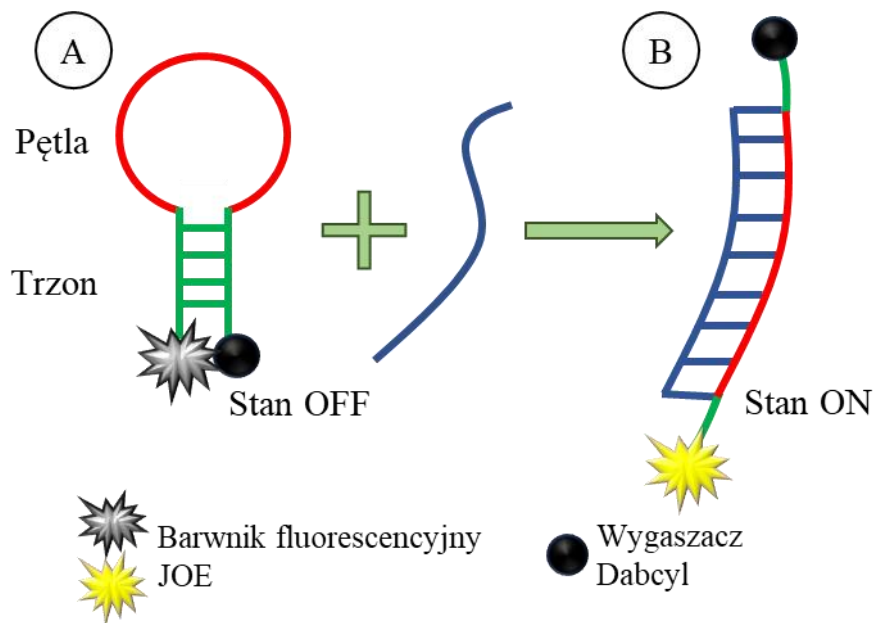


Rysunek 4. Schemat działania i przykłady modyfikacji aptamerów służących do wykrywania ATP. (A) sonda aptamerowa modyfikowana na jednym końcu sekwencji cząsteczką barwnika FAM; (B) sonda aptamerowa modyfikowana na jednym końcu sekwencji cząsteczką barwnika FAM a na drugim cząsteczką wygaszacza Dabcyl, pomiędzy którymi zachodzi bezpromienne przeniesienie energii. Źródło: opracowanie własne na podstawie: Ratajczak^d i wsp., 2019; Ratajczak^e i Stobiecka, 2023.

8.2. Sondy nukleotydowe typu „sygnalizator molekularny”

Sondy nukleotydowe typu „sygnalizator molekularny” (*ang. molecular beacon*, MB) to jednoniciowe cząsteczki kwasu nukleinowego, które są wykorzystywane do wykrywania obecności określonej komplementarnej sekwencji DNA lub RNA. Sondy składają się z 4 głównych części: (i) „pętli”, komplementarnej do poszukiwanej sekwencji, (ii) „trzonu”, który tworzą komplementarne do siebie nukleotydy znajdujące się na końcach sekwencji oligonukleotydowej, (iii) cząsteczki barwnika fluorescencyjnego na końcu 5', (iv) cząsteczki niefluorescencyjnego wygaszacza na końcu 3' (Rysunek 5). W roztworze, sondy przyjmują charakterystyczną zamkniętą strukturę „spinki do włosów” (*ang. hairpin*). Cząsteczki fluoroforu oraz wygaszacza

znajdują się wtedy blisko siebie (Rysunek 5A). Fotony emitowane przez barwnik fluorescencyjny są całkowicie absorbowane przez cząsteczkę wygaszacza w wyniku fluorescencyjnego rezonansowego przeniesienia energii (FRET) (stan OFF). W obecności sekwencji oligonukleotydowej komplementarnej do „pętli” następuje zmiana konformacji sondy w wyniku hybrydyzacji. Powoduje to oddalenie cząsteczki barwnika fluorescencyjnego od cząsteczki wygaszacza i emisję sygnału fluorescencyjnego (Rysunek 5B) (Tyagi i Kramer, 1996; Han i wsp., 2013).



Rysunek 5. Schemat działania sondy nukleotydowej typu „sygnalizator molekularny”. (A) zamknięta struktura sondy w formie „spinki do włosów” (hairpin) (stan OFF); (B) struktura otwarta sondy powstała po połączeniu z komplementarnym oligonukleotydem (stan ON). Źródło: opracowanie własne na podstawie: Ratajczak^b i wsp., 2018; Ratajczak^c i wsp., 2018.

Sondy nukleotydowe typu „sygnalizator molekularny” posiadają wiele zalet. Przede wszystkim są bardzo specyficzne i z dużą czułością wykrywają komplementarne sekwencje oligonukleotydowe w czasie rzeczywistym (Bidar i wsp., 2021). W związku z tym, znalazły zastosowanie jako skuteczna metoda służąca do wykrywania biomarkerów chorobowych występujących w postaci mRNA w żywych komórkach. Utworzenie dupleksu sonda-mRNA wyzwala emisję fotonów przez cząsteczki fluoroforu. Do badania właściwości i działania sond stosuje się najczęściej spektroskopię fluorescencyjną (Lu i wsp., 2022). Otrzymany sygnał fluorescencyjny można określić ilościowo i skorelować z poziomem ekspresji genów na poziomie mRNA. Sondy mają więc ogromny potencjał jako przełomowe narzędzia służące do wczesnego wykrywania

nowotworów. Ponadto, mogą stanowić też nową generację nieinwazyjnych metod diagnostycznych w spersonalizowanej opiece zdrowotnej (Huang^b i wsp., 2024).

9. Nanonośniki

Liposomy, micelle, nanomateriały na bazie węgla, metali czy polimerów, a także nanosystemy oparte na albuminach to jedne z najlepiej zbadanych i powszechnie stosowanych nanonośników w ostatnich latach. Wykorzystywane są w medycynie zarówno w diagnostyce jak i terapii nowotworów (Hester i wsp., 2023; Kumbhar i wsp., 2023). Ze względu na kluczową rolę nanomateriałów jaką jest ukierunkowane dostarczanie i uwalnianie środków terapeutycznych do komórek najważniejszymi ich cechami są rozmiar i ładunek. Właściwości te wpływają na rozpuszczalność, agregację, biokompatybilność i zdolność nanocząstek do przemieszczania się przez bariery biologiczne. Rozmiar nanonośników powinien być większy od 4 nm, aby nanocząstki nie uległy filtracji i oczyszczaniu przez nerki. Rozmiar nanomateriałów większy niż 10 nm, chroni nanocząstki przed ponownym przedostaniem się do naczyń lub wydostaniem poza naczynia krwionośne do normalnych tkanek. Górna granica wielkości nanonośników związana jest natomiast ze średnim rozmiarem otworów między komórkami śródbłonna naczyniowego guza i wynosi 400 nm (Zi i wsp., 2022). W związku z tym, preferowany rozmiar nanonośników powinien wynosić w granicach od 10 do 200 nm (Awad i wsp., 2023; Batoool i wsp., 2023).

Zarówno silnie dodatnie, jak i silnie ujemnie naładowane nanonośniki są podatne na szybkie oczyszczanie przez układ siateczkowo-śródbłonkowy (*ang. reticulo-endothelial system*, RES). Z tego powodu ważne jest projektowanie nanonośników z neutralnym lub lekko ujemnym potencjałem zeta (Yu i wsp., 2010; Ejigah i wsp., 2022). Ponadto, powszechną metodą zmniejszania rozpoznawania nanonośników przez RES, jest pokrywanie powierzchni nanomateriałów warstwą hydrofilową. Cząstki hydrofobowe i naładowane ulegają bowiem w krwioobiegu większej opsonizacji w porównaniu do cząstek hydrofilowych i neutralnie naładowanych. Ułatwia to proces fagocytozy przez leukocyty (Salmaso i Caliceti, 2013; Vangijzegem i wsp., 2023) i usuwanie nanomateriałów z komórek.

9.1. Liposomy

Liposomy to pęcherzyki fosfolipidowe składające się z jednej lub kilku warstw lipidowych oraz wewnętrznej części hydrofilowej. Ich średnica mieści się w granicach

od 50 do 500 nm. Ze względu na skład i strukturę identyczną z błonami komórkowymi, ich najważniejszymi zaletami są biokompatybilność, łatwość modyfikacji i znikoma toksyczność. Ponadto, liposomy mają zdolność przenoszenia związków lipofilowych i hydrofilowych (Nsairat i wsp., 2022; Sameer Khan i wsp., 2024).

W związku z powyższym, nanonośniki liposomalne są szeroko stosowane jako systemy dostarczania leków. Chronią przenoszone preparaty przed hydrolizą co wydłuża biologiczny okres ich półtrwania (Sousa i wsp., 2018; Sang i wsp., 2021). Poza tym, poczyniono wiele wysiłków w celu opracowania inteligentnych nośników, które dostarczają substancje aktywne do komórek w odpowiedzi na zewnętrzny lub wewnętrzny wyzwalacz (np. temperaturę, pH, siłę jonową) (Chen^e i wsp., 2024). Modyfikuje się również powierzchnię liposomów m.in. glikolem polietylenowym (*ang. polyethylene glycol*, PEG) w celu zminimalizowania usuwania ich przez układ siateczkowo-śródbłonkowy (Su i Kang, 2020).

Oprócz dostarczania leków, trwają intensywne badania dotyczące wykorzystania liposomów jako nośników kwasów nukleinowych, białek i peptydów. Znakowane fluoroforem oligonukleotydy wprowadzone do komórek za pomocą liposomów, umożliwiają wykrywanie biomarkerów nowotworowych na poziomie mRNA i mogą służyć do monitorowania postępu leczenia (Fernandes, 2023; Gao i wsp., 2023; Nsairat i wsp., 2023; Wong i wsp., 2024).

9.2. Tlenek grafenu

Nanomateriały na bazie grafenu cieszą się dużym zainteresowaniem w badaniach biomedycznych. Stosowane są jako nanonośniki do dostarczania leków/kwasów nukleinowych a także wykorzystywane są przy opracowywaniu bioczuJNIKÓW. Dzieje się tak, ponieważ wykazują interesujące właściwości fizykochemiczne, takie jak duża powierzchnia o dwuwymiarowej strukturze planarnej, stabilność termiczna i chemiczna, biokompatybilność oraz zdolność do wiązania i przenoszenia cząsteczek na powierzchni (Li^b i wsp., 2021). Mechanizm wychwytywania cząsteczek leków/genów opiera się na fizysorpcji poprzez oddziaływania van der Waalsa, oddziaływania π - π lub oddziaływania hydrofobowe.

Właściwości tlenku grafenu (*ang. Graphene oxide*, GO) zależą od metody jego syntezy (Jiříčková i wsp., 2022). GO posiada zdolność do wygaszania fluorescencji i wysoką wydajność transferu energii. Ponadto wykazuje właściwości amfifilowe,

biokompatybilność i łatwość modyfikacji chemicznej (Ababay Ketema i Delele Worku, 2023).

Dzięki tym cechom służy jako platforma nośna dla fluorescencyjnych sond oligonukleotydowych. Adsorpcja jednoniciowego kwasu nukleinowego na powierzchni GO następuje poprzez oddziaływania π - π i wiązania wodorowe (Chen i wsp., 2022; Chauhan i wsp., 2023; Li^c i wsp., 2024). Wygaszenie fluorescencji fluoroforu przez tlenek grafenu następuje na drodze bezpromienistego rezonansowego transferu energii (Paul i wsp., 2016; Ratajczak^a i Stobiecka, 2017; Battisti i wsp., 2023).

Tlenek grafenu używany w niskim stężeniu wykazuje również nieznaczną toksyczność. Jaworski i wsp. pokazali, że po 24 godzinach inkubacji komórek raka piersi HS-5 z różnymi stężeniami GO (od 5 do 100 $\mu\text{g/ml}$), nie zauważono znaczącego obniżenia żywotności komórek i znacznego wzrostu poziomu reaktywnych form tlenu (*ang. reactive oxygen species*, ROS) (Jaworski i wsp., 2021). Badania Cebadero-Dominguez przeprowadzone na myszach, także nie dowiodły cytotoksyczności tlenku grafenu w stężeniu 250 $\mu\text{g/ml}$ (Cebadero-Dominguez i wsp., 2023). W badaniach Adrews i wsp. pokazujących wpływ GO na układ oddechowy i sercowo-naczyniowy wykazano, że ekspozycja 14 młodych zdrowych ochotników na działanie tlenku grafenu w stężeniu 200 $\mu\text{g/m}^3$ przez 2 godziny była dobrze tolerowana i nie powodowała żadnych skutków ubocznych (Andrews i wsp., 2024).

GO oddziałuje także ze szlakami sygnalizacji komórkowej zaangażowanymi w progresję nowotworu i przerzuty. Tlenek grafenu może modulować ekspresję genów na poziomie mRNA i białek związanych z proliferacją komórek, apoptozą, angiogenezą i działaniem układu odpornościowego. Interakcje te mogą hamować wzrost nowotworu i poprawiać skuteczność innych metod leczenia (Tang i wsp., 2018; Barba-Rosado i wsp., 2024).

10. Przykłady zastosowania fluorescencyjnych sond do wykrywania surwiwiny oraz adenozy-5'-trifosforanu

Zainteresowanie zastosowaniem bioczuJNIKÓW służących do wykrywania biomarkerów nowotworowych w ostatnich latach wciąż wzrasta. Stanowią one bowiem relatywnie tanie urządzenia analityczne, charakteryzujące się wysoką czułością, selektywnością oraz stosunkowo łatwym sposobem przygotowania. Powoduje to, że bioczuJNIKI mogą być korzystną alternatywą dla obecnie stosowanych zaawansowanych i drogich metod biologii molekularnej.

Od kiedy odkryto, że surwiwina pełni funkcję reorganizatora cyklu życia komórki prowadzącego do niezakłóconego wzrostu raka i przerzutów, cieszy się dużym zainteresowaniem wśród badaczy. Obecnie, sekwencja nukleotydowa mRNA kodująca surwiwinę jest badana jako cel terapii przeciwnowotworowej i biomarker nowotworowy.

Ostatnie odkrycia wykazały, że mikrośrodowisko nowotworu charakteryzuje się zwiększonym stężeniem ATP. Wysoka produkcja ATP jest również głównym wyznacznikiem do tworzenia agresywnych fenotypów komórek nowotworowych. W związku z tym, monitorowanie produkcji ATP przez komórki jest obecnie nowym interesującym kierunkiem w leczeniu nowotworów.

Poniżej przedstawiono, przykłady wykrywania genu surwiwiny na poziomie mRNA, a także adenozyno-5'trifosforanu w komórkach nowotworowych.

Adinolfi i wsp. wykorzystali w swoich badaniach sondy typu „sygnałizator molekularny” do wykrywania mRNA surwiwiny w ludzkich komórkach raka płuc A549. Sondy wprowadzane były do ludzkiej linii komórek przy użyciu nanocząstek polimerowych z polimetakrylanu metylu (Adinolfi^a i wsp., 2017; Adinolfi^b i wsp., 2018). Wang i wsp. przedstawili system składający się z dwóch oligonukleotydów znakowanych barwnikiem fluorescencyjnym, które wprowadzane były do komórek raka szyjki macicy HeLa przy użyciu nanocząstek złota, które działały jako wygaszacz (Wang^a i wsp., 2019). Z kolei, Peng i wsp. zaproponowali fluorescencyjny system oparty na aptamerach do wykrywania mRNA surwiwiny w ludzkich komórkach HeLa oraz w komórkach jajnika chomika chińskiego CHO (Peng i wsp., 2024).

Chu i wsp. opracowali bioczułnik składający się z aptameru ATP ze znacznikiem fluorescencyjnym ROX oraz nanocząstek węgla tytanu (TC), które wykazują doskonałą skuteczność wygaszania. W obecności ATP aptamer znakowany ROX był uwalniany z powierzchni TC, co prowadziło do uzyskania sygnału fluorescencji ROX. Przedstawiono również, że tak przygotowana sonda TC/Apt może zostać wykorzystana do dokładnego rozróżnienia ATP w różnych próbkach, w tym żywych komórkach, płynach ustrojowych (np. surowicy mysiej, moczu myszy i surowicy ludzkiej) oraz mysich modelach (Chu i wsp., 2021). Chen i wsp. opracowali sondę aptamerową służącą do wykrywania ATP, która charakteryzowała się wysoką selektywnością względem innych nukleotydów. Ponadto wykazano jej działanie w surowicy ludzkiej (Chen^c i wsp., 2022). Kolejny fluorescencyjny system bioczułnikowy zaproponowany został przez Jouha i wsp. W badaniu tym, sygnał fluorescencyjny wygaszany był przez

dwuwymiarowe szkieletowe struktury kowalencyjne organiczne (COF) (Jouha i wsp., 2023). Naukowcy selektywnie wykryli ATP i trombinę.

II. Cel rozprawy doktorskiej, zakres badań i hipotezy

1. Cel rozprawy doktorskiej i zakres badań

Celem naukowym rozprawy doktorskiej było:

- 1) *Opracowanie fluorescencyjnego systemu bioczułnikowego opartego o sondę oligonukleotydową typu „sygnałizator molekularny”, służącego do wykrywania sekwencji nukleotydowej mRNA, kodującej surwiwinę w komórkach nowotworowych.*

Zakres badań wykonanych w publikacjach [P1] oraz [P2] podczas opracowania powyższego systemu bioczułnikowego obejmował:

- 1) Opracowanie i scharakteryzowanie działania sondy Sur-MB-Joe:
 - a) optymalizacja warunków pomiaru (stężenie sondy, temperatura i czas pomiaru),
 - b) badanie stabilności sondy Sur-MB-Joe w różnych temperaturach,
 - c) określenie selektywności opracowanego systemu bioczułnikowego, poprzez reakcję sondy z syntetycznymi oligonukleotydami: komplementarnym (S_t), niekomplementarnym (S_{t-nc}), posiadającymi w swojej sekwencji jeden (S_{t-1}) lub dwa (S_{t-2}) niekomplementarne do „pętli” sondy nukleotydy,
 - d) określenie czułości detekcji opracowanego systemu bioczułnikowego,
 - e) wyznaczenie stałej wygaszania dla supramolekularnego układu GO@Sur-MB-Joe,
 - f) badanie oddziaływań supramolekularnych pomiędzy barwnikiem Joe i wygaszaczem Dabcyl sondy nukleotydowej a tlenkiem grafenu z wykorzystaniem metody kwantowej dynamiki molekularnej.
- 2) Scharakteryzowanie powierzchni tlenku grafenu za pomocą skaningowej i transmisyjnej mikroskopii elektronowej.
- 3) Teoretyczne obliczenia struktury i danych termodynamicznych komplementarnych oligonukleotydów przy użyciu oprogramowania UNAFold.
- 4) Opracowanie nowego mechanizmu interakcji sondy Sur-MB-Joe z komplementarnymi oligonukleotydami.

- 5) Obrazowanie ekspresji genu surwiwiny na poziomie mRNA w komórkach nabłonka gruczołakoraka okrężnicy SW480 oraz w komórkach nabłonka okrężnicy CCD841 CoN przy użyciu mikroskopu optycznego odwróconego z zestawem do fluorescencji.

2) *Opracowanie fluorescencyjnego systemu bioczułnikowego opartego o aptamer, służącego do monitorowania poziomu stężenia ATP w komórka nowotworowych.*

Zakres badań wykonanych w publikacjach **[P4]** oraz **[P5]** podczas opracowania powyższego systemu bioczułnikowego obejmował:

- 1) Opracowanie i scharakteryzowanie działania sond aptamerowych:
 - a) optymalizacja warunków pomiaru (stężenie sond, czas pomiaru),
 - b) badanie stabilności aptameru ABP w różnych temperaturach,
 - c) wyznaczenie drugorzędowych struktur oraz temperatur topnienia charakterystycznych dla sond aptamerowych za pomocą teoretycznych obliczeń przy użyciu programu UNAFold,
 - d) wyznaczanie stałych wygaszania aptamerów,
 - e) określenie selektywności opracowanych systemów bioczułnikowych, poprzez reakcję aptamerów z różnymi trifosforanami nukleotydów: UTP, GTP, CTP.
- 2) Badanie zmian stabilności kompleksu aptamer-nukleotyd w różnych temperaturach.
- 3) Wykrywanie stężenia ATP w lizacie komórkowym otrzymanym z komórek nabłonka gruczołakoraka okrężnicy SW480, po inkubowaniu komórek z inhibitorem mitochondrialnej syntazy ATP – oligomycyną (OMC) **[P4]** oraz inhibitorem glikolizy, 2-deoksy-D-glukozą (2-DG) **[P5]**.
- 4) Obrazowanie działania sondy aptamerowej służącej do wykrywania stężenia ATP w komórkach nabłonka gruczołakoraka okrężnicy SW480 przy użyciu mikroskopu optycznego odwróconego z zestawem do fluorescencji.

2. Hipotezy

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 bioczułnikowego opartego o aptamer, który wiąże się z ATP.

Zakłada się, że uzyskane wyniki stanowią będą solidną podstawę dla dalszych badań podstawowych i klinicznych w celu potencjalnego zastosowania opisanych systemów bioczułnikowych jako nowych, efektywnych oraz czułych metod wykorzystywanych do wykrywania biomarkerów nowotworowych na wczesnym etapie choroby.

III. Materiały i metody badań

1. Materiały

1.1. Odczynniki

Odczynniki użyte do sporządzania buforów: Tris chlorowodorek (Tris-HCl), chlorek magnezu ($MgCl_2$), chlorek sodu (NaCl), wodorofosforan sodu (Na_2HPO_4), diwodorofosforan potasu (KH_2PO_4), inhibitory: oligomycyna i 2-deoksy-D-glukoza (2-DG) oraz trifosforany nukleotydów: adenozy-5'-trifosforan (ATP), cytydino-5'-trifosforan (CTP), guanozy-5'-trifosforan (GTP) i urydino-5'-trifosforan (UTP) oraz trypsyna z EDTA zakupione zostały w Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Do przeprowadzenia transfekcji komórek użyty został tlenek grafenu zawieszony w wodzie w jednowarstwowych płatkach (średnica (μm): 0,5-2; grubość (nm): 0,6-1,2) otrzymany z ACS Materials, LLC, (CA, USA) oraz zestaw odczynników do transfekcji Lipofectamine 3000 lub Lipofectamine™ LTX Reagent with PLUS™ Reagent zakupiony z Life Technologies (MA, USA).

1.2. Linie komórkowe

Badania przeprowadzono na ludzkiej linii komórek nabłonka gruczolakoraka okrężnicy SW480 (ATCC CCL-228) oraz prawidłowej ludzkiej linii komórek nabłonka okrężnicy CCD 841 CoN (ATCC CRL-1790). Linie komórkowe zakupione zostały w ATCC (LGC Standards Sp.z.o.o, Łomianki, Polska) i dostarczone przez dr. Bartłomieja Krazińskiego z Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie.

1.3. Charakterystyka sond i oligonukleotydów

Sekwencje sondy nukleotydowej typu „sygnalizator molekularny” (Sur-MB-Joe) służącej do wykrywania sekwencji nukleotydowej mRNA kodującej surwiwinę oraz krótkich oligonukleotydów zastosowane w publikacjach [P1] i [P2] oraz sekwencje sond aptamerowych wykorzystanych do monitorowania zmian stężenia ATP użyte w publikacjach [P4] (Apt(ATP)) oraz [P5] (ABP), zostały zsyntetyzowane przez: Pracownię Sekwencjonowania DNA i Syntezy Oligonukleotydów, Instytutu Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk (IBB PAS), Warszawa, Polska (S_t , S_{t-1} , S_{t-2} , SurMB, Apt(ATP)) lub FUTURESynthesis, Poznań, Polska (S_{t-nc} , ABP). Sekwencje zostały

przedstawione w **Tabeli 4**. Oligonukleotydy zostały oczyszczone za pomocą metody HPLC, a skala syntezy wynosiła 0,2 μ mole.

Tabela 4. Zestawienie sekwencji sondy typu „sygnałizator molekularny” (Sur-MB-Joe) wykorzystanej do wykrywania mRNA surwiwiny, krótkich oligonukleotydów oraz sond aptamerowych Apt(ATP) i ABP służących do monitorowania zmian stężenia ATP wykorzystanych w badaniach

Nazwa	Sekwencja 5' – 3'	Modyfikacje	
		5'	3'
Sur-MB-Joe	CCTGGCCCAGCCTTCCAGCTCCTTGCCAGG	Joe	Dabcyl
S _t	CAAGGAGCTGGAAGGCTGGG	-	-
S _{t-1}	CAAGGAGCTGCAAGGCTGGG	-	-
S _{t-2}	CAAGGAGCTCCAAGGCTGGG	-	-
S _{t-nc}	CCCAGCCTTCCAGCTCCTTG	-	-
Apt(ATP)	TCTCTCACCTGGGGGAGTATTGCGGAGGAA GGT	-	FAM
ABP	ATTCTCTCACCTGGGGGAGTATTGCGGAGGA AGGTAT	FAM	Dabcyl

2. Metody badań

2.1. Pomiary fluorymetryczne

Pomiary widm fluorescencyjnych wykonane w publikacjach [P1], [P2], [P4] i [P5] zarejestrowano przy użyciu spektrofлуorymetru LS55 (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) z impulsowym źródłem światła ksenonowego o mocy 20 kW i fotopowielaczem. Podczas badań, szerokość szczelin wzbudzenia i emisji ustawiono na 5 nm, a prędkość skanowania na 500 nm/min przy długościach fal emisji od 200 do 600 nm, z rozdzielczością 1 nm. Badane roztwory umieszczano w kuwetach o długości drogi optycznej równej 10 cm. Długość fali wzbudzenia dla sondy nukleotydowej typu „sygnałizator molekularny” wynosiła $\lambda = 520$ nm [P1, P2], a dla aptameru $\lambda = 480$ nm [P4, P5].

2.2. Hodowla komórek

Komórki SW480 hodowane były w medium hodowlanym DMEM (pożywka Eagle zmodyfikowana przez Dulbecco, *ang. Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) (PAA, Immuniq, Polska), a komórki CCD841CoN w medium hodowlanym

EMEM (Minimalna pożywka niezbędna Eagle'a, *ang. Eagle's minimal essential medium*) (ATCC, LGC Standards, Wielka Brytania) wzbogaconych 10% dodatkiem bydlęcej surowicy płodowej (FBS) oraz 1% dodatkiem mieszaniny antybiotyków: penicyliny i streptomycyny (Sigma-Aldrich, USA) oraz 1% dodatkiem L-glutaminy (Sigma-Aldrich, USA) w inkubatorze Shel Lab Model 2123/TC (Cornelius, OR, USA) w temperaturze 37°C przy zawartości CO₂ 5% oraz wilgotności $\geq 95\%$. Do pasażowania, w celu oderwania komórek od powierzchni szalki hodowlanej wykorzystano 0,25% roztwór trypsyny z EDTA (Sigma-Aldrich, USA). Wszystkie czynności wykonywane z użyciem komórek prowadzono w warunkach sterylnych w komorze laminarnej II klasy bezpieczeństwa (Alpina, Polska).

Komórki hodowane były na szalkach hodowlanych o wymiarach 60 mm $\times$ 15 mm w 4 ml medium hodowlanego. Badania przeprowadzono, gdy pokrycie powierzchni szalki komórkami wynosiło około 80%, a stężenie końcowe komórek ok. 1×10^5 komórek/ml.

2.3. Transfekcja komórek

Do transfekcji komórek SW480 oraz CCD 841 CoN w publikacji pierwszej [P1] użyto specyficznego odczynnika do transfekcji Lipofectamine™ 3000 wykorzystującego zaawansowaną technologię nanocząstek lipidowych. Transfekcję przeprowadzono według procedury producenta. Na początku przygotowano roztwory składające się ze 195 μ l medium hodowlanego DMEM zmieszanego z 5 μ l roztworu odczynnika Lipofectamine™ 3000 (roztwór A) oraz 195 μ l medium hodowlanego DMEM zmieszanego z 4 μ l roztworu odczynnika Lipofectamine™ 3000 i 1 μ l sondy Sur-MB-Joe o stężeniu 100 μ M (roztwór B). Następnie oba roztwory zmieszano i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 5 minut. Po określonym czasie, roztwór dodano do przemytych świeżym medium hodowlanym komórek i inkubowano w temperaturze 37°C przez 4 godziny.

Transfekcja komórek SW480 za pomocą cząsteczek tlenu grafenu [P2], nastąpiła poprzez dodanie do komórek roztworu zawierającego 268 μ l tlenu grafenu o stężeniu 100 ng/ml, 1 μ l roztworu sondy Sur-MB-Joe o stężeniu 100 μ M i 131 μ l medium hodowlanego DMEM. Całość inkubowano w temperaturze 37°C przez 4 godziny.

W celu wprowadzenia do komórek SW480 [P4] aptameru Apt(ATP), wykorzystano mieszaninę składającą się z 521 μ l roztworu zawierającego sondę Apt(ATP) o stężeniu 49 nM, odczynnik do transfekcji Lipofectamine LTX and PLUS

Reagent oraz medium hodowlane DMEM. Całość inkubowano przez 2 godziny w temperaturze 37°C.

2.4. Aparatura i oprogramowanie

Ekspresję genu surwiwiny na poziomie mRNA w komórkach gruczolakoraka okrężnicy SW480 oraz komórkach nabłonka okrężnicy CCD841 CoN za pomocą opracowanej sondy nukleotydowej Sur-MB-Joe, obserwowano przy użyciu optycznego mikroskopu odwróconego, Nikon Eclipse TE300 z zestawem filtrów fluorescencyjnych B-2A (450 – 490 nm), a rejestracja uzyskanych zdjęć z wykorzystaniem aparatu Canon Power Shot A640 zamontowanym na mikroskopie.

Wyznaczanie energii swobodnej, struktur drugorzędowych i temperatury topnienia dla oligonukleotydów oraz sond aptamerowych przeprowadzono przy pomocy oprogramowania UNAFold z aplikacją Quikfold (Instytut RNA, Uniwersytet Albany, Albany, NY, USA) służącego do przewidywania pofałdowania i hybrydyzacji kwasów nukleinowych.

Struktury chemiczne tlenku grafenu, barwnika Joe i wygaszacza Dabcyl, oraz symulacje interakcji między nimi wykonano w oparciu o obliczenia kwantowo – chemiczne przy użyciu programu Spartan 14 (Irvine, CA, USA).

Morfologia powierzchni tlenku grafenu scharakteryzowana została przy użyciu transmisyjnego mikroskopu elektronowego JEM 1011 (JEOL, Japonia) z analizatorem EDS INCA (Oxford) oraz skaningowego mikroskopu elektronowego JSM-6390LV (JEOL, Japonia). Zdjęcia wykonano w Pracowni Badań Mikroskopowo – Elektronowych Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN w Warszawie.

IV. Omówienie najważniejszych wyników otrzymanych podczas wykonywania prac eksperymentalnych

Opracowanie fluorescencyjnego systemu bioczułnikowego opartego o sondę oligonukleotydową typu „sygnalizator molekularny”, służącego do wykrywania sekwencji nukleotydowej mRNA kodującej surwiwinę w komórkach nowotworowych

Problem badawczy podjęty w publikacjach [P1] oraz [P2] dotyczył możliwości wykrywania ekspresji genu surwiwiny na poziomie mRNA w żywych komórkach poprzez zastosowanie fluorescencyjnej sondy nukleotydowej typu „sygnalizator molekularny” (Sur-MB-Joe). Badania zostały przeprowadzone na komórkach nabłonka gruczołakoraka okrężnicy SW480 oraz komórkach nabłonka okrężnicy CCD841 CoN. Sonda Sur-MB-Joe została wprowadzona do komórek za pomocą liposomów [P1] lub tlenku grafenu [P2]. Sekwencja zastosowanej w doświadczeniach sondy przedstawiona jest w **Tabeli 4** i składa się z antysenownej sekwencji oligonukleotydowej komplementarnej do sekwencji mRNA kodującej surwiwinę.

Przedstawiona w publikacjach sonda nukleotydowa Sur-MB-Joe przyjmuje w roztworze zamkniętą strukturę przypominającą „spinkę do włosów” (stan OFF). Obserwowana intensywność fluorescencji (I_{FL}) jest niska i wynosi $I_{FL} = 26$ j.u. W wyniku dodania komplementarnego do sekwencji „pętli” sondy oligonukleotydu ($C_{iDNA} = 100$ nM), zachodzi proces hybrydyzacji prowadzący do utworzenia struktury dwuniciowej. Hybrydyzacja powoduje zmianę konformacji sondy Sur-MB-Joe oraz oddalenie cząsteczki barwnika Joe od cząsteczki wygaszacza Dabcyl. W związku z tym, po wzbudzeniu dupleksu następuje wyzwolenie sygnału fluorescencyjnego barwnika Joe, (stan ON) i ponad 20-krotny wzrost zarejestrowanego sygnału fluorescencyjnego, $I_{FL, maks.} = 561,2$ j.u. (Rysunek 5).

W doświadczeniu sprawdzającym wpływ temperatury na stabilność sondy Sur-MB-Joe zauważono, że w temperaturach od 30°C do 50°C intensywność emisji fluorescencji dla barwnika Joe szybko wzrasta i stabilizuje się po ok. 9 minutach. Wskazuje to na zmianę konformacji sondy poprzez dehybrydyzację komplementarnych nukleotydów na końcach sekwencji oligonukleotydowej i otwieranie się jej struktury pod wpływem temperatury. Należy jednak zaznaczyć, że intensywność fluorescencji jest prawie 8-krotnie mniejsza ($I_{FL} = 69,5$ j.u. dla temperatury 50°C po 21 minutach)

w porównaniu z wartościami uzyskanymi w obecności komplementarnego oligonukleotydu w temperaturze 23°C.

Sonda Sur-MB-Joe występuje w roztworze jako zamknięta struktura z niską intensywnością $I_{FL} = 14,5$ j.u., z powodu zjawiska FRET zachodzącego między cząsteczkami barwnika i wygaszacza. Podczas interakcji sondy z różnymi stężeniami tlenku grafenu (GO) obserwowano redukcję sygnału fluorescencyjnego barwnika Joe. Podczas tworzenia supramolekularnego układu GO@Sur-MB-Joe, tlenek grafenu działał jak dodatkowe cząsteczki wygaszacza. Intensywność obniżyła się do wartości $I_{FL} = 29,2$ j.u. dla 370,8 nM stężenia pierścieni tlenku grafenu. Na podstawie otrzymanych wyników wyznaczono stałą wygaszania Sterna – Volmera, która wyniosła $K_{SV} = 2742 \pm 21 \text{ M}^{-1}$. Wskazuje to na statyczny proces wygaszania fluorescencji.

W celu zbadania jaki rodzaj interakcji między tlenkiem grafenu i barwnikiem Joe może powodować proces wygaszania, przeprowadzono symulację dla supramolekularnego układu GO@Joe z wykorzystaniem metody kwantowej dynamiki molekularnej. Wykazano, że pomiędzy molekułami Joe i powierzchnią tlenku grafenu tworzą się wiązania wodorowe oraz występują oddziaływania π – π między pierścieniami aromatycznymi równolegle ułożonych obu cząsteczek. Podobne wyniki otrzymano w wyniku symulacji dokonanej dla supramolekularnego układu GO@Dabcyl. Oddziaływania supramolekularne między cząsteczkami barwnika i wygaszacza a GO, wzmacniają siłę wiązania sondy Sur-MB-Joe do powierzchni tlenku grafenu. Dodatkowo scharakteryzowano powierzchnię tlenku grafenu, wykorzystując technikę transmisyjnej (TEM) i skaningowej (SEM) mikroskopii elektronowej. Na otrzymanych zdjęciach mikroskopowych zaobserwowano mocno pofałdowane, pojedyncze płatki tlenku grafenu.

W kolejnych doświadczeniach, sprawdzono czułość detekcji sondy Sur-MB-Joe. W obecności wzrastającego stężenia komplementarnych do „pętli” sondy oligonukleotydów (tDNA), zauważono znaczący wzrost emisji fluorescencji barwnika Joe. Z uzyskanych danych możliwe było wyznaczenie granicy wykrywalności tDNA wynoszącej $LOD = 26 \text{ nM}$, korzystając ze standardowej reguły trzech sigm ($S/N = 3\sigma$). Po dodaniu wzrastających stężeń komplementarnych oligonukleotydów tDNA do supramolekularnego układu Sur-MB-Joe@GO nastąpiła hybrydyzacja tDNA z sondą Sur-MB-Joe. W wyniku zmiany konformacji sondy z zamkniętej struktury „spinki do włosów” (stanu OFF) do sztywnej, otwartej struktury dupleksu, nastąpiło oddalenie cząsteczek fluoroforu i wygaszacza od siebie. Doprowadziło to do desorpcji utworzonego

dupleksu DNA z powierzchni tlenku grafenu i wyzwoliło sygnał fluorescencji barwnika Joe (stan ON, $I_{FL} = 963,1$ j.u. po 30 minutach). Granica wykrywalności tDNA wyniosła $LOD = 16$ nM ($S/N = 3\sigma$).

Wykazano również dużą selektywność opracowanego „sygnalizatora molekularnego”. Interakcja sondy z oligonukleotydami, które posiadały w swojej sekwencji jeden (S_{t-1}) lub dwa (S_{t-2}) niekomplementarne do „pętli” sondy nukleotydy, spowodowała znaczny spadek sygnału fluorescencyjnego powstałego dupleksu Sur-MB-Joe-docelowy oligonukleotyd. Sygnał fluorescencji dla S_{t-1} wyniósł odpowiednio $I_{FL,S_{t-1}} = 181,4$ j.u. a dla S_{t-2} , $I_{FL,S_{t-2}} = 147,4$ j.u. Interakcja Sur-MB-Joe z niekomplementarnym oligonukleotydem (S_{t-nc}) nie wywołała żadnych zmian w sygnale fluorescencyjnym w porównaniu do sygnału otrzymanego dla samej sondy. W temperaturze 61°C , sygnał fluorescencji obserwowany dla supramolekularnego układu $GO@Sur-MB-Joe$ z docelowymi oligonukleotydami S_{t-1} , S_{t-2} i S_{t-nc} spadł poniżej 100 j.u. Powodem jest słabe wiązanie docelowych sekwencji z sondą Sur-MB-Joe i wygaszenie fluorescencji barwnika Joe przez tlenek grafenu. Dla komplementarnego oligonukleotydu otrzymany sygnał fluorescencyjny wyniósł powyżej 800 j.u. Efekt ten jest związany z hybrydyzacją sondy Sur-MB-Joe z oligonukleotydem i uwolnieniem powstałego dupleksu z powierzchni tlenku grafenu. Otrzymane wyniki wskazują na opracowanie doskonałej metody służącej do rozróżniania sekwencji nici oligonukleotydowych, które różnią się jednym nukleotydem.

Uzyskano, także różnice w charakterystyce krzywych temperatur topnienia otrzymanych w zakresie od 23°C do 91°C dla sondy Sur-MB-Joe oraz jej dupleksów utworzonych w obecności oligonukleotydów: komplementarnego (S_t), całkowicie niekomplementarnego (S_{t-nc}) oraz ze zmienionym jednym (S_{t-1}) lub dwoma (S_{t-2}) nukleotydami. Największy wpływ na charakterystykę topnienia Sur-MB-Joe uzyskano w obecności komplementarnego oligonukleotydu. W przypadku badania tego dupleksu, pomiary wykazały nieodwracalną trzystopniową charakterystykę topnienia (OFF-ON-ON). Podczas zmniejszania temperatury do 23°C , sonda Sur-MB-Joe nie powracała do początkowej zamkniętej konformacji, a sygnał fluorescencyjny był utrzymywany na wysokim poziomie (stan ON). Sugeruje to powstanie silnego i trwałego dupleksu Sur-MB-Joe z komplementarną sekwencją. Zgodnie z oczekiwaniem, krzywe temperatury topnienia otrzymane dla dupleksu sondy z niekomplementarnym oligonukleotydem były takie same jak dla sondy bez dodatku oligonukleotydu. Otrzymane wyniki potwierdzają, że sonda Sur-MB-Joe przechodzi zmiany

konformacyjne od stanu OFF do stanu ON czyli wraca do zamkniętej struktury „spinki do włosów” (stan OFF) w temperaturze pokojowej. Krzywe temperatur topnienia otrzymane dla Sur-MB-Joe w obecności S_{t-1} i S_{t-2} , wskazują na znacznie słabszą interakcję docelowych oligonukleotydów z sondą i zwiększoną temperaturę topnienia.

W następstwie otrzymanych wyników, zaproponowano nowy mechanizm interakcji sondy nukleotydowej z komplementarnymi oligonukleotydami. W oparciu o teoretyczne obliczenia struktury komplementarnych oligonukleotydów i otrzymane dane termodynamiczne przy użyciu oprogramowania UNAFold wykazano, że ww. oligonukleotydy tak samo jak sonda Sur-MB-Joe, przyjmują zamkniętą strukturę „spinki do włosów”. Proces hybrydyzacji i biorozpoznania następuje więc podczas reakcji typu „spinka do włosów – spinka do włosów” (hairpin – hairpin). Sugerowany model rozszerza stosowany do tej pory klasyczny model Tyagi–Kramera, w którym komplementarny oligonukleotyd występujący w postaci liniowej łączy się z sondą mającą zamkniętą strukturę „spinki do włosów” (hairpin).

Następnie oceniono możliwość wykorzystania opracowanej sondy nukleotydowej do wykrywania sekwencji nukleotydowej mRNA kodującej surwiwinę w żywych komórkach. Sonda Sur-MB-Joe została wprowadzona do komórek nabłonka gruczołakoraka SW480 oraz prawidłowych komórek nabłonka okrężnicy CCD841 CoN za pomocą liposomów (Sur-MB-Joe@Lip) **[P1]** lub tlenku grafenu (GO@SurMB-Joe) **[P2]**. Po 4-godzinnej inkubacji komórek SW480 z Sur-MB-Joe@Lip lub GO@SurMB-Joe, za pomocą odwróconego mikroskopu optycznego z filtrem fluorescencyjnym, zarejestrowano sygnał pochodzący z fluorescencji fluoroforu Joe w cytozolu. Emisja nastąpiła w konsekwencji oddalenia cząsteczki barwnika od cząsteczki wygaszacza w związku ze zmianą konformacji sondy Sur-MB-Joe wywołaną procesem hybrydyzacji z cząsteczkami mRNA kodującymi surwiwinę obecnymi w cytozolu komórek (stan ON). Po wprowadzeniu sondy do komórek CCD841 CoN nie zarejestrowano sygnału fluorescencyjnego. Otrzymany wynik jest zgodny z oczekiwaniami i świadczy o braku ekspresji genu surwiwiny na poziomie mRNA w prawidłowych komórkach nabłonka okrężnicy. Sonda nie zmienia swojej konformacji i występuje w postaci zamkniętej struktury (stan OFF). Otrzymane wyniki świadczą o wysokiej ekspresji genu surwiwiny na poziomie mRNA w komórkach nowotworowych SW480 oraz skutecznej transfekcji komórek przy użyciu liposomów i tlenku grafenu.

Opracowane przeze mnie systemy bioczułnikowe, służące do wykrywania sekwencji mRNA kodującej surwiwinę, stanowią obiecujące i pomocne narzędzie

do wczesnego diagnozowania nowotworów. Mogą być podstawą do tworzenia nowych terapii i przyczynić się do zwiększenia przeżywalności chorych.

W publikacji przeglądowej [P3], omówiono dynamiczny rozwój metod służących do wczesnego wykrywania zmian nowotworowych opartych na detekcji białka lub mRNA kodującego surwiwinę. Zarówno białko jak i mRNA stanowią biomarkery nowotworowe. Przegląd ten podsumowuje osiągnięcia naukowców uzyskane podczas projektowania i opracowywania optycznych, piezoelektrycznych oraz elektrochemicznych systemów bioczuJNIKOWYCH i mikroprzepływowych. W publikacji zwrócono uwagę na dokładność, selektywność i czułość otrzymanych urządzeń. Szczególną uwagę poświęcono także metodom detekcji biomarkerów nowotworowych opartych na reakcji antygen-przeciwciało i procesie hybrydyzacji DNA. Podkreślono również wykorzystanie różnych nanomateriałów, takich jak: nanocząstki złota, mezoporowate nanocząstki krzemionkowe, tlenek grafenu i nanocząstki polimerowe, w przygotowaniu czujników biologicznych. W publikacji przedstawiono, także możliwość wykorzystania nieinwazyjnej biopsji płynnej w nowoczesnej diagnostyce i terapii, poprzez detekcję surwiwiny w egzosomach i krążących komórkach nowotworowych znajdujących się w krwiobiegu.

Opracowanie fluorescencyjnego systemu bioczuJNIKOWEGO opartego o aptamer, służącego do monitorowania poziomu stężenia ATP w komórka nowotworowych

Problem badawczy podjęty w publikacjach [P4] oraz [P5] dotyczył możliwości monitorowania poziomu stężenia adenozy-no-5'-trifosforanu (ATP) w komórkach, poprzez zastosowanie opracowanych fluorescencyjnych sond aptamerowych. Do badań wykorzystano komórki nabłonka gruczołakoraka okrężnicy SW480 oraz komórki SW480 inkubowane z różnymi stężeniami inhibitora syntazy ATP, oligomycyną [P4] lub inhibitorem glikolizy, 2-deoksy-D-glukozą (2-DG) [P5]. Sekwencje aptamerów: Apt(ATP) [P4] i ABP [P5] zastosowanych w pomiarach zostały przedstawione w Tabeli 4. Aptamery miały sekwencję oligonukleotydową specyficzną do łączenia z cząsteczkami ATP modyfikowaną na jednym końcu fluoroforem FAM. Aptamer ABP [P5], posiadał dodatkowo cząsteczkę wygaszacza Dabcyl oraz na obu końcach sekwencji komplementarne do siebie nukleotydy, pozwalające utworzyć strukturę „spinki do włosów”.

Sondy aptamerowe w wyniku wzbudzenia barwnika FAM przy długości fali światła $\lambda = 480$ nm, wykazują wysoki sygnał fluorescencyjny rejestrowany przy długości fali ok. $\lambda = 516$ nm (stan ON). Dla sondy ABP intensywność fluorescencji wynosiła $I_{FL} = 904,5$ j.u. i ustabilizowała się w ciągu 15 min. W obecności cząsteczek ATP, konformacja sondy zmieniała się w strukturę G-kwadrupleksu (G-4). Forma ta powstała poprzez pofałdowanie pojedynczej nici aptameru bogatej w reszty guaninowe. W utworzonym kompleksie aptamer-ATP, dochodzi również do fluorescencyjnego rezonansowego przeniesienia energii między cząsteczką barwnika a cząsteczkami guaniny w sondzie Apt(ATP) **[P4]** lub cząsteczką Dabcyl w sondzie ABP **[P5]**. Prowadzi to do wygaszania fluorescencji FAM (stan OFF).

Drugorzędowe struktury sond aptamerowych wyznaczono za pomocą teoretycznych obliczeń przy użyciu oprogramowania UNAFold, które służy do przewidywania pofałdowania i hybrydyzacji kwasów nukleinowych. Wykazano, że opracowane sondy mogą przyjmować cztery struktury z małymi pętlami przypominającymi „spinkę do włosów”. Wszystkie charakteryzują się ujemną energią swobodną Gibbsa, co świadczy o dużej stabilności termodynamicznej.

Podczas badania trwałości struktury aptameru ABP w zakresie temperatur od 23°C do 91°C, wykazano powstawanie odwracalnej, trzystopniowej (OFF-ON-OFF) charakterystyki topienia sondy. Podczas zmiany temperatur od 23°C do 67°C, intensywność względnego sygnału emisji sondy wzrosła od $F/F_0 = 1$ do $F/F_0 = 1,498$, co świadczy o oddaleniu fluoroforu FAM na końcu 5' od wygaszacza Dabcyl znajdującego się na końcu 3' i wyzwoleniu fluorescencji barwnika. Dalszy wzrost temperatury od 67°C do 91°C sprawił, że zarejestrowany względny sygnał fluorescencyjny zmalał do poziomu $F/F_0 = 1,205$. Uzyskane wyniki wskazują, że wraz ze wzrostem temperatury, pojedyncza nić oligonukleotydowa aptameru przyjmuje przypadkową, losową konformację. Prowadzi to do wygaszania fluorescencji poprzez zjawisko FRET między cząsteczkami barwnika i wygaszacza.

W doświadczeniu badającym czułość sondy aptamerowej Apt(ATP) wykazano, że po dodaniu różnych stężeń ATP, nastąpiło wygaszenie emisji barwnika sondy. Sygnał fluorescencyjny obniżył się mocno z wartości $I_{FL} = 898,2$ j.u. do wartości $I_{FL} = 295,5$ j.u. odpowiednio dla 0 μ M oraz 333 μ M stężenia ATP. Obliczona stała wygaszania Sterna-Volmera wyniosła $K_{SV} = 5700 \pm 200$ M⁻¹. Z otrzymanych wyników wyznaczono także dolną granicę wykrywalności stężenia ATP, która równa była $LOD = 24$ μ M ($S/N = 3\sigma$). Obniżenie stężenia sondy Apt(ATP) do 16,7 nM, spowodowało możliwość

wykrycia 17 μM stężenia ATP. W przypadku sondy ABP, po dodaniu różnych stężeń ATP, wyznaczony limit detekcji dla ATP wyniósł $\text{LOD} = 54,2 \mu\text{M}$. Podwyższając temperaturę pomiaru do 40°C, granica wykrywalności stężenia ATP obniżyła się do $\text{LOD} = 27,4 \mu\text{M}$ ($\text{S/N} = 3\sigma$).

Selektywność opracowanych aptamerów sprawdzono w obecności innych trifosforanów nukleotydów: CTP, GTP i UTP. Otrzymane wyniki pokazały, że interferenty powodują znacznie słabsze wygaszanie fluorescencji barwnika FAM sondy Apt(ATP) w porównaniu z ATP. Najniższe obniżenie sygnału sondy wywołał nukleotyd GTP (18,6%), następnie UTP (29,8%) oraz CTP (35,7%). Dodatek ATP wywołał wygaszenie fluorescencji o 67,1%. Wskazuje to na wysoką selektywność opracowanej sondy aptamerowej. W przypadku sondy ABP, również wykazano, że interakcja aptameru z ATP indukuje mocniejsze wygaszanie fluorescencji niż w przypadku innych nukleotydów. Zaobserwowana skuteczność wygaszania fluorescencji (*ang. fluorescence quenching efficiency*, QE) w 23°C dla ATP wyniosła $\text{QE} = 32\%$, podczas gdy dla CTP i UTP 25%, a dla GTP 20%. Wyższa temperatura pomiaru (40°C) spowodowała większe wygaszanie fluorescencji sondy po interakcji z cząsteczkami ATP, które wyniosło 42%. Wygaszanie dla pozostałych nukleotydów zmniejszyło się do 18%, 14% i 18% odpowiednio dla CTP, GTP i UTP. Otrzymane wyniki wskazują, że proponowana sonda aptamerowa ABP zapewnia dobrą selektywność i czułość względem ATP.

W wyniku badania zmian stabilności kompleksu aptamer ABP-nukleotyd w różnych temperaturach, zaobserwowano, że podczas skanowania temperatury od 23°C do 49°C, względny sygnał fluorescencji barwnika FAM, obniżył się z $F/F_0 = 1$ do $F/F_0 = 0,867$. Wskazuje to na zmianę konformacji aptameru ABP. Podczas łączenia sondy z cząsteczkami ATP, zmniejsza się odległość pomiędzy barwnikiem FAM a wygaszaczem Dabcyl. Umożliwia to zajście pomiędzy nimi zjawiska FRET. W trakcie dalszego podwyższania temperatury, powyżej 51°C, względny sygnał fluorescencji ABP stopniowo wzrastał. W temperaturze 69°C osiągnął maksymalny poziom $F/F_0 = 1,247$, po czym nastąpił spadek do $F/F_0 = 1,02$ w 91°C. Spowodowane było to zmianą konformacji sondy najpierw do całkowicie otwartej, a następnie przypadkowej, losowej struktury, w której może dochodzić do przeniesienia energii między blisko znajdującymi się molekułami fluoroforu i wygaszacza. Dla innych nukleotydów, kompleksy aptamer ABP-nukleotyd miały charakterystykę identyczną jak sama sonda. Świadczy to o słabej interakcji aptameru z UTP, GTP i CTP.

Podczas przeprowadzonych badań wykazano również, że pomimo wzrostu temperatury podczas doświadczenia, wiązanie cząsteczek ATP do sondy ABP, powoduje spadek fluorescencji, a dla pozostałych nukleotydów wzrost sygnału. Największa różnica w otrzymanych wynikach obserwowana była dla temperatur w zakresie od 40°C do 50°C. Oznacza to, że opracowana metoda zapewnia doskonałą selektywność aptameru, a także służy rozróżnieniu poszczególnych nukleotydów.

Następnie zbadano użyteczność opracowanych sond w lizacie komórkowym, który został otrzymany z komórek nabłonka gruczołakoraka okrężnicy SW480. Wykazano, że sygnał fluorescencji barwnika FAM w lizacie po dodaniu ATP zmniejszył się o 16%, co potwierdza możliwość działania sondy Apt(ATP) w roztworze zawierającym 300-krotnie rozcieńczony lizat z komórek nowotworowych.

Za pomocą sondy ABP wykazano różnice w stężeniu ATP w lizatach komórkowych, które otrzymano z komórek inkubowanych bez oraz z dodatkiem inhibitora glikolizy (roztwór 10 mM 2-deoksy-D-glukozy (2-DG)) przez 24 godziny. Za pomocą metody dodatku wzorca, wyznaczono stężenie ATP w lizacie komórkowym. W lizacie otrzymanym z komórek poddanych działaniu inhibitora glikolizy wynosiło ono 30,9 μ M, natomiast w lizacie z komórek, które nie były inkubowane z 2-DG, stężenie ATP wyniosło 45,25 μ M. Otrzymany wynik wskazuje na obniżenie produkcji ATP o 31,7%.

W kolejnych doświadczeniach oceniono możliwość wykorzystania sondy aptamerowej Apt(ATP) do monitorowania stężenia ATP w żywych komórkach nabłonka gruczołakoraka okrężnicy SW480. Zastosowano oligomycynę, antybiotyk, który jest inhibitorem syntazy ATP i działa na kompleks V w mitochondrialnym łańcuchu oddechowym. Początkowo komórki były inkubowane z 1 lub 5 μ M stężeniem oligomycyny przez 20 godzin. Następnie wprowadzono do nich za pomocą liposomów aptamer. Uzyskane wyniki jednoznacznie pokazały zwiększenie intensywności sygnału fluorescencyjnego, który pochodził z barwnika FAM, w cytozolu komórek poddanych działaniu oligomycyny. Sygnał emisji zwiększył się o 5,2% dla 1 μ M stężenia oligomycyny oraz o 11,9% dla 5 μ M w porównaniu z sygnałem otrzymanym dla komórek, które nie były inkubowane z inhibitorem syntazy ATP. Świadczy to o zahamowaniu produkcji ATP przez użyty antybiotyk. W wyniku powstania mniejszej liczby cząsteczek ATP, następuje słabsze wygaszenie fluorescencji barwnika FAM wprowadzonego do komórek aptameru Apt(ATP).

Opracowane przeze mnie systemy bioczuJNIKowe oparte o aptamery, stanowią obiecujące i pomocne narzędzie w terapii przeciwnowotworowej. Wskazując, iż poprzez monitorowanie stężenia ATP w lizacie i cytozolu komórek, można ocenić postęp rozwoju nowotworu.

Podsumowanie

Na podstawie otrzymanych wyników opisanych w czterech oryginalnych publikacjach naukowych [P1], [P2], [P4] i [P5] można wysunąć następujące wnioski i wyróżnić najważniejsze dokonania:

1. Opracowanie czułego i selektywnego fluorescencyjnego systemu bioczuJNIKOWEGO opartego o sondę nukleotydową typu „sygnalizator molekularny”, który jest zdolny do:
 - a) wykrycia komplementarnego oligonukleotydu w stężeniu 26 nM,
 - b) rozróżniania sekwencji oligonukleotydowych różniących się jednym nukleotydem,
 - c) wykrywania sekwencji nukleotydowej mRNA kodującej surwiwinę, w żywych komórkach nabłonka gruczołakoraka okrężnicy SW480,
 - d) rozróżniania komórek nowotworowych od prawidłowych.
2. Opracowanie skutecznej metody transfekcji komórek sondą nukleotydową przy użyciu dwóch nanonośników: tlenku grafenu i liposomów.
3. Odkrycie, że komplementarne oligonukleotydy (S_t), z jednym (S_{t-1}) lub dwoma (S_{t-2}) niekomplementarnymi do „pętli” sondy nukleotydami oraz niekomplementarne oligonukleotydy (S_{t-nc}), posiadają tak jak sonda Sur-MB-Joe drugorzędową strukturę przypominającą „spinkę do włosów”.
4. Zaproponowanie nowego mechanizmu interakcji sondy Sur-MB-Joe z komplementarnymi oligonukleotydami, gdzie biorozpoznanie następuje podczas reakcji typu „spinka do włosów - spinka do włosów” (hairpin–hairpin).
5. Wykazanie występowania oddziaływań supramolekularnych pomiędzy barwnikiem Joe, wygaszaczem Dabcyl i powierzchnią tlenku grafenu.
6. Opracowanie selektywnych fluorescencyjnych systemów bioczuJNIKOWYCH opartych o aptamery, które są zdolne do:
 - a) wykrywania ATP w roztworze buforowym w stężeniu 17 μ M przez aptamer Apt(ATP) [P4] i w stężeniu 27,4 μ M przez aptamer ABP [P5],
 - b) odróżniania poszczególnych nukleotydów,

- c) monitorowania zmian poziomu stężenia adenozy-5'-trifosforanu (ATP) w komórkach nabłonka gruczolakoraka okrężnicy SW480 poddanych działaniu 1 μ M i 5 μ M stężeniu oligomycyny,
 - d) wykrycia stężenia ATP w lizacie komórkowym otrzymanym z komórek hodowanych bez oraz z dodatkiem inhibitora glikolizy, 2-deoksy-D-glukozy (2-DG).
7. Wyznaczenie drugorzędowej struktury aptamerów przypominającej „spinkę do włosów” za pomocą oprogramowania UNAFold.
 8. Wzmocnienie/wygaszenie sygnału fluorescencyjnego opracowanych systemów bioczuJNIKOWYCH może stanowić sygnał analityczny.
 9. Podwyższenie temperatury pomiaru zwiększa skuteczność wygaszania fluorescencji aptameru w obecności ATP i zmniejsza ją dla pozostałych nukleotydów.

Opracowana przeze mnie metoda analityczna oparta na fluorescencyjnych sondach nukleotydowych, wyróżnia się dużą czułością, szybkością odpowiedzi i może stanowić alternatywę dla obecnie stosowanych metod biologii molekularnej. Wykazałam, że za pomocą zaproponowanych systemów bioczuJNIKOWYCH można wykrywać ekspresję genu surwiwiny na poziomie mRNA, monitorować zmiany poziomu stężenia ATP oraz rozróżniać komórki nowotworowe od zdrowych. Przedstawiłam również możliwość zastosowania dwóch nanonośników: tlenku grafenu oraz liposomów, do wprowadzania sond nukleotydowych do wnętrza komórek.

Reasumując, przedstawione w niniejszej rozprawie doktorskiej wyniki badań pozwoliły na pozytywną weryfikację postawionych hipotez.

Uzyskane przeze mnie rezultaty prac badawczych stanowią istotny wkład w kształtujący się obecnie kierunek w zakresie tak diagnostyki, jak i terapii chorób nowotworowych, a także opracowywania skutecznych systemów dostarczania leków.

Bibliografia

1. **Ababay Ketema W. i Delele Worku A.**; (2023); Recent advances of graphene-based materials for emerging technologies; *Results in Chemistry*; **5**; str. 100971.
2. **Adinolfi^a B., Pellegrino M., Giannetti A., Tombelli S., Trono C., Sotgiu G., Varchi G., Ballestri M., Posati T., Carpi S., Nieri P. i Baldini F.**; (2017); Molecular beacon-decorated polymethylmethacrylate core-shell fluorescent nanoparticles for the detection of survivin mRNA in human cancer cells; *Biosensors and Bioelectronics*; **88**; str. 15-24.
3. **Adinolfi^b B., Pellegrino M., Tombelli S., Trono C., Giannetti A., Domenici C., Varchi G., Sotgiu G., Ballestri M. i Baldini F.**; (2018); Polymeric nanoparticles promote endocytosis of a survivin molecular beacon: Localization and fate of nanoparticles and beacon in human A549 cells; *Life Sciences*; **215**; str. 106-112.
4. **Ahmad A., Imran M. i Ahsan H.**; (2023); Biomarkers as Biomedical Bioindicators: Approaches and Techniques for the Detection, Analysis, and Validation of Novel Biomarkers of Diseases; *Pharmaceutics*; **15** (6); str.
5. **Al-Yahya S., Al-Saif M., Al-Ghamdi M., Moghrabi W., Khabar K.S.A. i Al-Souhibani N.**; (2024); Post-transcriptional regulation of BIRC5/survivin expression and induction of apoptosis in breast cancer cells by tristetraproline; *RNA Biology*; **21** (1); str. 1-15.
6. **Alfarouk K.O., Stock C.-M., Taylor S., Walsh M., Muddathir A.K., Verduzco D., Bashir A.H.H., Mohammed O.Y., Elhassan G.O., Harguindey S., Reshkin S.J., Ibrahim M.E. i Rauch C.**; (2015); Resistance to cancer chemotherapy: failure in drug response from ADME to P-gp; *Cancer cell international*; **15**; str. 71-71.
7. **Alharthi S.D., Bijukumar D., Prasad S., Khan A.M. i Mathew M.T.**; (2021); Evolution in Biosensors for Cancers Biomarkers Detection: A Review; *Journal of Bio- and Tribo-Corrosion*; **7** (2); str. 42.
8. **Ambrosini G., Adida C. i Altieri D.C.**; (1997); A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma; *Nat Med*; **3** (8); str. 917-921.
9. **Andrew A.S., Parker S., Anderson J.C., Rees J.R., Robinson C., Riddle B. i Butterly L.F.**; (2018); Risk Factors for Diagnosis of Colorectal Cancer at a Late Stage: a Population-Based Study; *J Gen Intern Med*; **33** (12); str. 2100-2105.
10. **Andrews J.P.M., Joshi S.S., Tzolos E., Syed M.B., Cuthbert H., Crica L.E., Lozano N., Okwelogu E., Raftis J.B., Bruce L., Poland C.A., Duffin R.,**

- Fokkens P.H.B., Boere A.J.F., Leseman D.L.A.C., Megson I.L., Whitfield P.D., Ziegler K., Tammireddy S., Hadjidemetriou M., Bussy C., Cassee F.R., Newby D.E., Kostarelos K. i Miller M.R.;** (2024); First-in-human controlled inhalation of thin graphene oxide nanosheets to study acute cardiorespiratory responses; *Nature Nanotechnology*; **19** (5); str. 705-714.
11. **Ashton T.M., McKenna W.G., Kunz-Schughart L.A. i Higgins G.S.;** (2018); Oxidative Phosphorylation as an Emerging Target in Cancer Therapy; *Clinical Cancer Research*; **24** (11); str. 2482-2490.
12. **Awad N.S., Salkho N.M., Abuwatfa W.H., Paul V., AlSawaftah N.M. i Husseini G.A.;** (2023); Tumor vasculature vs tumor cell targeting: Understanding the latest trends in using functional nanoparticles for cancer treatment; *OpenNano*; **11**; str. 100136.
13. **Barba-Rosado L.V., Carrascal-Hernández D.C., Insuasty D. i Grande-Tovar C.D.;** (2024); Graphene Oxide (GO) for the Treatment of Bone Cancer: A Systematic Review and Bibliometric Analysis; *Nanomaterials*; **14** (2); str. 186.
14. **Batool S., Sohail S., ud Din F., Alamri A.H., Alqahtani A.S., Alshahrani M.A., Alshehri M.A. i Choi H.G.;** (2023); A detailed insight of the tumor targeting using nanocarrier drug delivery system; *Drug Delivery*; **30** (1); str. 2183815.
15. **Battisti A., Samal S.K. i Puppi D.;** (2023); Biosensing Systems Based on Graphene Oxide Fluorescence Quenching Effect; *Micromachines*; **14** (8); str. 1522.
16. **Bergers G. i Fendt S.-M.;** (2021); The metabolism of cancer cells during metastasis; *Nature Reviews Cancer*; **21** (3); str. 162-180.
17. **Bidar N., Amini M., Oroojalian F., Baradaran B., Hosseini S.S., Shahbazi M.-A., Hashemzaei M., Mokhtarzadeh A., Hamblin M.R. i de la Guardia M.;** (2021); Molecular beacon strategies for sensing purpose; *TrAC Trends in Analytical Chemistry*; **134**; str. 116143.
18. **Bohunicky B. i Mousa S.A.;** (2010); Biosensors: the new wave in cancer diagnosis; *Nanotechnol Sci Appl*; **4**; str. 1-10.
19. **Bononi G., Masoni S., Di Bussolo V., Tuccinardi T., Granchi C. i Minutolo F.;** (2022); Historical perspective of tumor glycolysis: A century with Otto Warburg; *Seminars in Cancer Biology*; **86**; str. 325-333.

20. **Bray F., Laversanne M., Weiderpass E. i Soerjomataram I.**; (2021); The ever-increasing importance of cancer as a leading cause of premature death worldwide; *Cancer*; **127** (16); str. 3029-3030.
21. **Camarca A., Varriale A., Capo A., Pennacchio A., Calabrese A., Giannattasio C., Murillo Almuzara C., D'Auria S. i Staiano M.**; (2021); Emergent Biosensing Technologies Based on Fluorescence Spectroscopy and Surface Plasmon Resonance; *Sensors*; **21** (3); str. 906.
22. **Canoura J., Alkhamis O., Liu Y., Willis C. i Xiao Y.**; (2022); High-throughput quantitative binding analysis of DNA aptamers using exonucleases; *Nucleic Acids Research*; **51** (4); str. e19-e19.
23. **Cebadero-Dominguez Ó., Medrano-Padial C., Puerto M., Sánchez-Ballester S., Cameán A.M. i Jos Á.**; (2023); Genotoxicity evaluation of graphene derivatives by a battery of in vitro assays; *Chemico-Biological Interactions*; **372**; str. 110367.
24. **Cetraro P., Plaza-Diaz J., MacKenzie A. i Abadía-Molina F.**; (2022); A Review of the Current Impact of Inhibitors of Apoptosis Proteins and Their Repression in Cancer; *Cancers (Basel)*; **14** (7); str.
25. **Chauhan K., Woo J., Jung W. i Kim D.-E.**; (2023); Poly(ethylene glycol)-Engrafted Graphene Oxide for Gene Delivery and Nucleic Acid Amplification; *Materials*; **16** (23); str. 7434.
26. **Chavoshi H., Bornehdeli S., Asadi M., Dolatkhah R., Caner A. i Raeisi M.**; (2023); microRNAs Regulate Survivin in Colorectal Cancer Patients; *Adv Biomed Res*; **12**; str. 227.
27. **Chen H., Zhang S., Hsiao Y.-C., Wang Q., Yu J.-S. i Li W.**; (2022); Graphene Oxide and Fluorescent-Aptamer-Based Novel Aptasensors for Detection of Metastatic Colorectal Cancer Cells; *Polymers*; **14** (15); str. 3040.
28. **Chen^a W.C., Liu Q., Fu J.X. i Kang S.Y.**; (2004); Expression of survivin and its significance in colorectal cancer; *World J Gastroenterol*; **10** (19); str. 2886-2889.
29. **Chen^b X., Gole J., Gore A., He Q., Lu M., Min J., Yuan Z., Yang X., Jiang Y., Zhang T., Suo C., Li X., Cheng L., Zhang Z., Niu H., Li Z., Xie Z., Shi H., Zhang X., Fan M., Wang X., Yang Y., Dang J., McConnell C., Zhang J., Wang J., Yu S., Ye W., Gao Y., Zhang K., Liu R. i Jin L.**; (2020); Non-invasive early detection of cancer four years before conventional diagnosis using a blood test; *Nature Communications*; **11** (1); str. 3475.

30. **Chen^c X., Feng Y., Chen H., Zhang Y., Wang X. i Zhou N.**; (2022); Fluorescent Aptasensor for Highly Specific Detection of ATP Using a Newly Screened Aptamer; *Sensors*; **22** (7); str. 2425.
31. **Chen^e J., Hu S., Sun M., Shi J., Zhang H., Yu H. i Yang Z.**; (2024); Recent advances and clinical translation of liposomal delivery systems in cancer therapy; *European Journal of Pharmaceutical Sciences*; **193**; str. 106688.
32. **Cho H.J., Kim H.R., Park Y.S., Kim Y.-H., Kim D.K. i Park S.-I.**; (2015); Prognostic value of survivin expression in stage III non-small cell lung cancer patients treated with platinum-based therapy; *Surgical Oncology*; **24** (4); str. 329-334.
33. **Chu B., Wang A., Cheng L., Chen R., Shi H., Song B., Dong F., Wang H. i He Y.**; (2021); Ex vivo and in vivo fluorescence detection and imaging of adenosine triphosphate; *Journal of Nanobiotechnology*; **19** (1); str. 187.
34. **Cicha I., Priefer R., Severino P., Souto E.B. i Jain S.**; (2022); Biosensor-Integrated Drug Delivery Systems as New Materials for Biomedical Applications; *Biomolecules*; **12** (9); str.
35. **Cohen C., Lohmann C.M., Cotsonis G., Lawson D. i Santoianni R.**; (2003); Survivin Expression in Ovarian Carcinoma: Correlation with Apoptotic Markers and Prognosis; *Modern Pathology*; **16** (6); str. 574-583.
36. **Cooper G.M.**; (2000) The Cell: A molecular approach. 2nd edition. *Sunderland (MA): Sinauer associates. Regulators of cell cycle progression.*
37. **Crosby D., Bhatia S., Brindle K.M., Coussens L.M., Dive C., Emberton M., Esener S., Fitzgerald R.C., Gambhir S.S., Kuhn P., Rebbeck T.R. i Balasubramanian S.**; (2022); Early detection of cancer; *Science*; **375** (6586); str. eaay9040.
38. **Cunha A., Silva P.M.A., Sarmiento B. i Queirós O.**; (2023); Targeting Glucose Metabolism in Cancer Cells as an Approach to Overcoming Drug Resistance; *Pharmaceutics*; **15** (11); str.
39. **Das S., Dey M.K., Devireddy R. i Gartia M.R.**; (2024); Biomarkers in Cancer Detection, Diagnosis, and Prognosis; *Sensors*; **24** (1); str. 37.
40. **Deptała A.**; (2017); U chorych na raka okrężnicy w II stopniu zaawansowania należy stosować uzupełniającą chemioterapię; *Biuletyn Polskiego Towarzystwa Onkologicznego Nowotwory*; **2** (6); str. 480-485.

41. **Dos Santos Rodrigues F.H., Delgado G.G., Santana da Costa T. i Tasic L.;** (2023); Applications of fluorescence spectroscopy in protein conformational changes and intermolecular contacts; *BBA Adv*; **3**; str. 100091.
42. **Ejigah V., Owoseni O., Bataille-Backer P., Ogundipe O.D., Fisusi F.A. i Adesina S.K.;** (2022); Approaches to Improve Macromolecule and Nanoparticle Accumulation in the Tumor Microenvironment by the Enhanced Permeability and Retention Effect; *Polymers*; **14** (13); str. 2601.
43. **Famulok M. i Mayer G.;** (1999); Aptamers as tools in molecular biology and immunology; *Curr Top Microbiol Immunol*; **243**; str. 123-136.
44. **Feitelson M.A., Arzumanyan A., Kulathinal R.J., Blain S.W., Holcombe R.F., Mahajna J., Marino M., Martinez-Chantar M.L., Nawroth R., Sanchez-Garcia I., Sharma D., Saxena N.K., Singh N., Vlachostergios P.J., Guo S., Honoki K., Fujii H., Georgakilas A.G., Bilsland A., Amedei A., Niccolai E., Amin A., Ashraf S.S., Boosani C.S., Guha G., Ciriolo M.R., Aquilano K., Chen S., Mohammed S.I., Azmi A.S., Bhakta D., Halicka D., Keith W.N. i Nowsheen S.;** (2015); Sustained proliferation in cancer: Mechanisms and novel therapeutic targets; *Seminars in Cancer Biology*; **35**; str. S25-S54.
45. **Fernandes D.A.;** (2023); Liposomes for Cancer Theranostics; *Pharmaceutics*; **15** (10); str. 2448.
46. **Figueiredo J., Djavaheiri-Mergny M., Ferret L., Mergny J.-L. i Cruz C.;** (2023); Harnessing G-quadruplex ligands for lung cancer treatment: A comprehensive overview; *Drug Discovery Today*; **28** (12); str. 103808.
47. **Fiorillo M., Ózsvári B., Sotgia F. i Lisanti M.P.;** (2021); High ATP Production Fuels Cancer Drug Resistance and Metastasis: Implications for Mitochondrial ATP Depletion Therapy; *Frontiers in oncology*; **11**; str. 740720-740720.
48. **Förster T.;** (1948); Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz; *Annalen der Physik*; **437** (1-2); str. 55-75.
49. **Frąckowiak D.;** (1988); The Jablonski diagram; *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*; **2** (3); str. 399.
50. **Galeş L.N., Păun M.-A., Anghel R.M. i Trifănescu O.G.;** (2024); Cancer Screening: Present Recommendations, the Development of Multi-Cancer Early Development Tests, and the Prospect of Universal Cancer Screening; *Cancers*; **16** (6); str. 1191.

51. **Gao Y., Liu X., Chen N., Yang X. i Tang F.;** (2023); Recent Advance of Liposome Nanoparticles for Nucleic Acid Therapy; *Pharmaceutics*; **15** (1); str.
52. **Gawel S.H., Jackson L., Nicolette J. i J. D.G.;** (2022); Current and future opportunities for liquid biopsy of circulating biomarkers to aid in early cancer detection; *Journal of Cancer Metastasis and Treatment*; **8** (5); str. 26.
53. **Gilbert S.M., Oliphant C.J., Hassan S., Peille A.L., Bronsert P., Falzoni S., Di Virgilio F., McNulty S. i Lara R.;** (2019); ATP in the tumour microenvironment drives expression of nfP2X7, a key mediator of cancer cell survival; *Oncogene*; **38** (2); str. 194-208.
54. **Gogvadze V., Zhivotovsky B. i Orrenius S.;** (2010); The Warburg effect and mitochondrial stability in cancer cells; *Molecular Aspects of Medicine*; **31** (1); str. 60-74.
55. **Grabowski P., Kühnel T., Mühr-Wilkenshoff F., Heine B., Stein H., Höpfner M., Germer C.T. i Scherübl H.;** (2003); Prognostic value of nuclear survivin expression in oesophageal squamous cell carcinoma; *Br J Cancer*; **88** (1); str. 115-119.
56. **Gupta K., Walton R. i Kataria S.P.;** (2021); Chemotherapy-Induced Nausea and Vomiting: Pathogenesis, Recommendations, and New Trends; *Cancer Treatment and Research Communications*; **26**; str. 100278.
57. **Han S.X., Jia X., Ma J.L. i Zhu Q.;** (2013); Molecular beacons: a novel optical diagnostic tool; *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*; **61** (2); str. 139-148.
58. **Hanahan D.;** (2022); Hallmarks of Cancer: New Dimensions; *Cancer Discovery*; **12** (1); str. 31-46.
59. **Hanahan D. i Weinberg Robert A.;** (2011); Hallmarks of Cancer: The Next Generation; *Cell*; **144** (5); str. 646-674.
60. **Hernandez J.M., Farma J.M., Coppola D., Hakam A., Fulp W.J., Chen D.-T., Siegel E.M., Yeatman T.J. i Shibata D.;** (2011); Expression of the Antiapoptotic Protein Survivin in Colon Cancer; *Clinical Colorectal Cancer*; **10** (3); str. 188-193.
61. **Herst P.M., Carson G.M., Eccles D.A. i Berridge M.V.;** (2022); Bioenergetic and Metabolic Adaptation in Tumor Progression and Metastasis; *Frontiers in Oncology*; **12**; str.

-
62. **Hester S., B. Ferenz K., Adick A., Kakalias C., Mulac D., Azhdari S. i Langer K.;** (2023); Triglyceride-filled albumin-based nanocapsules: A promising new system to avoid discarding poorly water-soluble drug candidates; *International Journal of Pharmaceutics*; **646**; str. 123454.
63. **Huang^a X., Zhu Y. i Kianfar E.;** (2021); Nano Biosensors: Properties, applications and electrochemical techniques; *Journal of Materials Research and Technology*; **12**; str. 1649-1672.
64. **Huang^b L., Xu W., Huang X., Yang B., Yu H., Xu H. i Huang L.;** (2024); Ultrasensitive miRNA detection: A novel DNA nanomachine using split-type molecular beacons-mediated cascade amplification for cancer diagnostics; *Analytica Chimica Acta*; **1319**; str. 342962.
65. **Huizenga D.E. i Szostak J.W.;** (1995); A DNA Aptamer That Binds Adenosine and ATP; *Biochemistry*; **34** (2); str. 656-665.
66. **IUPAC,** (1992); Glossary for chemists of terms used in biotechnology (IUPAC Recommendations 1992); str. 148.
67. **Jagiela J., Bartnicki P. i Rysz J.;** (2021); Nephrotoxicity as a Complication of Chemotherapy and Immunotherapy in the Treatment of Colorectal Cancer, Melanoma and Non-Small Cell Lung Cancer; *International Journal of Molecular Sciences*; **22** (9); str. 4618.
68. **Jakubowska K., Pryczynicz A., Dymicka-Piekarska V., Famulski W. i Guzińska-Ustymowicz K.;** (2016); Immunohistochemical expression and serum level of survivin protein in colorectal cancer patients; *Oncol Lett*; **12** (5); str. 3591-3597.
69. **Jaworski S., Strojny-Cieślak B., Wierzbiński M., Kutwin M., Sawosz E., Kamaszewski M., Matuszewski A., Sosnowska M., Szczepaniak J., Daniluk K., Lange A., Pruchniewski M., Zawadzka K., Łojkowski M. i Chwalibog A.;** (2021); Comparison of the Toxicity of Pristine Graphene and Graphene Oxide, Using Four Biological Models; *Materials*; **14** (15); str. 4250.
70. **Jiříčková A., Jankovský O., Sofer Z. i Sedmidubský D.;** (2022); Synthesis and Applications of Graphene Oxide; *Materials (Basel)*; **15** (3); str.
71. **Jouha J., Li F. i Xiong H.;** (2023); A fluorescence biosensor based on DNA aptamers-COF for highly selective detection of ATP and thrombin; *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*; **295**; str. 122615.

-
72. **Kalliakmanis J.G., Kouvidou C., Latoufis C., Kouvatses G., Anagnostakis D., Papatheodoridis G., Koskinas J. i Archimandritis A.;** (2010); Survivin expression in colorectal carcinomas: correlations with clinicopathological parameters and survival; *Dig Dis Sci*; **55** (10); str. 2958-2964.
73. **Kumbhar P.R., Kumar P., Lasure A., Velayutham R. i Mandal D.;** (2023); An updated landscape on nanotechnology-based drug delivery, immunotherapy, vaccinations, imaging, and biomarker detections for cancers: recent trends and future directions with clinical success; *Discover Nano*; **18** (1); str. 156.
74. **Lakowicz J.R.;** (1980); Fluorescence spectroscopic investigations of the dynamic properties of proteins, membranes and nucleic acids; *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*; **2** (1); str. 91-119.
75. **Lehner R., Lucia M.S., Jarboe E.A., Orlicky D., Shroyer A.L., McGregor J.A. i Shroyer K.R.;** (2002); Immunohistochemical localization of the IAP protein survivin in bladder mucosa and transitional cell carcinoma; *Appl Immunohistochem Mol Morphol*; **10** (2); str. 134-138.
76. **Lei X., Li K., Liu Y., Wang Z.Y., Ruan B.J., Wang L., Xiang A., Wu D. i Lu Z.;** (2017); Co-delivery nanocarriers targeting folate receptor and encapsulating 2-deoxyglucose and α -tocopheryl succinate enhance anti-tumor effect in vivo; *Int J Nanomedicine*; **12**; str. 5701-5715.
77. **Li^a J., Eu J.Q., Kong L.R., Wang L., Lim Y.C., Goh B.C. i Wong A.L.A.;** (2020); Targeting Metabolism in Cancer Cells and the Tumour Microenvironment for Cancer Therapy; *Molecules*; **25** (20); str.
78. **Liang Z., Solano A., Lou J. i Hinde E.;** (2024); Histone FRET reports the spatial heterogeneity in nanoscale chromatin architecture that is imparted by the epigenetic landscape at the level of single foci in an intact cell nucleus; *Chromosoma*; **133** (1); str. 5-14.
79. **Li^b J., Zeng H., Zeng Z., Zeng Y. i Xie T.;** (2021); Promising Graphene-Based Nanomaterials and Their Biomedical Applications and Potential Risks: A Comprehensive Review; *ACS Biomaterials Science & Engineering*; **7** (12); str. 5363-5396.
80. **Li^c Q., Gao C., Shen X. i Xing D.;** (2024); Graphene oxide-functionalized molecular beacon for real-time interference-free detection of Ki-67 mRNA in living cells; *Talanta*; **278**; str. 126538.
81. **Lin C.S., Liu L.T., Ou L.H., Pan S.C., Lin C.I. i Wei Y.H.;** (2018); Role of mitochondrial function in the invasiveness of human colon cancer cells; *Oncol Rep*; **39** (1); str. 316-330.

82. **Loo J.M., Scherl A., Nguyen A., Man F.Y., Weinberg E., Zeng Z., Saltz L., Paty P.B. i Tavazoie S.F.;** (2015); Extracellular metabolic energetics can promote cancer progression; *Cell*; **160** (3); str. 393-406.
83. **Lu C., Lopez A., Zheng J. i Liu J.;** (2022); Using the Intrinsic Fluorescence of DNA to Characterize Aptamer Binding; *Molecules*; **27** (22); str. 7809.
84. **Marcucci F. i Rumio C.;** (2021); Glycolysis-induced drug resistance in tumors—A response to danger signals?; *Neoplasia*; **23** (2); str. 234-245.
85. **Mármol I., Sánchez-de-Diego C., Pradilla Dieste A., Cerrada E. i Rodriguez Yoldi M.J.;** (2017); Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer; *Int J Mol Sci*; **18** (1); str.
86. **Martins Pinto M., Paumard P., Bouchez C., Ransac S., Duvezin-Caubet S., Mazat J.P., Rigoulet M. i Devin A.;** (2023); The Warburg effect and mitochondrial oxidative phosphorylation: Friends or foes?; *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*; **1864** (1); str. 148931.
87. **Mimoto F., Tatsumi K., Shimizu S., Kadono S., Haraya K., Nagayasu M., Suzuki Y., Fujii E., Kamimura M., Hayasaka A., Kawauchi H., Ohara K., Matsushita M., Baba T., Susumu H., Sakashita T., Muraoka T., Aso K., Katada H., Tanaka E., Nakagawa K., Hasegawa M., Ayabe M., Yamamoto T., Tanba S., Ishiguro T., Kamikawa T., Nambu T., Kibayashi T., Azuma Y., Tomii Y., Kato A., Ozeki K., Murao N., Endo M., Kikuta J., Kamata-Sakurai M., Ishii M., Hattori K. i Igawa T.;** (2020); Exploitation of Elevated Extracellular ATP to Specifically Direct Antibody to Tumor Microenvironment; *Cell Rep*; **33** (12); str. 108542.
88. **Monzó M., Rosell R., Felip E., Astudillo J., Sánchez J.J., Maestre J., Martín C., Font A., Barnadas A. i Abad A.;** (1999); A novel anti-apoptosis gene: Re-expression of survivin messenger RNA as a prognosis marker in non-small-cell lung cancers; *J Clin Oncol*; **17** (7); str. 2100-2104.
89. **Nakahara R., Maeda K., Aki S. i Osawa T.;** (2023); Metabolic adaptations of cancer in extreme tumor microenvironments; *Cancer Sci*; **114** (4); str. 1200-1207.
90. **Nasu S., Yagihashi A., Izawa A., Saito K., Asanuma K., Nakamura M., Kobayashi D., Okazaki M. i Watanabe N.;** (2002); Survivin mRNA expression in patients with breast cancer; *Anticancer Res*; **22** (3); str. 1839-1843.
91. **Nsairat H., Alshaer W., Odeh F., Esawi E., Khater D., Bawab A.A., El-Tanani M., Awidi A. i Mubarak M.S.;** (2023); Recent advances in using

- liposomes for delivery of nucleic acid-based therapeutics; *OpenNano*; **11**; str. 100132.
92. **Nsairat H., Khater D., Sayed U., Odeh F., Al Bawab A. i Alshaer W.**; (2022); Liposomes: structure, composition, types, and clinical applications; *Heliyon*; **8** (5); str. e09394.
93. **Pacheco-Velázquez S.C., Robledo-Cadena D.X., Hernández-Reséndiz I., Gallardo-Pérez J.C., Moreno-Sánchez R. i Rodríguez-Enríquez S.**; (2018); Energy Metabolism Drugs Block Triple Negative Breast Metastatic Cancer Cell Phenotype; *Molecular Pharmaceutics*; **15** (6); str. 2151-2164.
94. **Pachimatla A.G., Fenstermaker R., Ciesielski M. i Yendamuri S.**; (2024); Survivin in lung cancer: a potential target for therapy and prevention-a narrative review; *Transl Lung Cancer Res*; **13** (2); str. 362-374.
95. **Park S., Cho E., Chueng S.-T.D., Yoon J.-S., Lee T. i Lee J.-H.**; (2023); Aptameric Fluorescent Biosensors for Liver Cancer Diagnosis; *Biosensors*; **13** (6); str. 617.
96. **Paul T., Bera S.C., Agnihotri N. i Mishra P.P.**; (2016); Single-Molecule FRET Studies of the Hybridization Mechanism during Noncovalent Adsorption and Desorption of DNA on Graphene Oxide; *The Journal of Physical Chemistry B*; **120** (45); str. 11628-11636.
97. **Pearson S.E., Caimino C., Shabbir M. i Baguley D.M.**; (2021); The impact of chemotherapy-induced inner ear damage on quality of life in cancer survivors: a qualitative study; *Journal of Cancer Survivorship*; str.
98. **Pelicano H., Martin D.S., Xu R.H. i Huang P.**; (2006); Glycolysis inhibition for anticancer treatment; *Oncogene*; **25** (34); str. 4633-4646.
99. **Peng Y., Li M., Gong F., Liu X., Xiong J. i Wang K.**; (2024); In situ imaging of mRNA transcripts based on split-aptamer and split protein in living cells; *RSC Advances*; **14** (15); str. 10146-10151.
100. **Polat E.O., Cetin M.M., Tabak A.F., Bilget Güven E., Uysal B., Arsan T., Kabbani A., Hamed H. i Gül S.B.**; (2022); Transducer Technologies for Biosensors and Their Wearable Applications; *Biosensors (Basel)*; **12** (6); str.
101. **Ponnelle T., Chapusot C., Martin L., Bouvier A.M., Plenchette S., Faivre J., Solary E. i Piard F.**; (2005); Cellular localisation of Survivin: impact on the prognosis in colorectal cancer; *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*; **131** (8); str. 504-510.

102. **Qi G., Tuncel H., Aoki E., Tanaka S., Oka S., Kaneko I., Okamoto M., Tatsuka M., Nakai S. i Shimamoto F.;** (2009); Intracellular localization of survivin determines biological behavior in colorectal cancer; *Oncol Rep*; **22** (3); str. 557-562.
103. **Ratajczak^a K. i Stobiecka M.;** (2017); Ternary Interactions and Energy Transfer between Fluorescein Isothiocyanate, Adenosine Triphosphate, and Graphene Oxide Nanocarriers; *J Phys Chem B*; **121** (28); str. 6822-6830.
104. **Ratajczak^b K., Krazinski B.E., Kowalczyk A.E., Dworakowska B., Jakiela S. i Stobiecka M.;** (2018); Optical Biosensing System for the Detection of Survivin mRNA in Colorectal Cancer Cells Using a Graphene Oxide Carrier-Bound Oligonucleotide Molecular Beacon; *Nanomaterials (Basel)*; **8** (7); str.
105. **Ratajczak^c K., Krazinski B.E., Kowalczyk A.E., Dworakowska B., Jakiela S. i Stobiecka M.;** (2018); Hairpin-Hairpin Molecular Beacon Interactions for Detection of Survivin mRNA in Malignant SW480 Cells; *ACS Appl Mater Interfaces*; **10** (20); str. 17028-17039.
106. **Ratajczak^d K., Lukasiak A., Grel H., Dworakowska B., Jakiela S. i Stobiecka M.;** (2019); Monitoring of dynamic ATP level changes by oligomycin-modulated ATP synthase inhibition in SW480 cancer cells using fluorescent "On-Off" switching DNA aptamer; *Anal Bioanal Chem*; **411** (26); str. 6899-6911.
107. **Ratajczak^e K. i Stobiecka M.;** (2023); DNA Aptamer Beacon Probe (ABP) for Monitoring of Adenosine Triphosphate Level in SW480 Cancer Cells Treated with Glycolysis Inhibitor 2-Deoxyglucose; *Int J Mol Sci*; **24** (11); str.
108. **Roxo C., Kotkowiak W. i Pasternak A.;** (2019); G-Quadruplex-Forming Aptamers—Characteristics, Applications, and Perspectives; *Molecules*; **24** (20); str. 3781.
109. **Roy S., Dukic T., Bhandary B., Tu K.J., Molitoris J., Ko Y.H. i Shukla H.D.;** (2022); 3-Bromopyruvate inhibits pancreatic tumor growth by stalling glycolysis, and dismantling mitochondria in a syngeneic mouse model; *Am J Cancer Res*; **12** (11); str. 4977-4987.
110. **Rybak L.P., Whitworth C.A., Mukherjee D. i Ramkumar V.;** (2007); Mechanisms of cisplatin-induced ototoxicity and prevention; *Hearing Research*; **226** (1); str. 157-167.
111. **Salmaso S. i Caliceti P.;** (2013); Stealth Properties to Improve Therapeutic Efficacy of Drug Nanocarriers; *Journal of Drug Delivery*; **2013** (1); str. 374252.

-
112. **Sameer Khan M., Gupta G., Alsayari A., Wahab S., Sahebkar A. i Kesharwani P.**; (2024); Advancements in liposomal formulations: A comprehensive exploration of industrial production techniques; *International Journal of Pharmaceutics*; **658**; str. 124212.
113. **Sang R., Stratton B., Engel A. i Deng W.**; (2021); Liposome technologies towards colorectal cancer therapeutics; *Acta Biomaterialia*; **127**; str. 24-40.
114. **Sanhueza C., Wehinger S., Castillo Bennett J., Valenzuela M., Owen G.I. i Quest A.F.**; (2015); The twisted survivin connection to angiogenesis; *Mol Cancer*; **14**; str. 198.
115. **Sapierzyński R.**; (2012); Przerzuty nowotworowe – drogi szerzenia się nowotworów; *Życie Weterynaryjne*; **87** (10); str. 821-827.
116. **Sarela A.I., Macadam R.C., Farmery S.M., Markham A.F. i Guillou P.J.**; (2000); Expression of the antiapoptosis gene, survivin, predicts death from recurrent colorectal carcinoma; *Gut*; **46** (5); str. 645-650.
117. **Satoh K., Kaneko K., Hirota M., Masamune A., Satoh A. i Shimosegawa T.**; (2001); Expression of survivin is correlated with cancer cell apoptosis and is involved in the development of human pancreatic duct cell tumors; *Cancer*; **92** (2); str. 271-278.
118. **Sebastian C., Ferrer C., Serra M., Choi J.-E., Ducano N., Mira A., Shah M.S., Stopka S.A., Perciaccante A.J., Isella C., Moya-Rull D., Vara-Messler M., Giordano S., Maldi E., Desai N., Capen D.E., Medico E., Cetinbas M., Sadreyev R.I., Brown D., Rivera M.N., Sapino A., Breault D.T., Agar N.Y.R. i Mostoslavsky R.**; (2022); A non-dividing cell population with high pyruvate dehydrogenase kinase activity regulates metabolic heterogeneity and tumorigenesis in the intestine; *Nature Communications*; **13** (1); str. 1503.
119. **Shahar N. i Larisch S.**; (2020); Inhibiting the inhibitors: Targeting anti-apoptotic proteins in cancer and therapy resistance; *Drug Resist Updat*; **52**; str. 100712.
120. **Shariat S.F., Ashfaq R., Karakiewicz P.I., Saeedi O., Sagalowsky A.I. i Lotan Y.**; (2007); Survivin expression is associated with bladder cancer presence, stage, progression, and mortality; *Cancer*; **109** (6); str. 1106-1113.
121. **Sheng X., Wang M.-M., Zhang G.-D., Su Y., Fang H.-B., Yu Z.-H. i Su Z.**; (2024); Dual inhibition of oxidative phosphorylation and glycolysis to enhance cancer therapy; *Bioorganic Chemistry*; **147**; str. 107325.

122. **Shi L., Lu J., Xia X., Liu X., Li H., Li X., Zhu J., Li X., Sun H. i Yang X.;** (2024); Clinically used drug arsenic trioxide targets XIAP and overcomes apoptosis resistance in an organoid-based preclinical cancer model; *Chemical Science*; **15** (22); str. 8311-8322.
123. **Shintani M., Sangawa A., Yamao N. i Kamoshida S.;** (2013); Immunohistochemical expression of nuclear and cytoplasmic survivin in gastrointestinal carcinoma; *Int J Clin Exp Pathol*; **6** (12); str. 2919-2927.
124. **Siddik Z.H.;** (2003); Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance; *Oncogene*; **22** (47); str. 7265-7279.
125. **Siegel R.L., Miller K.D., Goding Sauer A., Fedewa S.A., Butterly L.F., Anderson J.C., Cercek A., Smith R.A. i Jemal A.;** (2020); Colorectal cancer statistics, 2020; *CA: A Cancer Journal for Clinicians*; **70** (3); str. 145-164.
126. **Šimková E. i Staněk D.;** (2012); Probing Nucleic Acid Interactions and Pre-mRNA Splicing by Förster Resonance Energy Transfer (FRET) Microscopy; *International Journal of Molecular Sciences*; **13** (11); str. 14929-14945.
127. **Simón L., Torres K., Contreras P., Díaz-Valdivia N., Leyton L. i Quest A.F.G.;** (2024); Inhibition of glycolysis and Src/Akt signaling reduces Caveolin-1-enhanced metastasis; *Biomedicine & Pharmacotherapy*; **176**; str. 116841.
128. **Sousa I., Rodrigues F., Prazeres H., Lima R.T. i Soares P.;** (2018); Liposomal therapies in oncology: does one size fit all?; *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*; **82** (5); str. 741-755.
129. **Stauber R.H., Mann W. i Knauer S.K.;** (2007); Nuclear and cytoplasmic survivin: molecular mechanism, prognostic, and therapeutic potential; *Cancer Res*; **67** (13); str. 5999-6002.
130. **Su S. i Kang P.M.;** (2020); Recent Advances in Nanocarrier-Assisted Therapeutics Delivery Systems; *Pharmaceutics*; **12** (9); str.
131. **Sung H., Ferlay J., Siegel R.L., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A. i Bray F.;** (2021); Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries; *CA: A Cancer Journal for Clinicians*; **71** (3); str. 209-249.
132. **Tanaka K., Iwamoto S., Gon G., Nohara T., Iwamoto M. i Tanigawa N.;** (2000); Expression of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas; *Clin Cancer Res*; **6** (1); str. 127-134.

133. **Tang Z., Zhao L., Yang Z., Liu Z., Gu J., Bai B., Liu J., Xu J. i Yang H.;** (2018); Mechanisms of oxidative stress, apoptosis, and autophagy involved in graphene oxide nanomaterial anti-osteosarcoma effect; *Int J Nanomedicine*; **13**; str. 2907-2919.
134. **Tyagi S. i Kramer F.R.;** (1996); Molecular Beacons: Probes that Fluoresce upon Hybridization; *Nature Biotechnology*; **14** (3); str. 303-308.
135. **Ungprasert P., Cheungpasitporn W., Crowson C.S. i Matteson E.L.;** (2015); Individual non-steroidal anti-inflammatory drugs and risk of acute kidney injury: A systematic review and meta-analysis of observational studies; *European Journal of Internal Medicine*; **26** (4); str. 285-291.
136. **Valeur B. i Berberan-Santos M.N.;** (2011); A Brief History of Fluorescence and Phosphorescence before the Emergence of Quantum Theory; *Journal of Chemical Education*; **88** (6); str. 731-738.
137. **Vangijzegem T., Lecomte V., Ternad I., Van Leuven L., Muller R.N., Stanicki D. i Laurent S.;** (2023); Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPION): From Fundamentals to State-of-the-Art Innovative Applications for Cancer Therapy; *Pharmaceutics*; **15** (1); str. 236.
138. **Vay C., Babaei S., Safi S.A., Dizdar L., Rehders A., Haeberle L., Roderburg C., Loosen S.H., Esposito I., Knoefel W.T. i Krieg A.;** (2022); Clinicopathological and Prognostic Value of Survivin Expression in Surgically Resected Pancreatic Ductal Adenocarcinoma; *Cancers (Basel)*; **14** (14); str.
139. **Venkatesan S., Chanda K. i Balamurali M.M.;** (2023); Recent Advancements of Aptamers in Cancer Therapy; *ACS Omega*; **8** (36); str. 32231-32243.
140. **Wang^a B., Chen Z., Ren D. i You Z.;** (2019); A novel dual energy transfer probe for intracellular mRNA detection with high robustness and specificity; *Sensors and Actuators B: Chemical*; **279**; str. 342-350.
141. **Wang^b Q. i Greene M.I.;** (2024); Survivin as a Therapeutic Target for the Treatment of Human Cancer; *Cancers*; **16** (9); str. 1705.
142. **Wang^c T., Ma F. i Qian H.L.;** (2021); Defueling the cancer: ATP synthase as an emerging target in cancer therapy; *Mol Ther Oncolytics*; **23**; str. 82-95.
143. **Warrier N.M., Agarwal P. i Kumar P.;** (2020); Emerging Importance of Survivin in Stem Cells and Cancer: the Development of New Cancer Therapeutics; *Stem Cell Reviews and Reports*; **16** (5); str. 828-852.

144. **WHO¹**; (2023) World health statistics 2023: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals.
145. **WHO²**; (2022); Global Cancer Observatory, Globocan; <https://gco.iarc.who.int/en>.
146. **WHO³**; (2020); Global Health Estimates: Life expectancy and leading causes of death and disability; <https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates>.
147. **Wilcox N.S., Amit U., Reibel J.B., Berlin E., Howell K. i Ky B.**; (2024); Cardiovascular disease and cancer: shared risk factors and mechanisms; *Nature Reviews Cardiology*; str.
148. **Wong K.-Y., Wong M.-S. i Liu J.**; (2024); Aptamer-functionalized liposomes for drug delivery; *Biomedical Journal*; **47** (4); str. 100685.
149. **Wu R., Yang X., Zhou Q., Yu W., Li M., Wo J., Shan W., Zhao H., Chen Y. i Zhan Z.**; (2020); Aurovertin B exerts potent antitumor activity against triple-negative breast cancer in vivo and in vitro via regulating ATP synthase activity and DUSP1 expression; *Pharmazie*; **75** (6); str. 261-265.
150. **Xiao C.D., Zhong M.Q., Gao Y., Yang Z.L., Jia M.H., Hu X.H., Xu Y. i Shen X.C.**; (2023); A Unique G-Quadruplex Aptamer: A Novel Approach for Cancer Cell Recognition, Cell Membrane Visualization, and RSV Infection Detection; *Int J Mol Sci*; **24** (18); str.
151. **Xie J., Wu H., Dai C., Pan Q., Ding Z., Hu D., Ji B., Luo Y. i Hu X.**; (2014); Beyond Warburg effect--dual metabolic nature of cancer cells; *Sci Rep*; **4**; str. 4927.
152. **Yang L.F., Ling M., Kacherovsky N. i Pun S.H.**; (2023); Aptamers 101: aptamer discovery and in vitro applications in biosensors and separations; *Chem Sci*; **14** (19); str. 4961-4978.
153. **Yeung S.J., Pan J. i Lee M.H.**; (2008); Roles of p53, Myc and HIF-1 in Regulating Glycolysis — the Seventh Hallmark of Cancer; *Cellular and Molecular Life Sciences*; **65** (24); str. 3981.
154. **Yu B., Tai H.C., Xue W., Lee L.J. i Lee R.J.**; (2010); Receptor-targeted nanocarriers for therapeutic delivery to cancer; *Molecular Membrane Biology*; **27** (7); str. 286-298.

155. **Yu J., Leung W.K., Ebert M.P., Ng E.K., Go M.Y., Wang H.B., Chung S.C., Malfertheiner P. i Sung J.J.**; (2002); Increased expression of survivin in gastric cancer patients and in first degree relatives; *Br J Cancer*; **87** (1); str. 91-97.
156. **Zacharioudaki D.-E., Fitis I. i Kotti M.**; (2022); Review of Fluorescence Spectroscopy in Environmental Quality Applications; *Molecules*; **27** (15); str. 4801.
157. **Zaniboni A., Bertocchi P., Barni S. i Petrelli F.**; (2016); TAS-102 (Lonsurf) for the Treatment of Metastatic Colorectal Cancer. A Concise Review; *Clin Colorectal Cancer*; **15** (4); str. 292-297.
158. **Zhao J., Tenev T., Martins L.M., Downward J. i Lemoine N.R.**; (2000); The ubiquitin-proteasome pathway regulates survivin degradation in a cell cycle-dependent manner; *Journal of Cell Science*; **113** (23); str. 4363-4371.
159. **Zhao Z., Mei Y., Wang Z. i He W.**; (2022); The Effect of Oxidative Phosphorylation on Cancer Drug Resistance; *Cancers (Basel)*; **15** (1); str.
160. **Zhou Y., Tao L., Qiu J., Xu J., Yang X., Zhang Y., Tian X., Guan X., Cen X. i Zhao Y.**; (2024); Tumor biomarkers for diagnosis, prognosis and targeted therapy; *Signal Transduction and Targeted Therapy*; **9** (1); str. 132.
161. **Zhu H., Wang F., Ju X., Kong L., An T., Zhao Z., Liu J. i Li Y.**; (2018); Aurovertin B sensitizes colorectal cancer cells to NK cell recognition and lysis; *Biochem Biophys Res Commun*; **503** (4); str. 3057-3063.
162. **Zi Y., Yang K., He J., Wu Z., Liu J. i Zhang W.**; (2022); Strategies to enhance drug delivery to solid tumors by harnessing the EPR effects and alternative targeting mechanisms; *Advanced Drug Delivery Reviews*; **188**; str. 114449.
163. **Źródło_danych_GUS**; (2022); Umieralność w 2021 roku - Zgony według przyczyn – dane wstępne. Dane opublikowane w dniu 16.05.2022 r.; *Główny Urząd Statystyczny, Warszawa*; str. 1-6.

Publikacje stanowiące rozprawę doktorską oraz oświadczenia współautorów

PUBLIKACJA 1

Hairpin-Hairpin Molecular Beacon Interactions for Detection of Survivin mRNA in
Malignant SW480 Cells

Ratajczak K., Kraziński B.E., Kowalczyk A.E., Dworakowska B., Jakiela S.,
Stobiecka M.;

ACS Applied Materials and Interfaces, (2018) 10(20) 17028-17039

**Przedruk (adptacja) za zgodą (Hairpin-Hairpin Molecular Beacon Interactions for Detection of Survivin mRNA in Malignant SW480 Cells; Ratajczak K., Kraziński B.E., Kowalczyk A.E., Dworakowska B., Jakiela S., Stobiecka M.; ACS Applied Materials and Interfaces, (2018) 10(20), 17028-17039). Copyright 2024 American Chemical Society.*

Hairpin–Hairpin Molecular Beacon Interactions for Detection of Survivin mRNA in Malignant SW480 Cells

Katarzyna Ratajczak,[†] Bartłomiej E. Krazinski,[‡] Anna E. Kowalczyk,[‡] Beata Dworakowska,[†] Sławomir Jakiela,^{*,†,‡} and Magdalena Stobiecka^{*,†,‡}

[†]Department of Biophysics, Warsaw University of Life Sciences (SGGW), 159 Nowoursynowska Street, 02776 Warsaw, Poland

[‡]Department of Human Histology and Embryology, University of Warmia and Mazury, 30 Warszawska Street, 10082 Olsztyn, Poland

Materialy uzupełniające:

Supporting Information

**Hairpin-hairpin molecular beacon interactions for detection
of survivin mRNA in malignant SW480 cells**

Katarzyna Ratajczak¹, Bartłomiej E. Krazinski², Anna E. Kowalczyk², Beata Dworakowska¹,

Slawomir Jakiela^{1}, Magdalena Stobiecka^{1*}*

¹ Department of Biophysics, Warsaw University of Life Sciences (SGGW), 159
Nowoursynowska Street, 02776 Warsaw, Poland

² Department of Human Histology and Embryology, University of Warmia and Mazury, 30
Warszawska Street, 10082 Olsztyn, Poland

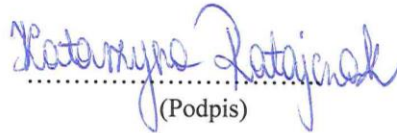
Warszawa, 23.10.2024

Katarzyna Ratajczak
katarzyna_ratajczak@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Nauki Biologiczne
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy K. Ratajczak, B.E. Kraziński, A.E. Kowalczyk, B. Dworakowska, S. Jakiela, M. Stobiecka, (2018) Hairpin-Hairpin Molecular Beacon Interactions for Detection of Survivin mRNA in Malignant SW480 Cells, *ACS Applied Materials and Interfaces*, 10(20), 17028-17039 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na przeglądzie literatury, wykonaniu badań opisanych w manuskrypcie, w tym scharakteryzowanie opracowanej sondy, doświadczenia przy użyciu spektroskopii fluorescencyjnej, hodowla komórek i transfekcja ich przy użyciu liposomów, opracowanie i analiza wyników, pisanie i edycja manuskryptu.


(Podpis)

Olsztyn, 19.01.2022

Bartłomiej Emil Kraziński
Katedra Histologii i Embriologii Człowieka
Wydział Lekarski, Collegium Medicum
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
email: bartlomiej.krazinski@uwm.edu.pl

**Rada Dyscypliny Nauki Biologiczne
Szkoly Głównej Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: *Hairpin-Hairpin Molecular Beacon Interactions for Detection of Survivin mRNA in Malignant SW480 Cells, ACS Appl. Mater. Interfaces* 2018, 10, 20, 17028–17039 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na: przygotowaniu linii komórek raka jelita grubego SW 480 oraz prawidłowego nabłonka okrężnicy CCD 841 CoN do dalszych etapów pracy eksperymentalnej poprzez rozmrożenie, optymalizację warunków hodowli, namnożenie i utworzenie banku komórek oraz przygotowaniu pracy do druku poprzez przekazanie sugestii i korektę manuskryptu.


Podpis

Olsztyn, 19.01.2022

Anna Ewa Kowalczyk
Katedra Histologii i Embriologii Człowieka
Wydział Lekarski, Collegium Medicum
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
email: a.kowalczyk@uwm.edu.pl

**Rada Dyscypliny Nauki Biologiczne
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: *Hairpin-Hairpin Molecular Beacon Interactions for Detection of Survivin mRNA in Malignant SW480 Cells, ACS Appl. Mater. Interfaces* 2018, 10, 20, 17028–17039 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na: przygotowaniu linii komórek raka jelita grubego SW 480 oraz prawidłowego nabłonka okrężnicy CCD 841 CoN do dalszych etapów pracy eksperymentalnej poprzez rozmrożenie, optymalizację warunków hodowli, namnożenie i utworzenie banku komórek oraz przygotowaniu pracy do druku poprzez przekazanie sugestii i korektę manuskryptu.

Anna Kowalczyk
.....
Podpis

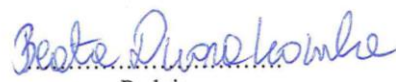
Warszawa, 18.01.2022

Beata Dworakowska
beata_dworakowska@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Nauki Biologiczne
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Katarzyna Ratajczak, Bartłomiej E. Kraziński, Anna E. Kowalczyk, Beata Dworakowska, Sławomir Jakiela i Magdalena Stobiecka, 2018, Hairpin–Hairpin Molecular Beacon Interactions for Detection of Survivin mRNA in Malignant SW480 Cells, ACS Applied Materials & Interfaces, 10, 20, 17028–17039 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na wykonaniu fotografii użytych do fig. 7 i 8.



Podpis

Warszawa, 23.10.2024

Sławomir Jakiela
slawomir_jakiela@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Nauk Biologicznych
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy K. Ratajczak, B.E. Kraziński, A.E. Kowalczyk, B. Dworakowska, S. Jakiela, M. Stobiecka, (2018) Hairpin-Hairpin Molecular Beacon Interactions for Detection of Survivin mRNA in Malignant SW480 Cells, *ACS Applied Materials and Interfaces*, 10(20), 17028-17039 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na pisaniu manuskryptu i odpowiedziach na recenzje.


.....
(Podpis)

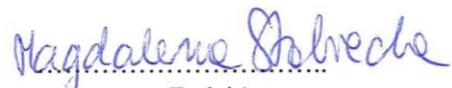
Warszawa, 23.10.2024

Magdalena Stobiecka
magdalena_stobiecka@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Nauki Biologiczne
Szkół Główniej Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy K. Ratajczak, B.E. Kraziński, A.E. Kowalczyk, B. Dworakowska, S. Jakiela, M. Stobiecka, (2018) Hairpin-Hairpin Molecular Beacon Interactions for Detection of Survivin mRNA in Malignant SW480 Cells, *ACS Applied Materials and Interfaces*, 10(20), 17028-17039 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu metodologii i koncepcji badań, jak również pisaniu i edycji manuskryptu, odpowiedziach na recenzje oraz pozyskaniu finansowania.


(Podpis)

PUBLIKACJA 2

Optical biosensing system for the detection of survivin mRNA in colorectal cancer cells
using a graphene oxide carrier-bound oligonucleotide molecular beacon

Ratajczak K., Kraziński B.E., Kowalczyk A.E., Dworakowska B., Jakieła S.,
Stobiecka M.;

Nanomaterials, (2018) 8(7), 510



Communication

Optical Biosensing System for the Detection of Survivin mRNA in Colorectal Cancer Cells Using a Graphene Oxide Carrier-Bound Oligonucleotide Molecular Beacon

Katarzyna Ratajczak ¹, Bartłomiej E. Krazinski ² , Anna E. Kowalczyk ², Beata Dworakowska ¹, Sławomir Jakiela ^{1,*} and Magdalena Stobiecka ^{1,*}

¹ Department of Biophysics, Warsaw University of Life Sciences (SGGW), 159 Nowoursynowska Street, 02776 Warsaw, Poland; katarzyna_ratajczak@sggw.pl (K.R.); beata_dworakowska@sggw.pl (B.D.)

² Department of Human Histology and Embryology, University of Warmia and Mazury, 30 Warszawska Street, 10082 Olsztyn, Poland; bartlomiej.krazinski@uwm.edu.pl (B.E.K.); a.kowalczyk@uwm.edu.pl (A.E.K.)

* Correspondence: slawomir_jakiela@sggw.pl (S.J.); magdalena_stobiecka@sggw.pl (M.S.); Tel.: +48-22-593-8626 (S.J.); +48-22-593-8614 (M.S.)

Received: 14 June 2018; Accepted: 5 July 2018; Published: 9 July 2018



Abstract: The anti-apoptotic protein survivin is one of the most promising cancer biomarkers owing to its high expression in human cancers and rare occurrence in normal adult tissues. In this work, we have investigated the role of supramolecular interactions between a graphene oxide (GO) nanosheet nanocarrier and a survivin molecular beacon (SurMB), functionalized by attaching fluorophore Joe and quencher Dabcyl (SurMB-Joe). Molecular dynamics simulations revealed hydrogen bonding of Joe moiety and Dabcyl to GO carriers that considerably increase the SurMB-GO bonding strength. This was confirmed in experimental work by the reduced fluorescence background in the OFF state, thereby increasing the useful analytical signal range for mRNA detection. A new mechanism of hairpin–hairpin interaction of GO@SurMB with target oligonucleotides has been proposed. A low limit of detection, LOD = 16 nM (S/N = 3), has been achieved for complementary tDNA using GO@SurMB-Joe nanocarriers. We have demonstrated an efficient internalization of SurMB-Joe-loaded GO nanocarriers in malignant SW480 cells. The proposed tunability of the bonding strength in the attached motifs for MBs immobilized on nanocarriers, via structural modifications, should be useful in gene delivery systems to enhance the efficacy of gene retention, cell transfection and genomic material survivability in the cellular environment.

Keywords: graphene oxide nanosheet nanocarrier; hairpin–hairpin interactions; survivin mRNA; molecular beacon probe; SW480 cancer cells

1. Introduction

The interactions of diagnostic and therapeutic oligonucleotides with nanocarriers used for their delivery have recently been the focus of theranostic research [1]. The strength of these interactions and transport modality provide the framework for gene retention [1–3] and protection while in transport, and facilitate their controlled release. From among the various nanocarriers studied for delivery systems, including gold nanoparticles [4–6], liposomes [7–10], micelles [11], exosomes [12], graphene oxide [2,13–19] and others [20,21], herein we focus specifically on the binding of molecular beacon (MB) probes to graphene oxide (GO) nanosheet nanocarriers and the mechanism of hybridization of the GO-bound molecular beacon (GO-MB) with target strands. Recently, we have demonstrated the ability of a hairpin MB to interact with a hairpin-structured target oligonucleotide [8],

thus extending the Tyagi–Kramer model [22] of MB interaction with linear oligonucleotides. Therefore, the mechanism considered here is the hairpin–hairpin interaction of GO-bound MB with target strands, followed by the duplex DNA desorption from GO nanocarriers [23–26]. The aim is to investigate the feasibility of tuning the GO-MB binding strength to protect MBs against nucleases, while enabling unhindered antisense oligonucleotide release and hybridization with mRNA in the cytosol of cells.

The use of MBs allows not only the detection and imaging of specific mRNAs overexpressed in cancer cells, but also enables the prevention of their post-transcriptional translation to unwanted proteins, such as the proliferation enhancing and anti-apoptotic AIP-group proteins [27,28]. The oligonucleotide drugs are usually administered in the form suitable to act as a short interfering RNA (siRNA) or micro-RNA (miRNA), which are non-coding RNAs able to exert gene silencing action on mRNA via complex biochemical pathways [29]. While the use of siRNA and miRNA is being studied extensively, it is evident that an alternative way based on capturing mRNA using MB oligonucleotides in target-controlled delivery is also a viable solution for cancer treatment.

Survivin (Sur) is an anti-apoptotic and proliferation enhancing protein [30] and member of an apoptosis inhibitor protein (AIP) family, which is overexpressed in cancer cells [31]. The expression of survivin mRNA and the survivin protein in colorectal cancer was recently investigated using molecular biology methods, including reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) [32,33], Western blot [33] and ELISA [34] assays, as well as immunohistochemical staining [35].

In this work, we have employed a molecular beacon-based optical biosensing system as an alternative method for the detection of survivin mRNA in colorectal cancer cells. Colorectal cancer is one of the three most common cancers in the world. The survivin molecular beacon (SurMB) probe used in this study consisted of a single-stranded oligonucleotide with a Joe fluorescence dye and Dabcyl quencher attached to the 5' and 3' ends of the strand, respectively. The loop of the probe was an antisense oligonucleotide targeting survivin mRNA. The interactions of this SurMB-Joe probe with a GO nanocarrier (GO@SurMB-Joe) have been studied to determine if there are any supramolecular forces able to bind the Joe or Dabcyl moieties to a GO carrier, which have never been investigated before. These interactions are important for holding the probe on a nanocarrier and protecting it against digestion by nucleases [36]. The molecular dynamics simulations (MD) were performed to gain new insight into the supramolecular interactions of SurMB-Joe with GO nanocarriers, and its basic operation principles. In this study, the mechanism of the hairpin–hairpin interaction of the GO-bound SurMB-Joe with target oligonucleotides was investigated for the first time, following the single-nucleotide polymorphism sensitivity determination. In vitro studies of intracytoplasmic Sur mRNA detection in SW480 colorectal cancer cells using GO@SurMB-Joe nanoprobes were also performed.

2. Results and Discussion

2.1. Hairpin Structures of SurMB-Joe, tDNA Target, and the Hybridization Product

The ability of a hairpin MB to interact with a hairpin-structured target oligonucleotide (tDNA) has recently been demonstrated [8], and a hairpin–hairpin interaction model was proposed to extend the Tyagi–Kramer model [22] of molecular beacon interactions with a linear target oligonucleotide. Our calculations—performed using the UNAFold software—indicate that the target oligonucleotide (tDNA), complementary to the loop of SurMB, preferentially forms a stable small-loop hairpin structure instead of relaxing to a linear conformation. Figure 1A presents the sequence and the most thermodynamically stable hairpin structure of SurMB-Joe, with negative Gibbs free energy of formation $\Delta G^{\circ}_{\text{SurMB-Joe}} = -4.26 \text{ kcal/mol}$ [37]. The loop sequence of the probe was composed of an antisense oligonucleotide targeting the survivin mRNA region [38]. Figure 1B presents the sequence and hairpin structure of tDNA with formation energy $\Delta G^{\circ}_{\text{tDNA}} = -2.33 \text{ kcal/mol}$. The general schemes of the principle of SurMB-Joe operation and its interactions with tDNA and graphene oxide (GO) nanosheet nanocarriers are depicted in Figure 1C,D. According to our model, in the first step, the hybridization of one leg of tDNA with molecular beacon loop occurs (Figure 1C),

followed by the melting of a target oligonucleotide stem and, finally, full hybridization of tDNA with the SurMB-Joe loop. Upon the hybridization process, the opening of the molecular beacon structure takes place, followed by desorption of the formed DNA duplex from the surface of GO carriers, restoring the fluorescence signal of Joe dye (Figure 1D). Since GO is such a strong quencher, the duplex DNA must be desorbed before its fluorescence is restored. The adsorption/desorption processes of linear DNA onto/from a GO platform were studied recently by Wu et al. [23] and Park et al. [3], but the conformation and melting temperatures have not yet been considered. On the other hand, the attachment of a small quenching graphite nanoparticle (NP) to the end of a MB strand was applied by Piao et al. [36]. Although the use of GO is gaining popularity in DNA sensing applications [39], the exact conformation of DNA strands has rarely been evaluated [37].

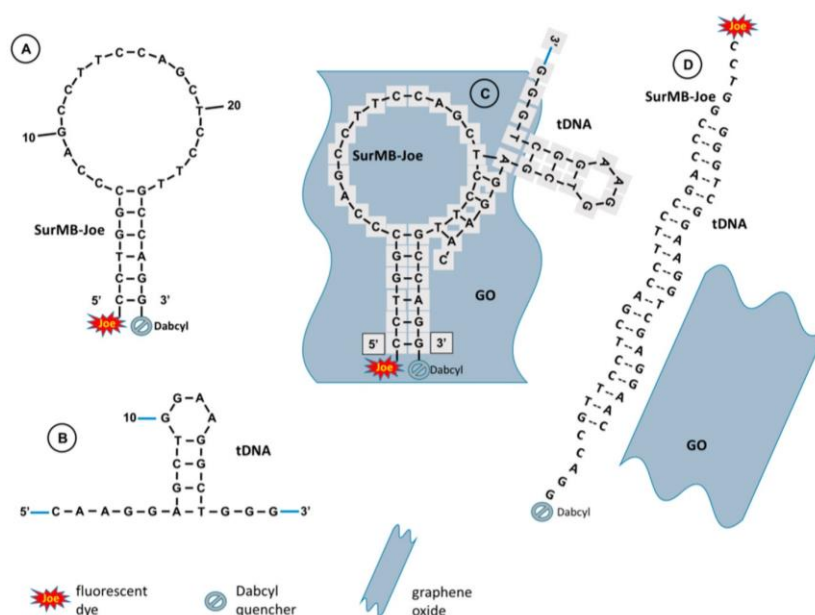


Figure 1. Structures and sequences of (A) survivin molecular beacon with a fluorophore Joe (SurMB-Joe) and (B) target oligonucleotide (tDNA) complementary to loop of MB; (C,D) Principle of molecular beacon operation, interactions of SurMB-Joe with GO and tDNA.

2.2. Supramolecular Interactions of SurMB-Joe Components with GO Nanocarriers

At the room temperature and in the absence of a complementary target oligonucleotide, SurMB-Joe remains in the OFF conformation with very low residual fluorescence intensity due to the close proximity of the Joe fluorophore to the Dabcyl quencher. Upon the interaction with a GO carrier, which acts as a supplementary quencher, a further reduction of the already low fluorescence of SurMB-Joe is observed, as seen in Figure 2. The intensity decreases from $I_{FL,1} = 29.2$ a.u. to $I_{FL,1} = 14.5$ a.u. after addition of GO to the level of 370 μM (GO rings), as illustrated in Figure 2A,B. On the basis of these data, the Stern–Volmer quenching constant was determined using the dependence:

$$I_{FL,0}/I_{FL} = 1 + K_{SV}Q, \quad (1)$$

where $I_{FL,0}$ and I_{FL} are the fluorescence intensities of SurMB-Joe (the donor) at the emission maximum $\lambda_{\text{max}} = 548$ nm, in the absence and presence of GO nanocarriers (acting as the acceptors), respectively; K_{SV} is the Stern–Volmer quenching constant, and Q is the GO quencher concentration. The value of K_{SV} obtained from the slope of the plot of $I_{FL,0}/I_{FL}$ vs. $Q = C_{GO, \text{rings}}$, presented in Figure 2C, is: $K_{SV} = 2742 \pm 21 \text{ M}^{-1}$. This relatively high value of K_{SV} indicates on the static quenching mode.

Figure 2D presents the plot of quenching efficiency E vs. $C_{GO,rings}$. The quenching efficiency was calculated from the dependence:

$$E = 1 - I_{FL}/I_{FL,0} \quad (2)$$

To confirm the modality of the quenching interactions, we considered if the collisional frequency of molecules involved is high enough to achieve the observed high quenching efficiency. In the specific case of GO nanosheets, the mobility of GO is practically null, so the only factor influencing the collisional frequency is associated with the MB colliding with GO. However, with the concentration of MB in the nanomolar range, the frequency of collisions is so low [40] that the probability of dynamic quenching becomes insignificant. Moreover, single-stranded oligonucleotides are known to assemble on GO, which points to static—rather than dynamic—quenching. Furthermore, we considered supramolecular forces between the fluorophore Joe and GO, which also indicates the static quenching mode.

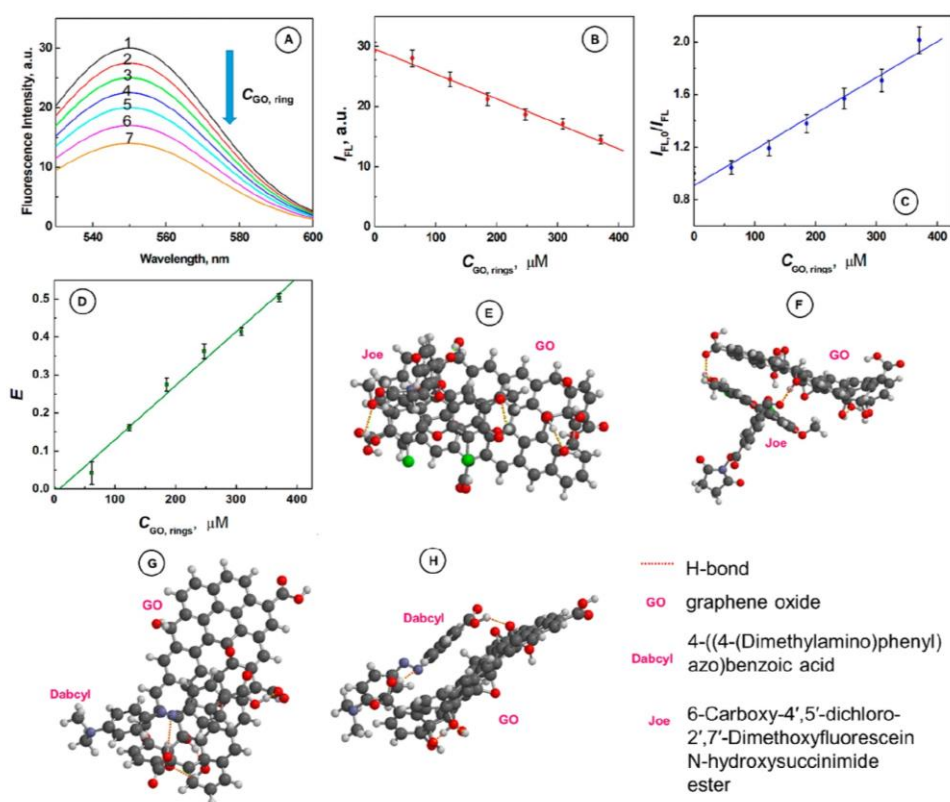


Figure 2. (A) Fluorescence spectra for SurMB-Joe after addition of GO at different concentrations $C_{GO,rings}$ (μM): (1) 0, (2) 61.8, (3) 123.5, (4) 185.4, (5) 247.3, (6) 308.9, (7) 380.8; (B) dependence of I_{FL} vs. $C_{GO,rings}$; (C) Stern–Volmer plot of $I_{FL,0}/I_{FL}$ vs. $C_{GO,rings}$; (D) dependence of quenching efficiency E on $C_{GO,rings}$; (E) top and (F) side views of GO-Joe supramolecular structures with H-bonds marked with red dashed lines; (G) top and (H) side views of GO-DabcyI supramolecular structures with H-bonds marked with red dashed lines. Joe: 6-Carboxy-4',5'-dichloro-2',7'-dimethoxyfluorescein N-hydroxysuccinimide ester; DabcyI: 4-((4-(Dimethylamino)phenyl)azo) benzoic acid. Conditions: $C_{SurMB} = 100$ nM; buffer: 10 mM PBS, pH 7.4; room temp.

To evaluate what kind of interactions between the fluorophore Joe and a GO nanosheet carrier may cause static quenching of Joe, we have performed molecular dynamics and quantum mechanical calculations for ensembles of GO@Joe. As shown in Figure 2E,F, up to two hydrogen

bonds (marked with red dashed lines) can be formed between the Joe molecule and a GO nanosheet. In Figure 2F, a stacking configuration of the supramolecular ensemble GO@Joe is also shown. Hence, the ability of Joe to form supramolecular ensembles with GO nanosheets is consistent with the static quenching mode.

Supramolecular interactions of Joe with GO nanocarriers are important to the overall MB binding to GO, as they increase the total MB binding strength. We have also investigated if the Dabcyl quencher can contribute to the binding strength of MBs to GO nanocarriers. The molecular dynamics and quantum mechanical calculations performed for ensembles of GO@Dabcyl have revealed that supramolecular interactions do occur. In Figure 2G–H, the formation of hydrogen bonding between Dabcyl and GO is shown. It is seen that one hydrogen bond is established between the nitrogen of Dabcyl and the hydrogen of the carboxylic group of GO, and another hydrogen bond is formed between the hydrogen of the carboxylic group of Dabcyl and the oxygen of the carboxylic group of GO. The stacking configurations of GO@Dabcyl supramolecular structures are also viable, as shown in Figure 2H. This means that both the fluorophore Joe and quencher Dabcyl contribute to the total binding strength of the MB oligonucleotide to the GO nanocarrier, in addition to the MB's single-stranded DNA contribution. The enhancement of the overall binding strength of MB to the GO nanocarrier by supramolecular interactions of Joe fluorophore and Dabcyl quencher to the GO nanocarrier is a significant development which improves the efficiency of the genomic material delivery to cells for diagnostic, imaging, and therapeutic purposes. The increased strength of MB binding to GO also results in the reduced fluorescence in the OFF state, thereby increasing the useful analytical signal for mRNA detection.

2.3. Descriptive Hybridization of GO-Bound SurMB-Joe with Complementary tDNA Target and Mutants

Figure 3A shows that the fluorescence signal of GO@SurMB-Joe ensembles increase from $I_{FL,1} = 14.5$ a.u. in the absence of tDNA, to $I_{FL,7} = 963.1$ a.u. after 30 min of interaction with a 100 nM complementary tDNA (curves 1 and 7, respectively). Figure 3B shows the dynamic range for complementary tDNA determination, with the detection limit of 12 nM, from the intersection of lines, and 16 nM, using the standard three-sigma method for complementary target oligonucleotides. The strong fluorescence observed upon addition of a complementary target tDNA strand is due to the formation of a stiff, open conformation of the SurMB-tDNA duplex, warranting large separation between the fluorophore Joe and quencher Dabcyl, and subsequent detachment of the SurMB-tDNA duplex from the GO surface. The control experiments using mismatched and noncomplementary oligonucleotides were also performed at different temperatures. The results are depicted in Figure 3C,D. It is seen in both cases that the interactions of GO@SurMB-Joe ensembles with mismatched and non-complementary targets are much weaker than those with a complementary target. At 37 °C, the fluorescence signals for targets with one and two mismatches are 193.7 and 156.9 a.u., respectively, which are considerably lower than the fluorescence signal observed upon addition of a complementary oligonucleotide (309.5 a.u.). At 61 °C, fluorescence observed upon addition of mismatched target oligonucleotides decreased below 100 a.u., due to melting of weak associations between GO@SurMB and targets, while that for a complementary target increased to over 800 a.u., providing an excellent discrimination against the mutants. These results indicate that the GO@SurMB-Joe probe exhibits a single-nucleotide polymorphism sensitivity.

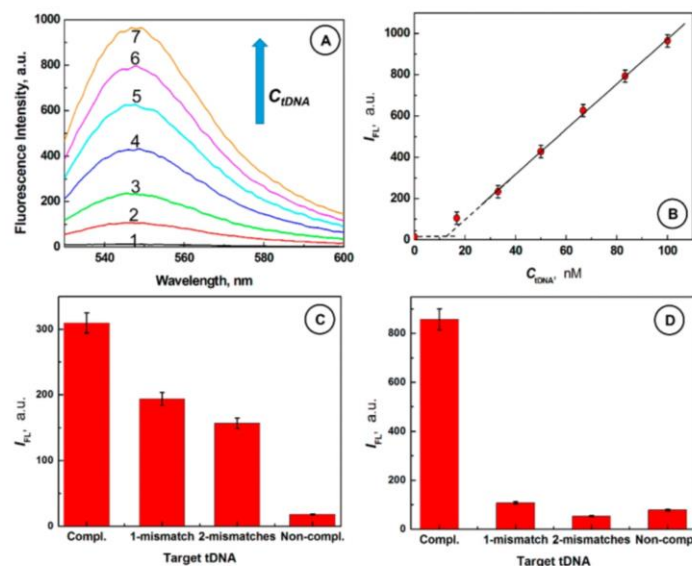


Figure 3. (A) Fluorescence spectra for SurMB-Joe@GO ensembles after addition of complementary tDNA with different concentrations, C_{tDNA} (nM): (1) 0, (2) 16.7, (3) 33.3, (4) 50, (5) 66.7, (6) 83.3, (7) 100; (B) Dependence of fluorescence peak intensity I_{FL} vs. C_{tDNA} ; (C,D) Comparison of fluorescence peak intensities for SurMB-Joe@GO ensembles upon addition of a complementary target, targets with 1- and 2-mismatches, and non-complementary oligonucleotides at the temperatures: (C) 37 °C and (D) 61 °C; Conditions: $C_{SurMB} = 100$ nM; $C_{GO,ring} = 370.8$ μ M; buffer: 10 mM PBS, pH 7.4, room temp. (A,B), temperature scan from 22 °C to the indicated temperature (C,D).

2.4. Detection of Survivin mRNA in Colorectal Cancer Cells SW480 Using GO@SurMB-Joe Nanoprobes

In further studies, we have investigated the transfection of SW480 cells with GO@SurMB-Joe to assess the feasibility of applications of these nanocarriers for gene delivery and detection of survivin mRNA in colorectal cancer cells.

The optical and fluorescence microscopy images obtained for the SW480 cell line are presented in Figure 4A. Successful transfection of SW480 cells with GO@SurMB-Joe and detection of Sur mRNA is clearly seen in Figure 4B. The green fluorescence image shows that after 4 h of incubation with GO@SurMB-Joe, the fluorescence signal appears in the cytoplasm of SW480 cells. It indicates that SurMB-Joe has been internalized in the cancer cells and, due to the strong expression of survivin mRNA in these cells, the fluorescence emission from the Joe fluorophore could be observed. The imaging was made possible by the hybridization of the molecular beacon with specific regions of the survivin mRNA sequence, followed by a disassembly of the formed SurMB-Joe-mRNA duplex from the GO carrier. The efficiency of transfection was analyzed using luminosity histograms. The histograms presented the number of pixels (counts) vs. luminosity within the green channel. The total number of pixels analyzed (total counts) was ca. 5.665×10^6 per image. The spectrum for SW480 cancer cells transfected via the GO platform shows lower luminosity than that of a standard for SW480 cells with Lipofectamine, which affords 50% transfection efficiency. Therefore, assuming this efficiency as the standard, we can estimate the internalization efficiency for the GO@SurMB, by comparing the obtained experimental luminosity values.

In the negative tests performed, the transfection of SW480 cells with bare graphene oxide nanocarriers (Figure 4D) and with molecular beacon alone (Figure 4F) resulted in negligible fluorescence signal in comparison to that obtained for GO@SurMB-Joe carriers (Figure 4B). These experiments show that graphene oxide nanocarriers at 67 ng/mL concentration make it a feasible platform for cancer diagnostics and gene delivery. At concentrations of GO higher than ca. 17 μ g/mL,

the inner filter effects interfere with measurements of fluorescence emission, and therefore other analytical methods would need to be employed to assess the feasibility of using higher nanocarrier doses. The inner filter effect observed at higher concentrations of GO is due to the high absorption of UV-Vis light by the GO nanocarriers, leading to the decrease of the intensity of the excitation beam in measurements of SurMB fluorescence in comparison to the case of the absence of GO. Results of the experiments described above validate the GO nanocarriers ability to transfer an oligonucleotide payload through a cell membrane, as well as corroborate the hairpin-hairpin interaction model [8] for GO-bound MBs in desorptive hybridization with hairpin mRNA targets, which is an extension of the original Tyagi-Kramer model developed for MBs interacting with linear oligonucleotide targets.

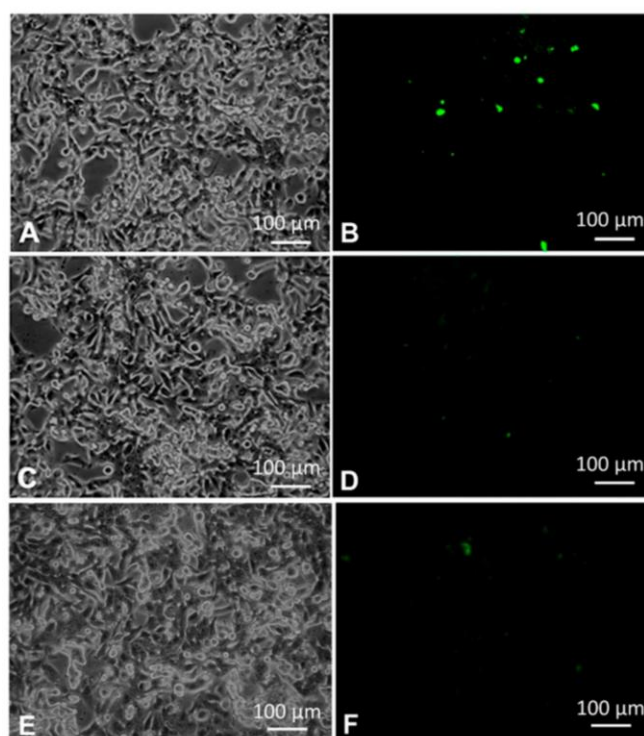


Figure 4. Optical (left panel) and fluorescence (right panel) images of SW480 cells: (A,B) cells transfected with GO@SurMB-Joe; (C,D) cells transfected with GO alone; (E,F) cells transfected with SurMB-Joe; transfection time: 4 h.

2.5. Mechanism of Hairpin-Hairpin Interactions in Desorptive Hybridization of GO@SurMB-Joe and tDNA

In Figure 5, the structure and morphology of graphene oxide nanocarriers used in experiments is presented. The model structure of a GO nanosheet nanocarrier, with the following functional groups: three carboxylic groups ($-\text{COOH}$), four hydroxyl groups ($-\text{OH}$) and three carbonyl groups ($-\text{C}=\text{O}$), is presented in Figure 5A. From the scanning electron microscopy (SEM) images (Figure 5B), it is seen that the GO nanosheets have a flake-like shape with rippled structure. The transmission electron microscopy (TEM) images show a wrinkled and corrugated morphology of GO.

Figure 5D presents an overview of the cellular uptake of GO carriers loaded with SurMB-Joe (GO@SurMB-Joe) into malignant SW480 cells. In this image, the hybridization of SurMB-Joe with survivin mRNA, present in cytosol of cancer cells, is depicted, following the hairpin-hairpin interaction principle. The opening of the molecular beacon structure is initiated upon this hybridization, and it is followed by the formed duplex DNA/RNA desorption from the surface of a GO carrier,

restoring the fluorescence signal of a Joe dye. Endocytosis is the most frequently occurring mode of internalization, and occurs when membrane receptors recognize compounds which are required by the cell. Alternatively, internalization by transfection is also well-known and widely utilized, such as in gene delivery applications. This mode of internalization proceeds when an oligonucleotide is bound to a transfer molecule which is able to pass through the membrane and, thus, can carry the genomic material into the cytosol through the membrane. Due to their high affinity to lipids, graphene oxide nanocarriers are able to interact directly with the membrane, thereby permitting the passing of their cargo through the membrane. This happens at low concentrations of GO nanocarriers, as used in this work, at ca. 65 ng/mL. The high affinity of GO to lipid membranes has recently been confirmed for high concentrations of GO [41]. When GO concentrations are high (>10 µg/mL, up to 200 µg/mL), GO will embed itself in the membrane and may even cause the formation of a pore in the membrane. On the basis of these considerations, and to cover the functionalization of GO with poly-L-lysine (PLL), under study, which we have already investigated for modifying gold nanoparticles for gene delivery via transfection, we consider the transfer of SurMBs by the GO nanocarriers as proceeding mainly via the transfection mechanism, but with the possibility of endocytosis. In the case of endocytosis, the liposomes which carry the GO@SurMBs will be rapidly perforated by GO drawing up the lipids from the liposome membrane, with the remaining part of the pathway occurring in the same way as in the case of transfection. Please note that liposomes tightly encasing GO@SurMB cannot survive long enough to trap the nanocarrier since GO interacts with the lipid membrane and draws the lipids, destroying the tiny membrane. The above "gelum" model is not exploring the problem of complex intracellular distribution of survivin mRNA, signaled by Bao and colleagues [42], but rather attempts to emphasize the process of hairpin-hairpin interaction of the target mRNA with the GO-bound MB, which has not been considered before. The importance of complex intracellular distribution of Sur mRNA warrants further studies, including colocalization experiments with lysotracker and other markers, to verify the complex intracellular trafficking of genomic material. This trafficking is particularly important in cancer metastasis driven by intercellular communication [12], whereby the genomic material is exported from the cancer cells via exosomes to infect or reprogram distant healthy cells. As a result, the complex intracellular trafficking of genomic material is the subject of ongoing studies in our labs. Furthermore, the model discussed above does not take into account the fact that the real cellular membrane tension is heterogeneous [43]. The heterogeneity of membrane tension is due to the lipid flow resistance associated with the net of cytoskeleton-bound transmembrane proteins, which make the drug-carrying nanocarrier internalization uneven over the membrane surface.

The schematic in Figure 5D includes both the transfection and endocytosis as parallel pathways, and which pathway will be predominant in a given system will depend on the details of the nanocarrier functionalization. For instance, functionalization of GO with poly-L-lysine (PLL) will make transfection predominant, while pegylation may favor the endocytosis mechanism. After adding a complementary target oligonucleotide to the well-quenched GO@SurMB-Joe assemblies, a large increase in fluorescence intensity is observed. This is consistent with the interaction mechanism that we have encountered in recent studies of molecular beacon delivery nanocarriers for detection of survivin mRNA in U-87 MG human malignant glioma cells [2], whereby a single-stranded oligonucleotide immobilized on GO nanocarriers hybridized with the complementary target, forming a duplex which then desorbed from the nanocarrier (Figures 1D and 5D).

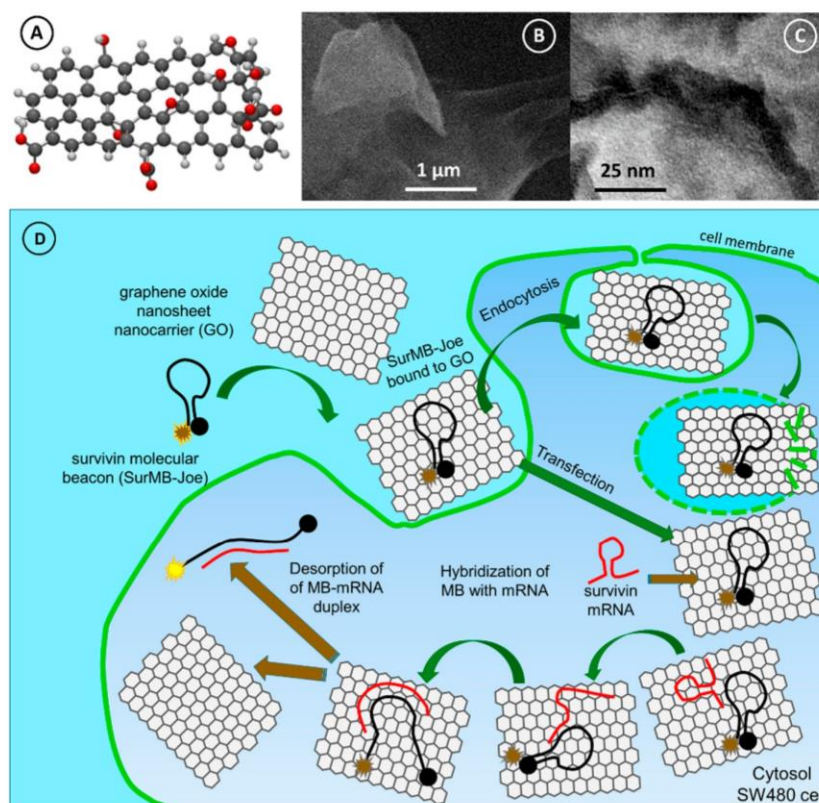


Figure 5. (A) Structure of a model graphene oxide nanosheet nanocarriers (GO); (B) SEM image of GO nanocarriers; (C) TEM image of GO; (D) Principle of the internalization of the GO-bound SurMB-Joe (GO@SurMB-Joe) to SW480 cells.

3. Materials and Methods

3.1. Chemicals

The survivin molecular beacon (SurMB), which is an antisense oligonucleotide-targeting survivin mRNA with a sequence of 5'-Joe-CCTGGC CCA GCC TTC CAG CTC CTT GCCAGG-Dabcyl-3' (SurMB-Joe), and the oligonucleotide complementary to the loop of SurMB-Joe (S_t), with a sequence of 5'-CAA GGA GCT GGA AGG CTG GG-3', were synthesized by the Laboratory of DNA Sequencing and Oligonucleotides Synthesis, Institute of Biochemistry and Biophysics of the Polish Academy of Sciences (IBB PAS, Warsaw, Poland) and FutureSynthesis (Poznan, Poland), respectively. The purity of these oligonucleotides was tested by high-performance liquid chromatography (HPLC). Single-layer graphene oxide nanosheet nanocarriers (GO) dispersed in water were purchased from ACS Materials, LLC (Medford, MA, USA). All chemicals were of analytical grade purity. Aqueous solutions were prepared with freshly deionized water with 18.2 MΩ cm resistivity (Hydrolab Sp. z o.o. Sp.K., Straszyn, Poland). All concentrations of added reagents cited in this paper are final concentrations obtained after mixing.

3.2. Apparatus

The fluorescence spectra were recorded using Spectrometer model LS55 (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA), with 20 kW pulsed Xenon light source and a photomultiplier tube detector. The excitation and emission slit widths were set to 5.0 nm and scan speed to 500 nm/min. The measurements

were performed in 10 mM PBS buffer, pH 7.4. The excitation wavelength was set to $\lambda_{ex} = 520$ nm. The fluorescence cell images were acquired with a Nikon Eclipse TE300 inverted light microscope with a blue B-2A fluorescence filter with a 30–50 nm bandwidth excitation filter, long-pass dichromatic mirror and long-pass barrier filter. Images were recorded digitally using a Canon Power Shot A640 scope-mounted camera. All images were made with exactly the same exposure. They were then exported to Photoshop Elements and the brightness and contrast of all images were adjusted using the Levels function for green channel by shifting the black limit from 0 to 26 of the green luminosity scale which effectively enabled removing the trace background luminosity. The molecular dynamics (MD) simulations of interactions of GO with Joe and Dabcyl were performed using Spartan 14 software (Wavefunction, Irvine, CA, USA). The calculations of MB and target nucleotide structures, their folding energies, and melting temperatures were performed using the University of Albany web server DINAMelt providing the program UNAFold ver. 3.9 with a Quikfold application (RNA Institute, University of Albany, Albany, NY, USA).

3.3. Cell Culture

The human colon cancer cell line SW480 was purchased from ATCC (LGC Standards Sp. z o.o., Lomianki, Poland) and was cultured in culture medium containing Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in the air at 37 °C using a Shell Lab Model 2123-TC CO₂ Incubator (Cornelius, OR, USA). The SW480 cells were subcultured every 2–3 days. After experiments, the used cells were collected and disposed appropriately.

3.4. Cell Transfection

Transfection experiments with SW480 cells were conducted with graphene oxide nanocarriers (GO@SurMB-Joe). In this case, 268 µL of 100 ng/mL (3.7 µM, rings) GO solution was mixed with 1 µL of 100 µM SurMB-Joe and 131 µL of DMEM and added to the cells, followed by 4 h incubation.

Supplementary Materials: Details of chemicals and the graphene oxide nanosheet nanocarriers concentration, in terms of the concentration of graphene rings, are available online at <http://www.mdpi.com/2079-4991/8/7/510/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, M.S., B.E.K. and S.J.; Methodology, M.S.; Formal Analysis, K.R.; B.E.K.; A.E.K.; B.D.; S.J.; M.S. Investigation, K.R.; B.E.K.; A.E.K.; B.D.; M.S.; S.J. Writing-Original Draft Preparation, K.R., B.E.K.; S.J.; M.S.; Writing-Review and Editing, M.S.; Supervision, M.S.; S.J.

Funding: This research was funded by the Program OPUS of the National Science Centre, Poland, grant number 2017/25/B/ST4/01362 and the statutory grant of the School of Medicine, Collegium Medicum, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Poland.

Acknowledgments: This research was supported by funding provided by the Program OPUS of the National Science Centre, Poland, Grant No. 2017/25/B/ST4/01362 and the statutory grant of the School of Medicine, Collegium Medicum, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Poland.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Liu, B.; Ma, L.; Huang, Z.; Hu, H.; Wu, P.; Liu, J. Janus DNA orthogonal adsorption of graphene oxide and metal oxide nanoparticles enabling stable sensing in serum. *Mater. Horiz.* **2018**, *5*, 65–69. [CrossRef]
2. Stobiecka, M.; Dworakowska, B.; Jakiela, S.; Lukasiak, A.; Chalupa, A.; Zembrzycki, K. Sensing of survivin mRNA in malignant astrocytes using graphene oxide nanocarrier-supported oligonucleotide molecular beacons. *Sens. Actuators B* **2016**, *235*, 136–145. [CrossRef]
3. Park, J.S.; Goo, N.-I.; Kim, D.-E. Mechanism of DNA adsorption and desorption on graphene oxide. *Langmuir* **2014**, *30*, 12587–12595. [CrossRef] [PubMed]
4. Stobiecka, M.; Hepel, M. Double-shell gold nanoparticle-based DNA-carriers with poly-L-lysine binding surface. *Biomaterials* **2011**, *32*, 3312–3321. [CrossRef] [PubMed]

5. Hepel, M.; Stobiecka, M. Detection of oxidative stress biomarkers using functional gold nanoparticles. In *Fine Particles in Medicine and Pharmacy*; Matijević, E., Ed.; Springer: Boston, MA, USA, 2012; pp. 241–281.
6. Ding, Y.; Jiang, Z.; Saha, K.; Kim, C.S.; Kim, S.T.; Landis, R.F.; Rotello, V.M. Gold nanoparticles for nucleic acid delivery. *Mol. Ther.* **2014**, *22*, 1075–1083. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Kang, M.H.; Yoo, H.J.; Kwon, Y.H.; Yoon, H.Y.; Lee, S.G.; Kim, S.R.; Yeom, D.W.; Kang, M.J.; Choi, Y.W. Design of multifunctional liposomal nanocarriers for folate receptor-specific intracellular drug delivery. *Mol. Pharm.* **2015**, *12*, 4200–4213. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Ratajczak, K.; Krazinski, B.E.; Kowalczyk, A.E.; Dworakowska, B.; Jakiela, S.; Stobiecka, M. Hairpin-hairpin molecular beacon interactions for detection of survivin mRNA in malignant sw480 cells. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10*, 17028–17039. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Pattni, B.S.; Chupin, V.V.; Torchilin, V.P. New developments in liposomal drug delivery. *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 10938–10966. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Skalicikova, S.; Nejd, L.; Kudr, J.; Ruttkay-Nedecky, B.; Jimenez, A.M.J.; Kopel, P.; Kremplova, M.; Masarik, M.; Stiborova, M.; Eckschlager, T.; et al. Fluorescence characterization of gold modified liposomes with antisense N-myc DNA bound to the magnetisable particles with encapsulated anticancer drugs (doxorubicin, ellipticine and etoposide). *Sensors (Basel)* **2016**, *16*, 290. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Zhou, Q.; Zhang, L.; Yang, T.H.; Wu, H. Stimuli-responsive polymeric micelles for drug delivery and cancer therapy. *Int. J. Nanomed.* **2018**, *13*, 2921–2942. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Stobiecka, M. Exosomes and microvesicles: Extracellular frontiers of intercellular communication. In *Encyclopedia of Surface and Colloid Science*, 3rd ed.; Somasundaran, P., Ed.; CRC Press, Taylor & Francis: New York, NY, USA, 2016.
13. Ratajczak, K.; Stobiecka, M. Ternary interactions and energy transfer between fluorescein isothiocyanate, adenosine triphosphate, and graphene oxide nanocarriers. *J. Phys. Chem. B* **2017**, *121*, 6822–6830. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Mao, Y.; Chen, Y.; Li, S.; Lin, S.; Jiang, Y. A graphene-based biosensing platform based on regulated release of an aptameric DNA biosensor. *Sensors* **2015**, *15*, 28244–28256. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Rana, M.; Balcioglu, M.; Robertson, N.; Yigit, M.V. Nano-graphene oxide as a novel platform for monitoring the effect of LNA modification on nucleic acid interactions. *Analyst* **2014**, *139*, 714–720. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Cui, L.; Song, Y.; Ke, G.; Guan, Z.; Zhang, H.; Lin, Y.; Huang, Y.; Zhu, Z.; Yang, C.J. Graphene oxide protected nucleic acid probes for bioanalysis and biomedicine. *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 10442–10451. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Wang, Y.; Li, Z.; Hu, D.; Lin, C.-T.; Li, J.; Lin, Y. Aptamer/graphene oxide nanocomplex for in situ molecular probing in living cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 9274–9276. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Zhao, H.; Ding, R.; Zhao, X.; Li, Y.; Qu, L.; Pei, H.; Yildirim, L.; Wu, Z.; Zhang, W. Graphene-based nanomaterials for drug and/or gene delivery, bioimaging, and tissue engineering. *Drug Discov. Today* **2017**, *22*, 1302–1317. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Fong, Y.T.; Chen, C.-H.; Chen, J.-P. Intratumoral delivery of doxorubicin on folate-conjugated graphene oxide by in-situ forming thermo-sensitive hydrogel for breast cancer therapy. *Nanomaterials* **2017**, *7*, 388. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Shabani, R.; Ashjari, M.; Ashtari, K.; Izadyar, F.; Behnam, B.; Khoei, S.; Asghari-Jafarabadi, M.; Koruji, M. Elimination of mouse tumor cells from neonate spermatogonial cells utilizing cisplatin-entrapped folic acid-conjugated poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles in vitro. *Int. J. Nanomed.* **2018**, *13*, 2943–2954. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Wu, Z.; Xu, X.-L.; Zhang, J.-Z.; Mao, X.-H.; Xie, M.-W.; Cheng, Z.-L.; Lu, L.-J.; Duan, X.-H.; Zhang, L.-M.; Shen, J. Magnetic cationic amylose nanoparticles used to deliver survivin-small interfering RNA for gene therapy of hepatocellular carcinoma in vitro. *Nanomaterials* **2017**, *7*, 110. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Tyagi, S.; Kramer, F.R. Molecular beacons: Probes that fluoresce upon hybridization. *Nat. Biotechnol.* **1996**, *14*, 303–308. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Wu, M.; Kempaiah, R.; Huang, P.-J.J.; Maheshwari, V.; Liu, J. Adsorption and desorption of DNA on graphene oxide studied by fluorescently labeled oligonucleotides. *Langmuir* **2011**, *27*, 2731–2738. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Liu, Z.; Chen, S.; Liu, B.; Wu, J.; Zhou, Y.; He, L.; Ding, J.; Liu, J. Intracellular detection of ATP using an aptamer beacon covalently linked to graphene oxide resisting nonspecific probe displacement. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 12229–12235. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

25. Huang, P.-J.J.; Liu, J. Molecular beacon lighting up on graphene oxide. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 4192–4198. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Lu, C.H.; Yang, H.H.; Zhu, C.L.; Chen, X.; Chen, G.N. A graphene platform for sensing biomolecules. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4785–4787. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Caldorera-Moore, M.E.; Liechty, W.B.; Peppas, N.A. Responsive theranostic systems: Integration of diagnostic imaging agents and responsive controlled release drug delivery carriers. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 1061–1070. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Carpi, S.; Fogli, S.; Giannetti, A.; Adinolfi, B.; Tombelli, S.; Pozzo, E.D.; Vanni, A.; Martinotti, E.; Martini, C.; Breschi, M.C.; et al. Theranostic properties of a survivin-directed molecular beacon in human melanoma cells. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e114588. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Lam, J.K.W.; Chow, M.Y.T.; Zhang, Y.; Leung, S.W.S. siRNA versus miRNA as therapeutics for gene silencing. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2015**, *4*, e252. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Zangemeister-Wittke, U.; Simon, H.U. An IAP in action: The multiple roles of survivin in differentiation, immunity and malignancy. *Cell Cycle* **2004**, *3*, 1121–1123. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Mobahat, M.; Narendran, A.; Riabowol, K. Survivin as a preferential target for cancer therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15*, 2494–2516. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Sarela, A.I.; Macadam, R.C.A.; Farmery, S.M.; Markham, A.F.; Guillou, P.J. Expression of the antiapoptosis gene, survivin, predicts death from recurrent colorectal carcinoma. *Gut* **2000**, *46*. [[CrossRef](#)]
33. Chu, X.-Y.; Chen, L.-B.; Wang, J.-H.; Su, Q.-S.; Yang, J.-R.; Lin, Y.; Xue, L.-J.; Liu, X.-B.; Mo, X.-B. Overexpression of survivin is correlated with increased invasion and metastasis of colorectal cancer. *J. Surg. Oncol.* **2012**, *105*, 520–528. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Jakubowska, K.; Pryczynicz, A.; Dymicka-Piekarska, V.; Famulski, W.; Guzińska-Ustymowicz, K. Immunohistochemical expression and serum level of survivin protein in colorectal cancer patients. *Oncol. Lett.* **2016**, *12*, 3591–3597. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Kawasaki, H.; Altieri, D.C.; Lu, C.-D.; Toyoda, M.; Tenjo, T.; Tanigawa, N. Inhibition of apoptosis by survivin predicts shorter survival rates in colorectal cancer. *Cancer Res.* **1998**, *58*, 5071–5074. [[PubMed](#)]
36. Piao, Y.; Liu, F.; Seo, T.S. A novel molecular beacon bearing a graphite nanoparticle as a nanoquencher for in situ mRNA detection in cancer cells. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2012**, *4*, 6785–6789. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Stobiecka, M.; Chalupa, A. DNA strand replacement mechanism in molecular beacons encoded for the detection of cancer biomarkers. *J. Phys. Chem. B* **2016**, *120*, 4782–4790. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Olie, R.; Simões-Wüst, A.; Baumann, B.; Leech, S.; Fabbro, D.; Stahel, R.; Zangemeister-Wittke, U. A novel antisense oligonucleotide targeting survivin expression induces apoptosis and sensitizes lung cancer cells to chemotherapy. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 2805–2809. [[PubMed](#)]
39. Liu, B.; Sun, Z.; Zhang, X.; Liu, J. Mechanisms of DNA sensing on graphene oxide. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 7987–7993. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Stobiecka, M.; Hepel, M. Multimodal coupling of optical transitions and plasmonic oscillations in rhodamine B modified gold nanoparticles. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 1131–1139. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Duan, G.; Zhang, Y.; Luan, B.; Weber, J.K.; Zhou, R.W.; Yang, Z.; Zhao, L.; Xu, J.; Luo, J.; Zhou, R. Graphene-induced pore formation on cell membranes. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 42767. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Nitin, N.; Santangelo, P.J.; Kim, G.; Nie, S.; Bao, G. Peptide-linked molecular beacons for efficient delivery and rapid mRNA detection in living cells. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, e58. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Shi, Z.; Graber, Z.T.; Baumgart, T.; Stone, H.A.; Cohen, A.E. Lipid-gel model of biological membranes. *Biophys. J.* **2018**, *114*, 115a. [[CrossRef](#)]



Materialy uzupełniające:

Optical Biosensing System for the Detection of Survivin mRNA in Colorectal Cancer Cells using Graphene Oxide Carrier–Bound Oligonucleotide Molecular Beacon

Katarzyna Ratajczak¹, Bartłomiej E. Krazinski², Anna E. Kowalczyk², Beata Dworakowska¹, Sławomir Jakiela^{1*} and Magdalena Stobiecka^{1*}

¹ Department of Biophysics, Warsaw University of Life Sciences (SGGW), 159 Nowoursynowska Street, 02776 Warsaw, Poland

² Department of Human Histology and Embryology, University of Warmia and Mazury, 30 Warszawska Street, 10082 Olsztyn, Poland

* Correspondence: Magdalena Stobiecka, e-mail: magdalena_stobiecka@sggw.pl; Tel: +48-22-593-8614; Sławomir Jakiela, e-mail: slawomir_jakiela@sggw.pl; Tel: +48-22-593-8626

MATERIAL AND METHODS

Chemicals

Survivin molecular beacon (SurMB-Joe) was antisense oligonucleotide targeting survivin mRNA with sequence 5'-Joe - CCTGGC CCA GCC TTC CAG CTC CTT GCCAGG - Dabcyl-3' and oligonucleotide complementary to loop of SurMB-Joe (tDNA), with sequence 5'-CAA GGA GCT GGA AGG CTG GG-3' have been synthesized by the Laboratory of DNA Sequencing and Oligonucleotides Synthesis, Institute of Biochemistry and Biophysics of the Polish Academy of Sciences (IBB PAS, Warsaw, Poland) and FutureSynthesis (Poznan, Poland), respectively. The purity of these oligonucleotides was tested by HPLC. Single layer graphene oxide nanosheet nanocarriers (GO) dispersed in water with thickness 0.6-1.2 nm and single-layer ratio >80%, were purchased from ACS Materials, LLC (Medford, MA, USA). Sodium phosphate dibasic (Na₂HPO₄) and potassium phosphate monobasic (KH₂PO₄) were obtained from Sigma-Aldrich Chemical Company (St. Louis, MO, USA). The human colon cancer cell line SW480 was purchased from ATCC (LGC Standards Sp. z o.o., Lomianki, Poland). Fetal bovine serum (FBS), L-glutamine, penicillin/streptomycin and Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) were obtained from cell culture company PAA (Immuniq, Warsaw, Poland). Aqueous solutions were prepared with freshly deionized water with 18.2 MΩ cm resistivity (Hydrolab Sp. z o.o. Sp.K., Straszyn, Poland). All concentrations of added reagents cited in this paper are final concentrations obtained after mixing.

Concentration of graphene rings

The molar mass of a graphene ring was assumed from the following equation published in our earlier work [1]:

$$M(\text{graphene ring}) = n_C \alpha_C M_C \quad (1)$$

where n_C is the number of carbon atoms in the graphene ring, α_C is the fraction of each carbon atom belonging to the given ring, and $M_C = 12$ g/mol is the atomic mass of carbon.

Thus, $M = 6 \cdot (1/3) \cdot 12 = 24$ g/mol.

The content of oxygen in graphene oxide has been determined to be $p = 11$ weight %, so the molar mass of an average GO ring is approximately: $M_{\text{GO,rings}} = 24 / (1 - p/100) = 26.97$ g/mol. Thus, $C_{\text{GOs}} = 1$ mg/mL $= (1/26.97) M = 37.08$ mM (of GO rings).

1. Ratajczak, K.; Stobiecka, M., Ternary Interactions and Energy Transfer Between Fluorescein Isothiocyanate, Adenosine Triphosphate, and Graphene Oxide Nanocarriers. *J. Phys. Chem. B* 2017, 121, 6822–6830.

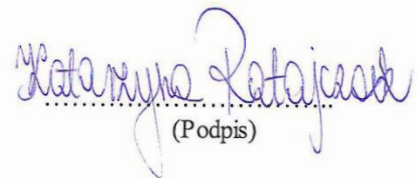
Warszawa, 23.10.2024

Katarzyna Ratajczak
katarzyna_ratajczak@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Nauki Biologiczne
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy K. Ratajczak, B.E. Kraziński, A.E. Kowalczyk, B. Dworakowska, S. Jakiela, M. Stobiecka, (2018) Optical biosensing system for the detection of survivin mRNA in colorectal cancer cells using a graphene oxide carrier-bound oligonucleotide molecular beacon, *Nanomaterials*, 8(7), 510 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na przeglądzie literatury, wykonaniu badań opisanych w manuskrypcie, w tym scharakteryzowanie opracowanej sondy, doświadczenia przy użyciu spektroskopii fluorescencyjnej, hodowla komórek i transfekcja ich przy użyciu tlenku grafenu, opracowanie i analiza wyników, pisanie wstępnej wersji manuskryptu.


(Podpis)

Olsztyn, 19.01.2022

Bartłomiej Emil Kraziński
Katedra Histologii i Embriologii Człowieka
Wydział Lekarski, Collegium Medicum
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
email: bartlomiej.krazinski@uwm.edu.pl

**Rada Dyscypliny Nauki Biologiczne
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: *Optical Biosensing System for the Detection of Survivin mRNA in Colorectal Cancer Cells Using a Graphene Oxide Carrier-Bound Oligonucleotide Molecular Beacon*, *Nanomaterials* 2018, 8(7), 510; <https://doi.org/10.3390/nano8070510> mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na: przygotowaniu koncepcji badań, przygotowaniu linii komórek raka jelita grubego SW 480 oraz prawidłowego nabłonka okrężnicy CCD 841 CoN do dalszych etapów pracy eksperymentalnej poprzez rozmrożenie, optymalizację warunków hodowli, namnożenie i utworzenie banku komórek oraz przygotowaniu pracy do druku poprzez przekazanie sugestii i korektę manuskryptu.


.....
Podpis

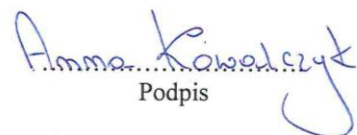
Olsztyn, 19.01.2022

Anna Ewa Kowalczyk
Katedra Histologii i Embriologii Człowieka
Wydział Lekarski, Collegium Medicum
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
email: a.kowalczyk@uwm.edu.pl

**Rada Dyscypliny Nauki Biologiczne
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: *Optical Biosensing System for the Detection of Survivin mRNA in Colorectal Cancer Cells Using a Graphene Oxide Carrier-Bound Oligonucleotide Molecular Beacon*, *Nanomaterials* 2018, 8(7), 510; <https://doi.org/10.3390/nano8070510> mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na: przygotowaniu linii komórek raka jelita grubego SW 480 oraz prawidłowego nabłonka okrężnicy CCD 841 CoN do dalszych etapów pracy eksperymentalnej poprzez rozmrożenie, optymalizację warunków hodowli, namnożenie i utworzenie banku komórek oraz przygotowaniu pracy do druku poprzez przekazanie sugestii i korektę manuskryptu.


Podpis

Warszawa, 18.01.2022

Beata Dworakowska
beata_dworakowska@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Nauki Biologiczne
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Katarzyna Ratajczak, Bartłomiej E. Kraziński, Anna E. Kowalczyk, Beata Dworakowska, Sławomir Jakieła i Magdalena Stobiecka, 2018, Optical Biosensing System for the Detection of Survivin mRNA in Colorectal Cancer Cells Using a Graphene Oxide Carrier-Bound Oligonucleotide Molecular Beacon, Nanomaterials, 8(7), 510 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na wykonaniu fotografii użytych do fig. 4.


.....
Podpis

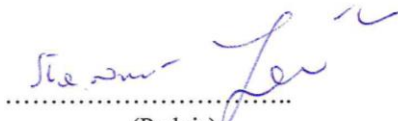
Warszawa, 23.10.2024

Sławomir Jakiela
slawomir_jakiela@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Nauki Biologiczne
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy K. Ratajczak, B.E. Kraziński, A.E. Kowalczyk, B. Dworakowska, S. Jakiela, M. Stobiecka, (2018) Optical biosensing system for the detection of survivin mRNA in colorectal cancer cells using a graphene oxide carrier-bound oligonucleotide molecular beacon, *Nanomaterials*, 8(7), 510 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu koncepcji badań, analizie formalnej jak również pisaniu i edycji manuskryptu oraz odpowiedziach na recenzje.


.....
(Podpis)

Warszawa, 23.10.2024

Magdalena Stobiecka
magdalena_stobiecka@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Nauki Biologiczne
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy K. Ratajczak, B.E. Kraziński, A.E. Kowalczyk, B. Dworakowska, S. Jakiela, M. Stobiecka, (2018) Optical biosensing system for the detection of survivin mRNA in colorectal cancer cells using a graphene oxide carrier-bound oligonucleotide molecular beacon, *Nanomaterials*, 8(7), 510 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu metodologii i koncepcji badań, analizie formalnej jak również pisaniu i edycji manuskryptu oraz odpowiedziach na recenzje.


(Podpis)

PUBLIKACJA 3

Toward early cancer detection: Focus on biosensing systems and biosensors for an anti-apoptotic protein survivin and survivin mRNA

Stobiecka M., Ratajczak K., Jakiela S.

Biosensors and Bioelectronics, (2019) 137, 58-71



Toward early cancer detection: Focus on biosensing systems and biosensors for an anti-apoptotic protein survivin and survivin mRNA

Magdalena Stobiecka*, Katarzyna Ratajczak, Sławomir Jakiela**

Department of Biophysics, Warsaw University of Life Sciences (SGGW), 02776, Warsaw, Poland



ARTICLE INFO

Keywords:

survivin protein
Survivin mRNA
Electrochemical biosensors
Nanogravimetric piezosensor
Optical sensors
Cancer biomarkers

ABSTRACT

The development of biosensors for cancer biomarkers has recently been expanding rapidly, offering promising biomedical applications of these sensors as highly sensitive, selective, and inexpensive bioanalytical tools that can provide alternative methodology to that afforded by the advanced hyphenated-instrumental techniques. In this review, we focus particularly on the detection of a member of the inhibitor of apoptosis proteins (IAP) family, protein survivin (Sur), a ubiquitous re-organizer of the cell life cycle with the ability to inhibit the apoptosis and induce an enhanced proliferation leading to the unimpeded cancer growth and metastasis. Herein, we critically evaluate the progress in the development of novel biosensing systems and biosensors for the detection of two survivin (Sur) biomarkers: the Sur protein and its messenger RNA (Sur mRNA), including immunosensors, electrochemical piezo- and impedance-sensors, electrochemi-luminescence biosensors, genosensors based on oligonucleotide molecular beacons (MBs) with fluorescent or electrochemical transduction, as well as the microfluidic and related analytical platforms based on solution chemistry. The *in-situ* applications of survivin biomarkers' detection technologies to equip nanocarriers of the controlled drug delivery systems with MB-based fluorescence imaging capability, apoptosis control, and mitigation of the acquired drug resistance are also presented and critically evaluated. Finally, we turn the attention to the application of biosensors for the analysis of Sur biomarkers in exosomes and circulating tumor cells for a non-invasive liquid biopsy. The prospect of a widespread screening for early cancers, based on inexpensive point-of-care testing using biosensors and multiplex biosensor arrays, as a means of reducing the high cancer fatality rate, is discussed.

1. Introduction

In the battle with ever expanding and largely incurable cancer growth and metastasis, plaguing the human population today, early detection of carcinogenesis is vital and brings hope of survival to patients. Since the early cancer detection needs to be carried out in a widespread testing at the points-of-care and doctor offices, the traditional diagnostic procedures involving advanced instrumentation should be augmented with inexpensive and widely available testing platforms. Hence, the development of biosensors capable of detecting cancer biomarkers is highly desirable. Many biomarkers specific to various cancers have been discovered and can be used in cancer diagnostics. Some of the most common to all types of cancers are the markers of the inhibitor of apoptosis proteins (IAP) family and, in particular, survivin which became a forefront cancer biomarker (Altieri, 2001; 2008b; Fan and Chen, 2017; He et al., 2018; Nguyen et al., 2019; Wang et al., 2017; Xu et al., 2018).

Survivin (Sur) is the smallest member of the IAP family which includes eight members (Altieri, 2008b; Ebrahimiyan et al., 2018; Schimmer, 2004): cIAP1, cIAP2, NIAP, IAP-like protein 2 (ILP2), X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP), survivin, livin, and BRUCE. The wild type survivin splice WT S (16.5 kDa) consists of four exons and three introns (Fig. 1) and forms a chain of 142 amino acids (Ambrosini et al., 1997). In solution, it forms a bow tie-shaped homodimer (Altieri, 2008a; Chantalat et al., 2000; Muchmore et al., 2000; Verdecia et al., 2000), as illustrated in Fig. 1A. The role of Sur in cancer biology and the methods of Sur gene detection have recently been evaluated in a series of excellent reviews (Andersen et al., 2007; Chen et al., 2016; Chiou et al., 2003; Dallaglio et al., 2012; Fangusaro et al., 2006; Johnson and Howerth, 2004; Li et al., 2018; Sah et al., 2006; Wheatley and Altieri, 2019). Sur plays a crucial role in regulation of cell division, proliferation and the cell cycle control (Altieri, 2003; Khan et al., 2009; Mita et al., 2008; Wolanin and Piwocka, 2007). It is strongly expressed in embryos and malignant tumors but very weakly in the normal

* Corresponding author.

** Corresponding author.

E-mail addresses: magdalena.stobiecka@sggw.pl (M. Stobiecka), slawomir.jakiela@sggw.pl (S. Jakiela).

<https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.04.060>

Received 31 January 2019; Received in revised form 11 April 2019; Accepted 30 April 2019

Available online 04 May 2019

0956-5663/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

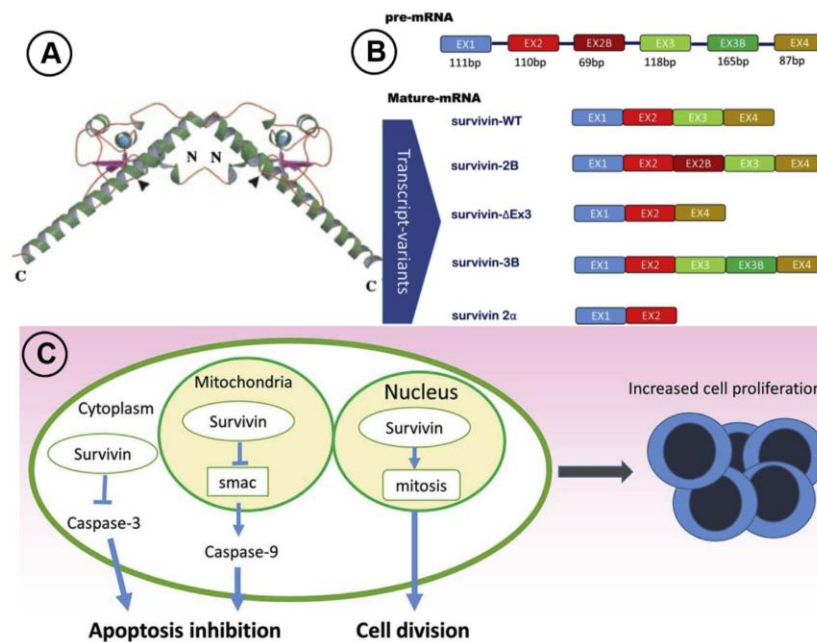


Fig. 1. (A) Structure of survivin dimer. Reprinted with permission from (Chantalat et al., 2000); (B) Five splice variants of survivin; (C) Schematic exhibition of survivin roles in apoptosis and cellular proliferation. Reprinted with permission from (Ebrahimiyan et al., 2018).

differentiated cells, evidently showing that Sur is involved in the rapid growth and proliferation of cells. The inhibition of apoptosis and enhancement of cell proliferation distinguish cancer cells from normal cells. Due to its active role in tumor growth and metastasis, Sur became a prime cancer biomarker (Gleichenhagen et al., 2018; Khan et al., 2012; Konopka et al., 2009; Rödel et al., 2012; Su, 2016). In Fig. 1C, the basic effects of survivin on cell life are characterized. It has been demonstrated that knocking Sur out of cells would cause an apoptosis process (Olie et al., 2000). Hence, the Sur protein and Sur mRNA have become extensively investigated in view of their potential utilization as selective targets for cancer therapy (Blanc-Brude et al., 2003; Ferrario et al., 2007; Frassanito et al., 2019; Garg et al., 2016; Ghadimi et al., 2012; Kanwar et al., 2011; Mazur et al., 2018; Mobahat et al., 2014; Pennati et al., 2008; Ryan et al., 2009; Smolewski and Robak, 2011).

This review summarizes the achievements of the scientists and clinicians in the field of optical and electrochemical biosensing systems and biosensors utilized for the detection of Sur protein and Sur mRNA biomarkers for most common human cancers based on antigen-antibody interactions and DNA hybridization processes. Particular attention has been paid to the methods of detection and the design of molecular beacon probes, genosensors based on solid electrodes and nanoparticles, nanogravimetric and chemiluminescence survivin immunosensors, as well as the microfluidic systems. The reports published on the development of biosensors and biosensing systems for the detection of Sur biomarkers are highly advanced but non-frequent, likely because the number of research groups involved in developing the biosensors for Sur protein and Sur mRNA is now only beginning to increase. Hence, more developments will likely be published soon. The assessment of the prospective biosensors and biosensing systems, proposed until now, indicates that the biosensor technology for the detection and monitoring of Sur biomarkers is ready to enter the stage of expansion and may be able to offer new solutions for a widespread,

non-invasive, early cancer detection initiatives which are one of the key elements of a successful treatment of neoplasia. This new technology may also be able to help in diagnosing and therapy of pre-metastatic cancers utilizing non-invasive procedures based on exosomes.

2. Prospective biosensing platforms

The anti-apoptotic IAP proteins, and especially Sur, are over-expressed in all types of malignant tumors. In Table 1, recent studies reporting the expression of Sur in different cancer cell lines are listed and the methodology utilized in the detection process, together with conditions of the detection, are presented. The listing includes also the limit of detection (LOD) achieved. As can be seen, most of the methods used for survivin detection are based on molecular biology techniques, including reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) (Chu et al., 2012; Fu et al., 2008; Han et al., 2012; Jin et al., 2019), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Chen et al., 2018; Gleichenhagen et al., 2018; Kappler et al., 2003), Western blot (WB) (Yang et al., 2003), and immunohistochemical (IHC) (Jakubowska et al., 2016; Li et al., 2019; Lorenzetta et al., 2019) methods.

The early cancer detection requires testing of many high-risk patients, including those exposed to carcinogens or radiation, patients carrying genetic inheritance, having lowered immune defenses or otherwise of a high risk due to the lifestyle or vulnerable phenotype. Therefore, a range of prospective biosensing platforms must be considered to narrow down the choices to the most effective, low cost, and robust platforms which are simple to operate in the environment of highly accessible points-of-care and doctor offices. Here, we describe and evaluate different approaches based on the detection of Sur protein and Sur mRNA biomarkers which are by far the most common signature of the malignant tumors. In comparison with the current molecular biology techniques and methods based on sophisticated instrumental

Table 1

Expression of survivin in various cancer cell types and published methods of Sur protein and Sur mRNA detection.

No.	Types of cancer	Cell lines	Sur target	Method of detection ^{b,h}	Quantification/LOD _s ^a	Ref.
1	Oral squamous carcinoma	H376	protein	ELISA	70 ± 28 nM (5.8 ± 2.3 ng/mg protein in lysate)	Konopka et al. (2009)
		HSC-3	protein	ELISA	146 ± 35 nM (12.0 ± 2.9 ng/mg protein in lysate)	
		H413	protein	ELISA	153 ± 11 nM (12.6 ± 0.9 ng/mg protein in lysate)	
2	Astrocytoma	U87 MG	protein	Nanogravimetric immunosensor	1.87 ± 0.7 nM in cell lysate 1.7 ± 0.8 nM in 10 mM PBS	(Stobiecka et al., 2016a,b)
3	Nasopharyngeal carcinoma	CNE-2	mRNA	RT-PCR	2.48 × 10 ⁻³ relative expression level	Fu et al. (2008)
4	Prostate cancer	PC-3	protein	ELISA	4.44 pM (73.3 pg/mL)	Khan et al. (2009)
5	Ovarian cancer	n.s.	protein	IHC	n.s.	Turan et al. (2014)
6	Breast cancer	MCF-7	cDNA	MB-GN	3 nM	Piao et al. (2012)
7	Pancreatic cancer	MIAPaCa-2, BXPc-3, Panc1	protein	ELISA	3.8 pM (63 pg/mL)	Khan et al. (2009)
		Capan1	protein	WB	n.s.	
		Panc1	protein	ELISA	15.0 pM (246.9 pg/mL)	
8	Colorectal cancer	LoVo, SW480, Colo 320, HT-29	mRNA	RT-PCR	1.24 pM (20.4 pg/mL)	Chu et al. (2012)
		SW480	protein	WB	n.s.	
		SW480	mRNA	RT-PCR	n.s.	
		SW480	tDNA	MB	16 nM in buffer	
9	Neuroblastoma	CHP134, IMR32, SH-SY5Y, SK-N-AS	mRNA	NB	n.s.	Sarela et al. (2000) (Ratajczak et al., 2018a,b)
10	Bladder cancer	S637	protein	ELISA	395 nM (32.6 ng/mg of protein)	Islam et al. (2000)
		SW1710	protein	ELISA	73 nM (6.0 ng/mg of protein)	
		HT1197	protein	ELISA	108 nM (8.9 ng/mg of protein)	
11	Rhabdomyo-sarcoma	A-204	protein	ELISA	34 nM (2.8 ng/mg of protein)	Kappler et al. (2003)
12	Hepatocellular carcinoma	n.s.	protein	IHC	n.s.	Jin et al. (2014)
13	Malignant melanoma	A375	mRNA	RT-PCR	n.s.	Carpi et al. (2014)
14	Cervical cancer	SiHa, HeLa	mRNA	MB	n.s.	Xue et al. (2011)
15	Gastric cancer	HeLa	protein	ELISA	295 ± 35 nM (24.3 ± 2.9 ng/mg protein)	Konopka et al. (2009)
		n.s.	protein	IHC	n.s.	
		SGC 7901	protein	WB	n.s.	
			mRNA	RT-PCR		Yang et al. (2004)

^a Quantification/LOD is provided in molar concentration and it is recalculated from other units assuming that the average content of proteins in mammalian cells is 0.2 g/mL of cell volume (concentrations in original units are also provided).

^b Detection limit: n.s. – not specified.

^c ELISA - enzyme-linked immunosorbent assay.

^d MB-GN - molecular beacon with spherical graphite nanoparticle.

^e MB - molecular beacon.

^f RT-PCR – reverse transcription polymerase chain reaction.

^g WB - Western blot.

^h NB - Northern blot.

ⁱ IHC - immunohistochemical method.

techniques, such as mass spectrometry, the prospective biosensor-based methodologies, discussed in this section, provide alternative, lower cost, more robust, faster, competitively sensitive, and more scalable devices which are easier to handle by untrained personnel and are suitable to detect Sur protein and Sur mRNA biomarkers in widespread early cancer screening framework.

2.1. Solid electrodes and nanoparticles-based biosensors for the detection of Sur mRNA

One of the most effective methods of detection of the overproduction of Sur protein in the framework of *in vivo* or *in vitro* measurements is based on an indirect testing involving the expression of Sur mRNA. The massive expression of Sur mRNA results in overproduction of Sur protein in the intracellular process of mRNA translation into a protein. Thus, the high level of Sur mRNA is indicative of overproduction of Sur protein. The detection of Sur mRNA is performed using Sur mRNA genosensors (or: Sur genosensors, in brief). These genosensors consist of oligonucleotide probes with antisense sequences encoding a fragment of Sur mRNA. The probes are immobilized in the active recognition layer of the biosensors. The most common sequences of the oligonucleotide survivin probes and targets are presented in

Table 2.

Sur mRNA in cells has recently been analyzed by the Xu's group (Liu et al., 2012) using an “on-off-on” switchable electrochemical biosensor based on labeled stem-loop DNA probes attached via thiolate groups to a gold electrode. The Authors have shown that ferrocene (Fc) tagged DNA probes can be used for survivin mRNA detection inside human hepatoma cells line SMMC-7721 using electrochemical techniques. Upon DNA duplex formation the ferrocene moiety was moved to a distal location from the surface of the electrode resulting in a decrease of the electrochemical signal. In the presence of calcium ions, the interaction of the duplex with cells caused further decreasing of the signal. After the lysis of cells with Triton X-100 lysing buffer, only the Fc tagged DNA probes remained on the electrode. The advantage of this method is that two opposing signals, electrochemical and fluorescence, are generated, thereby increasing the method reliability. However, the requirement of cell capture on the sensor surface may lead to a higher noise due to the varying number of cells attached. On the other hand, different kinds of cells could also be distinguished using these biosensors (Fig. 2).

Liu and coworkers have developed an electrochemical DNA biosensor for the detection of Sur mRNA (Liu et al., 2013a). The biosensor was based on a sulfhydryl modified capture probe, self-assembled on a

Table 2
Sequences of oligonucleotide probes and targets used for survivin mRNA recognition in biosensors and fluorescence essays in solution.

No.	Oligonucleotide sequence for targeting survivin	Method	LOD	Ref.
1	MB 5'-(ATTO647N)CGACGGAGAAAGGGCTGCCACGXC(BBQ)-3' X = C6-dT Thio Target 5'-CCCGTGGCTGGCAGCCCTTTCTCAAGGACC-3' Random sequence 5'-ATCGGTGGCCTTGTGC-3' Linear probe 5'-(ATTO647N)GAGAAAGGGCTGCCA(Thiol)-3'	Optical fiber sensor	0.57 nM	Giannetti et al. (2015)
2	Sur MB 5'-Joe-CCTGGC CCA GCC TTC CAG CTC CTT GCCAGG-Dabcy1-3' Complementary target 5'-CAA GGA GCT GGA AGG CTG GG-3'	Fluorescence MB	16 nM	Ratajczak et al. (2018b)
3	MB1 5'-FITC-AGACAGTTGAGAAAGGGCTGCTG TCTAAAAA- (CH2)3-SH -3 DNA target 1 (MB1 perfectly matched) 5'-CAGCCCTTTCTCAA -3' DNA target 2 (MB1 single-base mismatched) 5'-CAGCCCTGTCTCAA -3'	Fluorescence MB	n.s.	Qiao et al. (2011)
4	Probe 5'-6-FAM-CCT GGC CCA GCC TTC CAG CTC CTT GCC AGG-Dabcy1-3' Target 5'-CAA GGA GCT GGA AGG CTG GG-3'	Fluorescence MB	2 nM	Stobiecka and Chalupa (2016)
5	Probe DNA 5'-Ferrocene-C6-CCGGCACAAGG AGCTGGAACCATGCCGG-C6-HS-3' Antisense oligonucleotide 5'-6-FAM-CCCAGCCTTCCAGTCTCTTG-3' (5 phosphatic bases from both endings were modified by thiosulfates) Target in human MIMC-7721 CAAGGAGCTGGAAGGCTGGG. Target in mouse MEF TAAGGAATTGGAAGGCTGGG	DPV	n.s.	Liu et al. (2012)
6	forward 5'- CCACTGCCCACTGAGAAC-3' reverse 5'-TGGTCCAGCCTTCCA-3'	RT-PCR	n.s.	Peng et al. (2005)
7	Target Survivin cDNA from 27 to 43 nucleotide Survivin cDNA from 33 to 50 nucleotide probe 5'-Cy3-CTGAGAAAGGGCTGCCAGTC TCAG-Dabcy1-3' 5'-FITC-TGGTCTTTGAGAAAGGGCGA CCA-Dabcy1-3'	Fluorescence MB	n.s.	Yang et al. (2005)
8	Donor MB: 5'-/Cy3/GAGAAAGGGCTGCCATTCTC/BHQ-2/-3' Acceptor MB: 5'-/BHQ-3/ACCACGTAGAGATGCGGTGGT/Cy5/-3' Target: 5'-ATGGGTGCCCGACGTTGCCCTTGCC TGGCAGCCCTTTCTC aagg ACCACCGCATCTCTAC ATTCAAGAACTGGCCC-3'	Dual FRET MB	n.s.	Santangelo et al. (2004)
9	Target: 5'-ATGGGTGCCCGACGTTG CCCCTTGCC TGGCAGCCCTTTCTC aagg ACCACCGCATCTCTAC ATTCA AGAACTGGCCC-3' Donor MB: 5'-/Cy3/GAGAAAGGGCTGC CATTCTC/BHQ-2/-3' Acceptor MB: 5'-/BHQ-3/ACCACGTAGAGATGCGGTGGT/Cy5/-3' Donor MB: 5'-/FAM/GAGAAAGGGCTG CCATTCTC/BHQ-2/-3' Acceptor MB: 5'-/BHQ-3/ACCACGTAGAGATGCGGTGGT/Cy3/-3'	Dual FRET MB	n.s.	Wang et al. (2011)
10	antisense oligonucleotide for cell viability and apoptosis detection (S1) 5' CCCAGCCTTCCAGCTCCTTG3' antisense oligonucleotide labeled with FITC (F-S1) 5'-FITC -CCCAGCCTTCCAGCTCCTTG3' chemical synthesized target survivin strand (S2) 5'-CAAGGAGCTGGAAGGCTGGG3' random oligonucleotide labeled with FITC (F-S3) 5'-FITC -TCTCCCAGGAGCTCTCTCT3'	Microfluidic system with fluorescence assay	(4.8 ± 1.8) × 10 ⁶ copies 2.1–6.5 μM	Li et al. (2013)
11	Probes 5'-GTT CTT GGA TGT AGA GAT GC-3' 5'-GCT TCT TGA CAG AAA GGA A-3' 5'-CAA CGT CGG GGC ACC CAT-3'	Flow cytometry	n.s.	Yang et al. (2004)
12	Probe 5'-Cy3-CGACGGAGAAAGGGCTGCCACG/thiol-dT/CG-BHQ2-3'	Peptide-linked molecular beacons	n.s.	Nitin et al. (2004)
13	Probe Recognition sequence: 5'-CTT GAG AAA GGG CTG CCA AAA AA-SH-3' Reporter sequence: 3'-CCC GAC GGT T-Cy5-5' Target: 3'-GAA CTC TTT CCC GAC GGT-5'	Fluorescent nano-flares	n.s.	Seferos et al. (2007)
14	SurMB-Joe 5'-Joe-CCTGGC CCA GCC TTC CAG CTC CTT GCCAGG-Dabcy1-3' St 5'-CAA GGA GCT GGA AGG CTG GG-3' St-1 5'-CAA GGA GCT GCA AGG CTG GG-3' St-2 5'-CAA GGA GCT CCA AGG CTG GG-3' St-nc 5'-CCC AGC CTT CCA GCT CCT TG-3'	Fluorescence MB	26 nM	Ratajczak et al. (2018a)
15	SurMB 5'-FAM - CCT GGC CCA GCC TTC CAG CTC CTT GCC AGG - Dabcy1-3' St 5'-CAA GGA GCT GGA AGG CTG GG-3' St-1 5'-CAA GGA GCT GCA AGG CTG GG-3' St-2 5'-CAA GGA GCT CCA AGG CTG GG-3'	Fluorescence MB	24 nM	Stobiecka et al. (2016b)

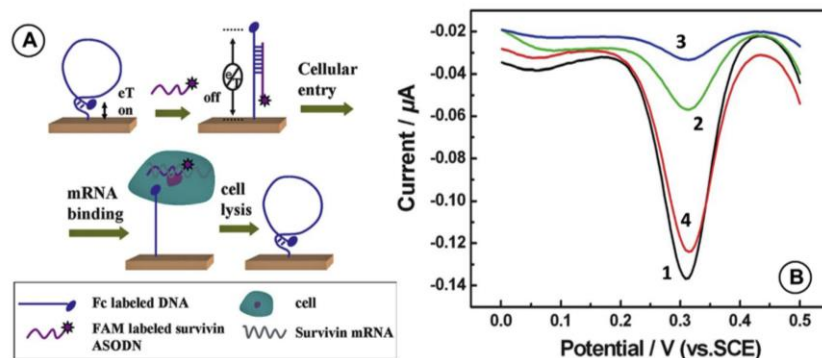


Fig. 2. (A) A circular 'ON-OFF-ON' Fc-DNA-based electrochemical switch for mRNA sensing. (B) DPVs obtained in 10 mM PBS (pH 7.4) with (1) Fc-DNA, (2) DNA duplex, (3) after reaction with SMMC-7721 cells in the presence of Ca^{2+} , (4) after treatment with lysis buffer. Adopted with permission from (Liu et al., 2012).

three-dimensional nanostructure of a graphene-gold nanocomposite which was deposited on the surface of a glassy carbon electrode. Upon capture, the target was flanked by the capture and biotinylated reporter probes creating the "sandwich-type" detection strategy. The electrochemical current signal was enhanced by horseradish peroxidase (HRP) enzyme conjugated with streptavidin attached to the biotinylated reporter when target was captured on the electrode. This highly amplified DNA biosensor has shown excellent sensitivity and selectivity with $\text{LOD} = 3.4 \text{ fM}$. However, the disadvantage of the amplifying strategy based on electrochemical enzymatic currents is the limitation of this genosensor usage to the cell lysates. The genosensor was successfully applied for the analysis of PCR samples.

High signal amplification in the detection of Sur mRNA was also investigated by Li et al., (2015). The Authors have utilized the ability of the duplex-specific nuclease (DSN) enzyme to cleave a double-stranded DNA or a DNA in DNA:RNA heteroduplexes causing the bio-bar-code probe with cadmium sulfide nanoparticles (CdS-NPs) to release the NPs to the solution. The electrochemical signal was measured using anodic stripping voltammetry technique. This doubly-amplified genosensor has shown an ultra-high sensitivity and selectivity with LOD of 0.48 fM (Fig. 3). The use of DSN nuclease poses, however, certain problems when attempting to utilize the method *in vivo* since the presence of intracellular nucleases and double-stranded DNA may interfere in cleaving the duplexes of the mRNA with capture probes. Also, the up-regulated glutathione in cancer cells may interfere or even block the electrode surface in ASV transduction process. Due to the high

sensitivity of this genosensor, an extra effort for the sample pretreatment, for instance in a microfluidic framework may be worth trying.

Recently, an optical biosensor for Sur mRNA detection based on a fiber nanotip coupled with molecular beacons was developed by Giannetti et al., (2015). The Authors have reached the limit of detection of 0.57 nM for a complementary target. This genosensor offers an advantage of a high sensitivity and design simplicity. It is simple to operate and therefore may be utilized without highly trained personnel.

2.2. Microfluidic and gated systems based on biosensors for the detection of Sur protein and Sur mRNA

Microfluidic lab-on-a-chip biosensing devices integrate and miniaturize multiple stages of analytical procedures, thereby enabling high throughput and highly reproducible and inexpensive testing. Furthermore, lateral flow paper-based microfluidic biosensors offer versatility and simplicity, making them very useful in points-of-care and doctor offices.

Li et al., (2013) have described the detection of intracellular Sur mRNA biomarker using antibody-based microfluidic microchannel devices. The microchannel was first modified with prostate stem cell antigen (PSCA) monoclonal antibody for prostate cancer cells detection. Then, using a graphene-oxide-poly(ethylene glycol) bis(amine) as the nanocarrier of fluorescein isothiocyanate-labeled oligonucleotide, encoded for recognition of Sur mRNA, the biomarker detection was carried out. Here, the advantage of microfluidic detection platform clearly

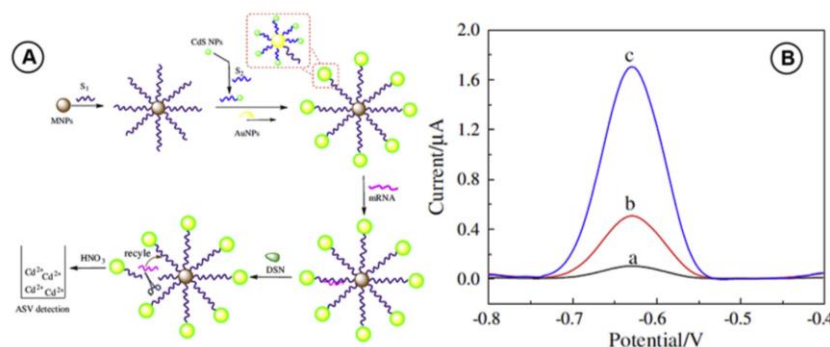


Fig. 3. (A) Schematic representation of the sensing interface for the label-free electrochemical detection of mRNA with dual-amplification of duplex-specific nuclease and bio-bar-code. Anodic stripping voltammetry response of (a) baseline, (b) DNA and (c) mRNA. Reprinted with permission from (Li et al., 2015).

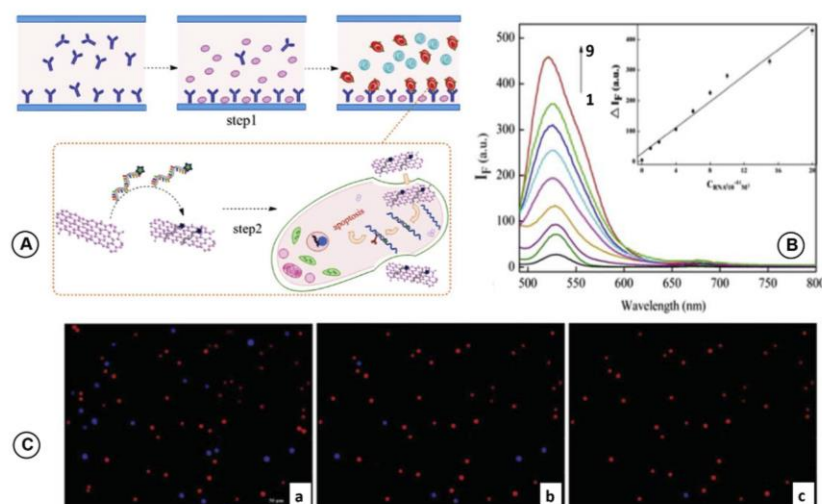


Fig. 4. (A) Schematic illustration the capture of target cells in an anti-PSCA modified microchannel device (step 1) and the fluorescence assay of survivin mRNA (step 2). (B) Fluorescence intensity of survivin target S2 detection from (1) 0 to (9) 2×10^{-10} M; INSET: Dependence of I_F vs. C_{surv} ; (C) Microscope images of mixed cell samples of flow at rates (a) 0, (b) 10 and (c) 20 $\mu\text{L}/\text{min}$. Adopted with permission from (Li et al., 2013).

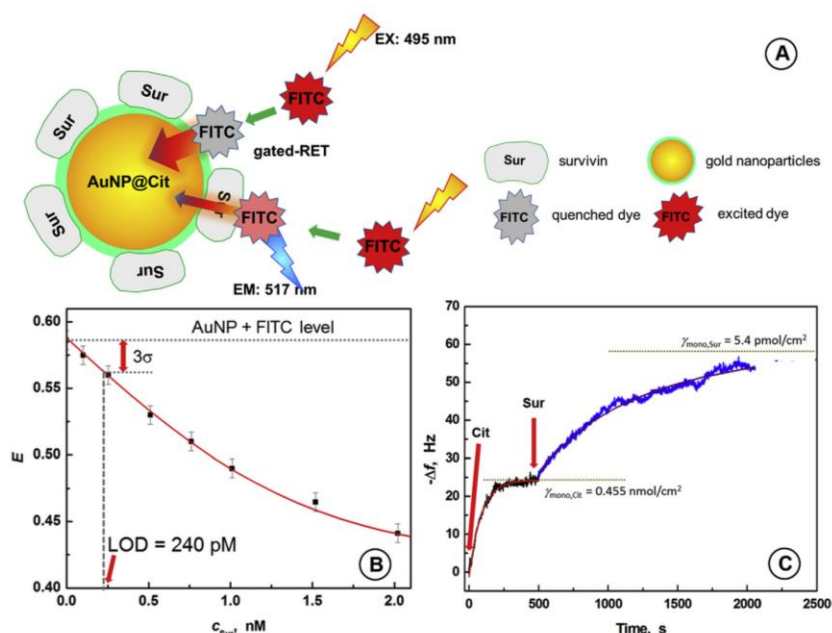


Fig. 5. (A) Principle of gated fluorescence resonance energy transfer (gRET); (B) Dependence of the gRET efficiency on survivin concentration; (C) Nanogravimetric transients of citrate (Cit) adsorption on Au piezoelectrode followed by a survivin (Sur) film formation. Adopted with permission from (Stobiecka and Chalupa, 2015).

lies in the ability to selectively capture cancer cells in a microfluidic channel for further internalization of genosensor nanoprobe in the collected cells. The Authors have estimated the survivin mRNA content in a single cell as $(4.8 \pm 1.8) \times 10^6$ copies (Fig. 4).

A comprehensive method for the isolation of distinct cancer cell

populations from body fluids using a microfluidic device has been developed by Abreu 2016a, 2016b. The *in situ* immunocytochemical evaluation using an optimized panel of five biomarkers, including DAPI, pan-CK, vimentin, survivin, and CD45, was performed. The cell capture efficiency of the microfluidic platform was determined by

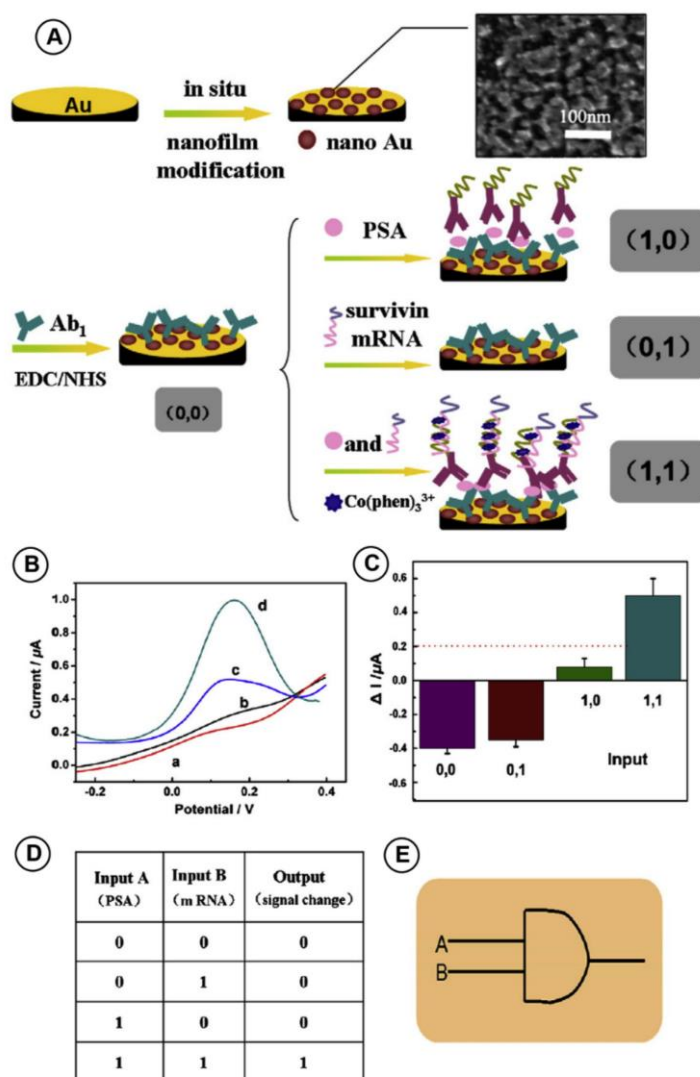


Fig. 6. (A) The schematic presentation of the logic-controlled “AND” system; (B) Differential pulse voltammograms upon different input signals: (a) (0,0), (b) (0,1), (c) (1,0), (d) (1,1); (C) Bar diagrams for Co(phen)₃³⁺ peak current changes; (D) Table for the AND logic gate; (E) Circuit for the AND logic gate. Reprinted with permission from (Liu et al., 2013b).

counting the number of the entrapped fluorescent cells, followed by staining with the cell-permeable dye Calcein AM. This work demonstrates that an inexpensive microfluidic detection platform employing multiple biomarkers can serve as the efficient cancer screening method based only on non-invasive body fluids testing.

Wang et al., (2015) have shown that the target Sur mRNA after hybridization with ssDNA probe can trigger the release of luminophore Ru(bpy)₃²⁺ encapsulated in the positively charged mesoporous silica nanoparticles functionalized with 3-aminopropyltriethoxysilane and the negatively charged ssDNA. The reaction of luminophore with the coreactant tripropylamine in the solution has given an

electrochemiluminescence (ECL) signal proportional to the concentration of Sur mRNA. The Authors have found Sur mRNA level to be in the range 0.5–50 fM with a limit of detection of 0.1 fM. The ECL biosensor based on DNA bio-gate with the mesoporous silica nanoparticles system provided high signal amplification owing to the duplex-specific nuclease used in the investigations for specific digestion of the ssDNA in the DNA-RNA heteroduplexes. The proposed assay offers the advantage of a very high sensitivity to Sur mRNA due to the applied amplification paradigm. The complexity introduced with the amplification scheme may however lead to some interference from the biological matrix.

Another kind of the gate system, the gated plasmon-enhanced

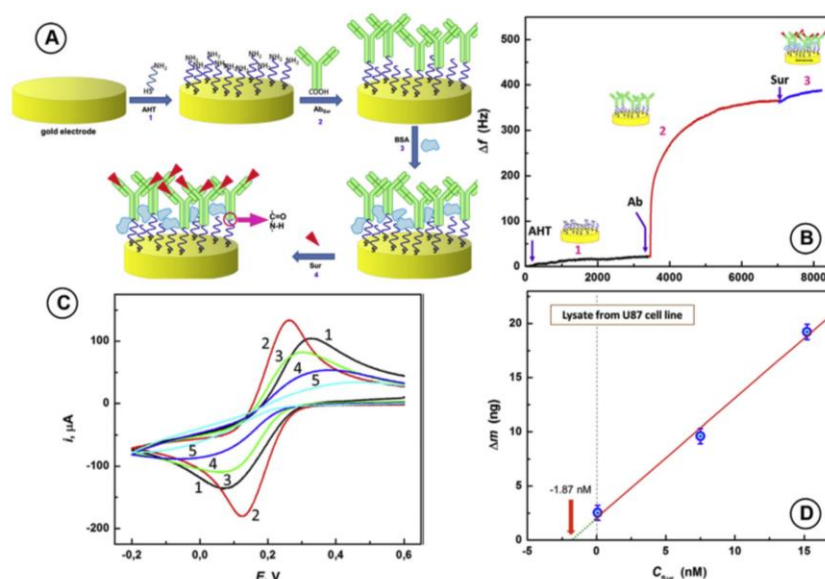


Fig. 7. (A) Schematic illustration of the construction of immunosensors; (B) Frequency shift transients: (1) aminohexanethiol (AHT), (2) anti-survivin antibody (Ab), (3) survivin; (C) Cyclic voltammograms: (1) bare gold piezoelectrode and (2–5) after immobilization of successive layers, $v = 100$ mV/s; electrolyte: 3.33 mM $K_3Fe(CN)_6 + 66$ mM PBS. (D) Determination of Sur in a lysate solution from U-87MG cell line. Reprinted with permission from (Stobiecka et al., 2016a). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

resonance energy transfer (gRET) for the detection of survivin protein was developed by Stobiecka and Chalupa, (2015). The Authors have demonstrated that the resonance energy transfer occurring between a fluorescent dye and gold nanoparticles can be modulated by the width of gates (channels) in the shell of protein surrounding the nanoparticle core. In the experiments, citrate-capped gold nanoparticles were used in conjunction with a fluorescein isothiocyanate dye and Sur protein forming sub-monolayer films on AuNPs. Despite of the electrostatic repulsive forces between these components, the method was ultrasensitive to survivin with LOD = 240 pM (Fig. 5).

A logic-controlled “AND” mode biosensor for detection of two different cancer biomarkers: prostate-specific antigen and Sur mRNA was designed by Liu et al., (2013b). The biosensor was based on the immobilization of primary capture antibody Ab_1 and secondary detection antibody Ab_2 - DNA complexes onto the mercaptopropionic acid-functionalized gold nanostructured film formed on the Au electrode surface. The electrochemical signal obtained after intercalation of $Co(phen)_3^{3+}$ ions into DNA duplex, formed upon hybridization of the Sur antisense oligonucleotides with Sur mRNA strands, was measured using differential pulse voltammetry technique. The Authors have demonstrated that faradaic current generated by the intercalation agent increases only when both biomarkers are detected in the sample (Fig. 6), thus resembling a logic AND gate operation principle. The advantage of the logic gate system is in the simple YES/NO answer to the diagnosis of cancer. However, when the input signals are close to the threshold values, any change in background level or noise in the electrochemical output reading may lead to false positive or false negative results. In the former case, further testing using methods with analog output may solve the problem.

2.3. Nanogravimetric and chemiluminescence based biosensors for the detection of Sur protein

Recently, Stobiecka et al., (2016a) have developed a

piezoimmunosensor for direct detection of Sur protein using electrochemical quartz crystal nanobalance. The gold piezoelectrode was modified with a self-assembled monolayer of aminohexanethiol molecules and covalently bound monoclonal anti-survivin antibodies. The proposed sensor was constructed layer-by-layer with monitoring of the resonance frequency of the piezoresonator and cyclic voltammetry characteristics for each layer. The Authors were able to detect Sur protein with LOD = 1.7 nM. The assessment of piezoimmunosensor applicability for the analysis of U87 MG cell line lysate was also presented (Fig. 7). The advantage of the combined piezometric and electrochemical testing is the assurance of the sensor responses which is equivalent to embedding of an internal control to the sensory system.

Yang et al., (2018) have used magnetic particles-based chemiluminescence enzyme immunoassay for the detection of Sur protein and evaluation of the diagnostic value of urinary Sur for bladder cancer and renal cell carcinoma. The method was based on a double-antibody sandwich immunoreaction and luminol- H_2O_2 chemiluminescence system. One kind of monoclonal antibodies against Sur was coupled to magnetic beads and the second one was labeled with horseradish peroxidase (HRP). After interaction with Sur, the luminescence signal was measured. The achieved limit of detection for Sur was LOD = 57 pM (0.949 ng/mL), competing well with ELISA, as tested with 90 clinical urine samples. Thus, this highly sensitive amplified method has a potential for non-invasive cancer screening.

2.4. Molecular beacon (MB) probes-based fluorescence biosensing systems for the detection of Sur mRNA

Recently, extensive studies have been performed with molecular beacon (MB) probes consisting of an oligonucleotide strand labeled with a fluorophore and a quencher. The sequence of this loop-stem structured probe is complementary to a part of the Sur mRNA sequence. The use of oligonucleotide molecular beacons encoded for recognition of Sur mRNA is becoming one of the leading cancer diagnostic tools.

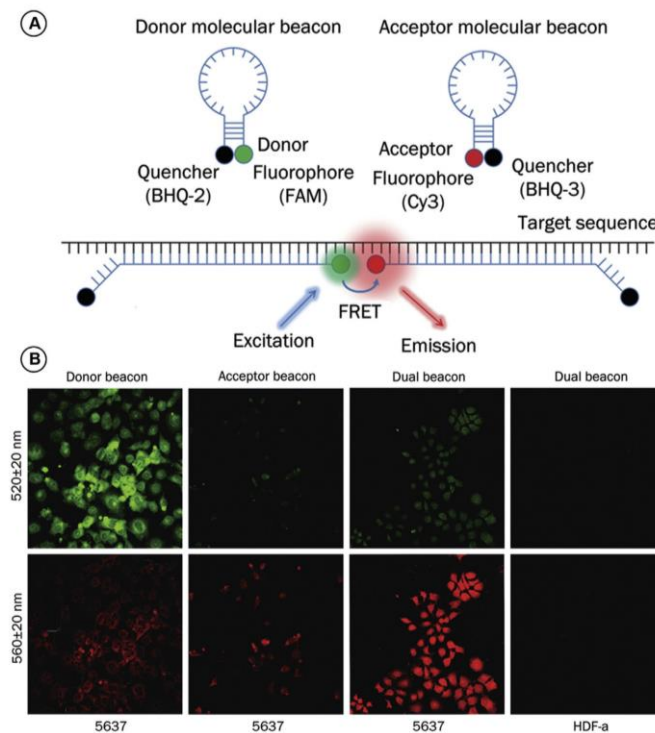


Fig. 8. (A) Scheme of mechanism of a dual FRET MB. Hybridization of donor and acceptor MBs to mRNA target upon donor excitation (490 nm); (B) Laser scanning confocal fluorescence microscopy images of 5637 and HDF-a cells incubated with MBs for survivin mRNA detection. Reprinted with permission from (Wang et al., 2011).

The different kinds of molecular beacon probes are described in this and the next sections. The advantage of these biosensing systems is that they enable direct monitoring of the expression of Sur mRNA *in situ*.

Wang and coworkers (Wang et al., 2011) have detected survivin mRNA in bladder cancer (BCa) cell lines 5637, 253 J, and T2, as well as in exfoliated cells in urine samples from patients with BCa using survivin-targeting dual fluorescence resonance energy transfer molecular beacon. The Authors have used a pair of molecular beacons with sequences complementary to survivin mRNA. One MB with FAM or Cy3 fluorophore and BHQ-2 quencher was acting as the donor and second MB with BHQ-3 quencher and Cy3 or Cy5 fluorophore was acting as the acceptor. After hybridization with target oligonucleotide, the fluorescence resonance energy transfer (FRET) between the donor and acceptor fluorophores has occurred upon the donor excitation, showing clearly the fluorescence signal. The Authors used also the human dermal fibroblasts-adult cells as a negative control which has shown almost no fluorescence signal in contrast to BCa cells (Fig. 8).

Molecular beacons with different fluorophores (FITC and Texas Red) and Dabcyl quencher have been designed for simultaneous detection of mRNA of survivin and cyclin D1 tumor markers in breast cancer cell lines: SKBr-3, MDA-MB-231, MCF-7 and MDA-MB-435 by Peng et al., (2005). The expression of these genes was also confirmed by real-time RT-PCR and survivin protein by Western Blot analysis. The Authors have also studied the Sur gene expression *in situ* in frozen breast cancer tissue sections, as well as in viable cells and in cells treated with EGF, docetaxel, and p53. The fluorescent signal was very low for both molecular beacons in a normal immortalized human

mammary epithelial cell line.

The survivin mRNA was also detected in colorectal cancer cells SW480 using molecular beacon probe modified with Joe fluorescence dye and Dabcyl quencher by Ratajczak et al., (2018a). The Authors have proposed a new model of interactions of MB with complementary oligonucleotides based on the hairpin–hairpin interactions of oligonucleotides. They have shown an efficient transfection of malignant SW480 cells with molecular beacon probes using liposomal nano-carriers, which resulted in a strong green emission from internalized Sur mRNA corroborating the overexpression of survivin mRNA. Similar experiments with healthy human-colon epithelial cells CCD 841 CoN have shown only negligible expression of survivin mRNA. A single nucleotide polymorphism sensitivity and a low detection limit of 26 nM for complementary targets have been achieved (Fig. 9).

Recently, Xue et al., (2011) have used MBs that target a wild-type survivin mRNA for the diagnosis of cervical cancer. The molecular beacon probes were covalently linked with FITC or Cy3 fluorescence dyes and Dabcyl quencher. The Authors have shown, that both MB probes were able to detect the expression of survivin and generated strong fluorescent signals corresponding to the survivin mRNA in cytoplasm and nucleus of the cervical cancer cell lines HeLa and SiHa. They have also found that the expression of Sur mRNA in the normal human dermatological fibroblast cells was negligible. The fluorescent signal generated by MB was consistent with results obtained using Western blotting, RT-PCR, and immunocytochemical staining method. Survivin expression was also detected in clinical smear samples obtained from patients with cervical cancer using MB with 61.4% (27/44)

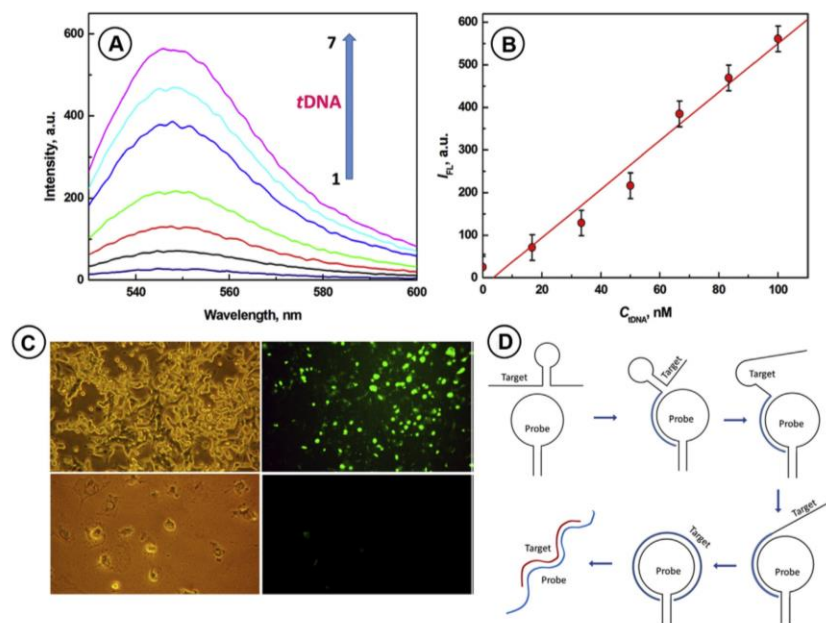


Fig. 9. (A) Fluorescence emission spectra of SurMB-Joe recorded with complementary tDNA; (B) Dependence of $I_{FI,max}$ vs C_{tDNA} . Conditions: $C_{SurMB-Joe} = 100$ nM, buffer: 10 mM PBS, pH 7.4; $\lambda_{ex} = 520$ nm. C_{tDNA} (nM): from 0 to 100; (C) Optical (left) and fluorescence (right) microscopic images of SW480 cells (top panel) and CCD 841 CoN cells (bottom panel) transfected with SurMB-Joe; (D) Mechanism of hairpin–hairpin interactions for SurMB-Joe with target. Reprinted with permission from (Ratajczak et al., 2018a).

sensitivity and 72.7% specificity (34/44).

Carpi et al., (2014) have found that treatment of human malignant melanoma A375 cell line and human metastatic melanoma 501 Mel cell line with MBs encoded for recognition of Sur mRNA, have induced apoptosis of these cells. This process was investigated by measuring the dissipation of mitochondrial membrane potential, internucleosomal DNA fragmentation, and changes in nuclear morphology, revealed by DAPI staining. The effect of MB on survivin gene expression and protein expression was investigated using real-time PCR and Western blot experiments.

According to Piao et al., (2012), the MB with graphite nanoparticles is a robust molecular probe for the detection of survivin mRNA in human breast cancer MCF-7 cells. It can also be utilized for real-time monitoring of gene expression and survivin mRNA level quantification. The Authors have shown that the intensity of fluorescence signal of MB was increased after the addition of docetaxel which can up-regulate the survivin gene expression.

2.5. Probes attached to membrane-penetrable nanocarriers of graphene oxide, polymers and plasmonic nanoparticles based biosensing system for the detection of Sur mRNA

Recently, the Stobiecka's group has shown that a graphene oxide nanosheet (GON) can be used as the nanocarrier of MB (GON@MB) for survivin mRNA detection in human malignant glioma cell 87 MG (Stobiecka et al., 2016b) and colorectal cancer cell line SW480 (Ratajczak et al., 2018b). The Authors have achieved the limits of detection of 24 nM and 16 nM, for these cell lines, respectively. The GONs were characterized using resonance elastic light scattering, Raman spectroscopy, SEM and TEM, and their efficacy was evaluated by MTT cell viability testing (Fig. 10).

Adinolfi et al. 2014, 2017 have used the polymethylmethacrylate nanoparticles (PMMA-NPs) with adsorbed molecular beacons for the detection of Sur mRNA in A549 human lung adenocarcinoma epithelial cells. A molecular beacon equipped with an ATTO 647N fluorescence dye and a Blackberry Quencher was utilized for Sur mRNA monitoring. Authors have shown that the MB loaded onto PMMA-NP carriers were effectively internalized into A549 cells generating fluorescent signal in the presence of survivin mRNA expression.

Recently, Klymchenko's group (Melnychuk and Klymchenko, 2018) proposed a highly sensitive nanoantenna nanoprobe for the detection of Sur mRNA. The nanoprobe consists of a rhodamine-loaded poly (methylmethacrylate-co-methacrylic acid) nanoparticle functionalized with Cys5 dye-modified short oligonucleotides. The Authors have shown, that the rhodamine dyes donate the energy to Cy5 acceptors via FRET process resulting in the strong red-light emission at 670 nm. Upon hybridization with a target nucleic acid, the FRET process is blocked and restoration of the green emission signal from the nanoantenna is observed. The Authors have achieved an excellent LOD = 5 and 0.25 pM, for the operation in solution and on the surface of a single particle, respectively.

The group of Tang has assembled the gold nanoparticles (AuNPs) with a bi-molecular beacon molecules (bi-MBs) for mRNA detection in breast cancer cells (Qiao et al., 2011). The molecular beacons for identification of Sur mRNA and cyclin D1 mRNA were labeled with FITC and Cy5, respectively. The tests have shown that the AuNP/bi-MB probes can be used for simultaneous detection of the expression of cancer genes in SK-BR-3 cells.

2.6. Detection of Sur in exosomes and circulating tumor cells (CTCs)

Survivin localizes in cytoplasm, mitochondria and the nucleus.

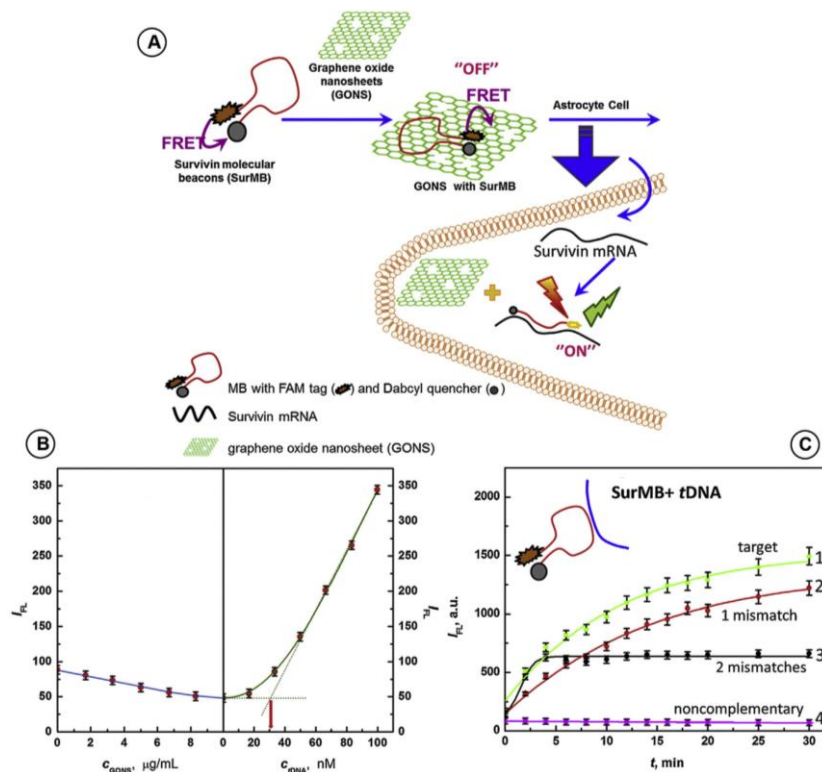


Fig. 10. (A) Schematic view of formation and delivery of GONS@SurMB to the astrocyte cells to detect survivin mRNA. (B) GONS quenching and target binding characteristics; (C) Isothermal fluorescence emission transients: (1) S₁ perfect complement to SurMB loop, (2) S₁₋₁ strand with a single mismatch, (3) S₁₋₂ strand with a double mismatch; (4) S_n non-complementary strand; C_{DNA} [nM]: from 0 to 100; Adopted with permission from (Stobiecka et al., 2016b).

Recently, the Wall's group has shown that survivin is released from cancer cells, such as HeLa (Khan et al., 2011) and prostate cancer patient plasma (Khan et al., 2012) via exosomes. Kreger et al. have demonstrated that the treatment of highly aggressive MDAMB231 breast cancer cells with paclitaxel induced the formation of exosomes enriched with survivin (Kreger et al., 2016). Also, the flow cytometry images indicate that the serum-derived exosomes from patients with malignant gliomas contain Sur protein on their surface (Galbo et al., 2017) (Fig. 11).

In addition to exosomes, survivin was also detected in circulating tumor cells (CTCs). Therefore, the analysis of CTCs can provide valuable information for the prediction of metastasis and recurrence of cancers, such as the gastric and colorectal cancer (Yie et al., 2008), non-small cell lung cancer (Yie et al., 2009) and breast cancer (Yie et al., 2006). These results confirm that the exosomes and CTCs offer a great potential for clinical diagnostics and therapy by investigations of cancer biomarkers without invasive biopsies.

3. Conclusions

A remarkable progress in the development of various types of biosensors and biosensing systems for the detection of survivin protein and survivin mRNA observed recently has become the basis for a new potential approach for advancing our ability to a widespread early cancer screening. Since the Sur biomarkers are so ubiquitous and are expressed

in all types of cancers, the ability to inexpensively perform an early cancer screening is a promising direction enabling the selection of an appropriate therapeutic intervention for the increased survivability rate and reduced overall mortality. Since the expressed survivin has also been found in CTCs and exosomes, the biosensing platforms may become, in not too distant future, the leading technology for the non-invasive early cancer detection. The importance of detecting Sur biomarkers in exosomes and circulating tumor cells is associated with metastasis of tumors which is the key challenge to be dealt with and the main cause of the high mortality rate.

In the development of future biosensing platforms for the detection of Sur protein and Sur mRNA, special attention has to be paid to the high sensitivity, robustness, and biocompatibility. Among these, the sensitivity can further be increased by employing some of the recently developed amplifying multi-tier paradigms in which the basic detection process generates a product that is then detected by a higher-tier amplifying analytical detection process which generates in turn a new product with concentration related to the original analyte, and so on. In case of *in vivo* analysis, the biocompatibility of sensing process is of utmost importance, as the immunoresponse may be detrimental to the analysis, especially when longer term monitoring of analytes is required. Finally, the robustness is necessary due to the analysis of complex biological samples and in the absence of extensive separation procedures (which is usually the case in biosensor technologies), the minimized impact of the matrix is required. Novel detection modalities

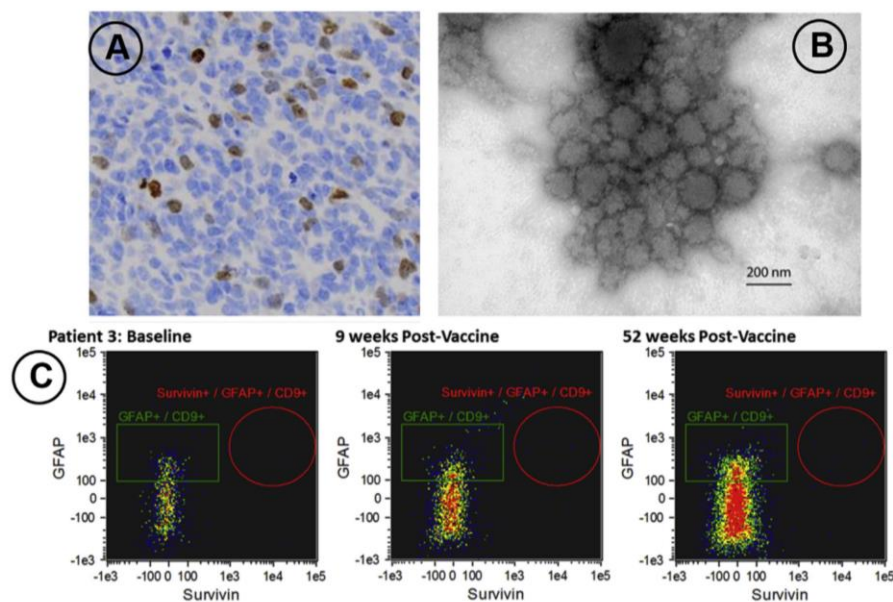


Fig. 11. (A) Immunohistochemical stains for survivin; (B) Electron microscopic image of exosomes isolated from the baseline serum sample; (C) Imaging flow cytometry plots of CD9+/GFAP+/Surv+ exosomes in patient with late tumor progression after the doses of survivin vaccine. Adopted with permission from (Galbo et al., 2017).

aiming at the enhancement of sensitivity and rapid response, such as those employing bio-gates, sub-monolayer protein gates, or logic gates, as well as the microfluidic-based and multi-sensor array-based detection systems offer an expanded field of biosensor technology for further development and utilization in early cancer screening.

In summary, the biosensors and biosensor arrays, self-standing or in form of microfluidic for the detection of survivin and other cancer markers are becoming a promising platform capable to advance our ability to diagnose cancer and help in selecting appropriate types of therapy. With early cancer screening, the survivin detection technology should see in near future a decrease in mortality rates for a range of cancer types.

Declaration of interests

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Conceptualization-MS, SJ; Funding acquisition -MS; Investigation-MS, KR, SJ; Project administration -MS, SJ; Supervision MS, SJ; Writing - original draft: MS, KR, SJ; Writing - review & editing MS, KR, SJ.

Acknowledgments

This research was supported by funding provided by the Program OPUS of the National Science Centre, Poland, Grant No. 2017/25/B/ST4/01362.

References

- Abreu, C.F.M., 2016a. Microfluidic isolation and characterisation of bladder cancer cells from urine for early and non-invasive diagnosis of bladder cancer. In: Conference Preceding, pp. 1–10.
- Abreu, C.F.M., 2016b. Microfluidic Isolation and Characterisation of Bladder Cancer Cells

- from Urine for Early and Non-invasive Diagnosis of Bladder Cancer. Biological Engineering. Instituto Superior Técnico, Portugal.
- Adinolfi, B., Carpi, S., Giannetti, A., Nieri, P., Pellegrino, M., Sotgiu, G., Tombelli, S., Trono, C., Varchi, G., Baldini, F., 2014. Complex nanostructures based on oligonucleotide optical switches and nanoparticles for intracellular mRNA sensing and silencing. *Procedia Eng.* 87, 751–754.
- Adinolfi, B., Pellegrino, M., Giannetti, A., Tombelli, S., Trono, C., Sotgiu, G., Varchi, G., Ballestri, M., Posati, T., Carpi, S., Nieri, P., Baldini, F., 2017. Molecular beacon-decorated polymethylmethacrylate-core-shell fluorescent nanoparticles for the detection of survivin mRNA in human cancer cells. *Biosens. Bioelectron.* 88, 15–24.
- Altieri, D., 2008a. New wirings in the survivin networks. *Oncogene* 27, 6276–6284.
- Altieri, D.C., 2001. The molecular basis and potential role of survivin in cancer diagnosis and therapy. *Trends Mol. Med.* 7, 542–547.
- Altieri, D.C., 2003. Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. *Oncogene* 22 (53), 8581–8589.
- Altieri, D.C., 2008b. Survivin, cancer networks and pathway-directed drug discovery. *Nat. Rev. Canc.* 8, 61–70.
- Ambrosini, G., Adida, C., Altieri, D.C., 1997. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat. Med.* 3, 917–921.
- Andersen, M.H., Svane, I.M., Becker, J.C., Straten, P.T., 2007. The universal character of the tumor-associated antigen survivin. *Clin. Cancer Res.* 13 (20), 5991–5994.
- Blanc-Brude, O.P., Mesri, M., Wall, N.R., Plescia, J., Dohi, T., Altieri, D.C., 2003. Therapeutic targeting of the survivin pathway in cancer: initiation of mitochondrial apoptosis and suppression of tumor-associated Angiogenesis¹. *Clin. Cancer Res.* 9, 2683–2692.
- Carpi, S., Fogli, S., Giannetti, A., Adinolfi, B., Tombelli, S., Pozzo, E.D., Vanni, A., Martinotti, E., Martini, C., Breschi, M.C., Pellegrino, M., Nieri, P., Baldini, F., 2014. Theranostic properties of a survivin-directed molecular beacon in human melanoma cells. *PLoS One* 9 (12), e114588.
- Chantalat, L., Skoufias, D., Klemm, J., Jung, B., Dideberg, O., Margolis, R., 2000. Crystal structure of human survivin reveals a bow tie-shaped dimer with two unusual alpha-helical extensions. *Mol. Cell* 6, 183–189.
- Chen, D., Xu, J., Zhang, Q., 2018. Detection of survivin expression in bladder cancer and renal cell carcinoma using specific monoclonal antibodies. *Oncol. Rep.* 39, 2817–2828.
- Chen, X., Duan, N., Zhang, C., Zhang, W., 2016. Survivin and tumorigenesis: molecular mechanisms and therapeutic strategies. *J. Cancer* 7, 314–323.
- Chiou, S.K., Jones, M.K., Tarnawski, A.S., 2003. Survivin - an anti-apoptosis protein: its biological roles and implications for cancer and beyond. *Med. Sci. Mon.* 9, P143–47.
- Chu, X.-Y., Chen, L.-B., Wang, J.-H., Su, Q.-S., Yang, J.-R., Lin, Y., Xue, L.-j., Liu, X.-B., Mo, X.-B., 2012. Overexpression of survivin is correlated with increased invasion and metastasis of colorectal cancer. *J. Surg. Oncol.* 105, 520–528.
- Dallaglio, K., Marconi, A., Pincelli, C., 2012. Survivin: a dual player in healthy and diseased skin. *J. Invest. Dermatol.* 132, 18–27.

- Dizdar, L., Tomczak, M., Werner, T.A., Safi, S.A., Riemer, J.C., Verde, P.E., Stoecklein, N.H., Knoefel, W.T., Krieg, A., 2017. Survivin and XIAP expression in distinct tumor compartments of surgically resected gastric cancer: XIAP as a prognostic marker in diffuse and mixed type Adenocarcinomas. *Oncol. Lett.* 14 (6), 6847–6856.
- Ebrahimiyan, H., Aslani, S., Rezaei, N., Jamshidi, A., Mahmoudi, M., 2018. Survivin and autoimmunity: the ins and outs. *Immunol. Lett.* 193, 14–24.
- Fan, Y., Chen, J., 2017. Clinicopathological significance of survivin expression in patients with cervical cancer: a systematic meta-analysis. *Bioengineered* 8, 511–523.
- Fangusaro, J.R., Caldas, H., Jiang, Y., Altura, R.A., 2006. Survivin: an inhibitor of apoptosis in pediatric cancer. *Pediatr. Blood Canc.* 47 (1), 4–13.
- Ferrario, A., Rucker, N., Wong, S., Luna, M., Gomer, C.J., 2007. Survivin, a member of the inhibitor of apoptosis family, is induced by photodynamic therapy and is a target for improving treatment response. *Cancer Res.* 67, 4989–4995.
- Frassanito, M.A., Saltarella, I., Vinella, A., Muzio, L.L., Pannone, G., Fumarolo, R., Vacca, A., Mariggiò, M.A., 2019. Survivin overexpression in head and neck squamous cell carcinomas as a new therapeutic target (Review). *Oncol. Rep.* 41, 2615–2624.
- Fu, S., Cai, J., Tu, Z., Wang, Y., Deng, L., Liang, Z., Lin, Z., Gong, X., 2008. Detection of Survivin mRNA in nasopharyngeal carcinoma by real-time fluorescence quantitative RT-PCR*. *Chin. Ger. J. Clin. Oncol.* 7, P523–P526.
- Galbo Jr., P.M., Ciesielski, M.J., Figel, S., Maguire, O., Qiu, J., Wiltsie, L., Minderman, H., Fenstermaker, R.A., 2017. Circulating CD9 + /GFAP + /survivin + exosomes in malignant glioma patients following survivin vaccination. *Oncotarget* 8, 114722–114735.
- Garg, H., Suri, P., Gupta, J.C., Talwar, G.P., Dubey, S., 2016. Survivin: a unique target for tumor therapy. *Cancer Cell Int.* 16 (49), 1–14.
- Ghadimi, M.P., Young, E.D., Belousov, R., Zhang, Y., Lopez, G., Lusby, K., Kivlin, C., Demicco, E.G., Creighton, C.J., Lazar, A.J., Pollock, R.E., Lev, D., 2012. Survivin is a viable target for the treatment of malignant peripheral nerve sheath tumors. *Clin. Cancer Res.* 18, 2545–2557.
- Giannetti, A., Barucci, A., Cosi, F., Pelli, S., Tombelli, S., Trono, C., Baldini, F., 2015. Optical fiber nanotips coated with molecular beacons for DNA detection. *Sensors* 15, 9666–9680.
- Gleichenhagen, J., Arndt, C., Casjens, S., Meinig, C., Gerullis, H., Raiko, I., Brüning, T., Ecke, T., Johnen, G., 2018. Evaluation of a new survivin ELISA and UBC⁺ rapid for the detection of bladder cancer in urine. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 226.
- Han, S., Li, L., Jia, X., Ou, W., Ma, J., Wang, H., Zhao, J., Zhu, Q., 2012. A molecular beacon-based method for screening cervical cancer. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 12 (11), 8282–8286.
- He, X., Yang, K., Wang, H., Chen, X., Wu, H., Yao, L., Ma, S., 2018. Expression and clinical significance of survivin in ovarian cancer: a meta-analysis. *PLoS One* 13, e0194463.
- Islam, A., Kageyama, H., Takada, N., Kawamoto, T., Takayasu, H., Isogai, E., Ohira, M., Hashizume, K., Kobayashi, H., Kaneko, Y., Nakagawara, A., 2000. High expression of Survivin, mapped to 17q25, is significantly associated with poor prognostic factors and promotes cell survival in human neuroblastoma. *Oncogene* 19, 617–623.
- Jakubowska, K., Pryczynicz, A., Dymicka-Piekarska, V., Famulski, W., Guzińska-Ustymowicz, K., 2016. Immunohistochemical expression and serum level of survivin protein in colorectal cancer patients. *Oncol. Lett.* 12 (5), 3591–3597.
- Jin, P.Y., Zheng, Z.H., Lu, H.J., Yan, J., Zheng, G.H., Zheng, Y.L., Wu, D.M., Lu, J., 2019. Roles of β -catenin, TCF-4, and survivin in nasopharyngeal carcinoma: correlation with clinicopathological features and prognostic significance. *Cancer Cell Int.* 19, 48.
- Jin, Y., Chen, J., Feng, Z., Fan, W., Wang, Y., Li, J., Tong, D., 2014. The expression of Survivin and NF- κ B associated with prognostically worse clinicopathologic variables in hepatocellular carcinoma. *Tumor Biol.* 35, 9905–9910.
- Johnson, M.E., Howerth, E.W., 2004. Survivin: a bifunctional inhibitor of apoptosis protein. *Vet. Pathol.* 41 (6), 599–607.
- Kanwar, J.R., Kamalapuram, S.K., Kanwar, R.K., 2011. Targeting survivin in cancer: the cell-signalling perspective. *Drug Discov. Today* 16, 485–494.
- Kappler, M., Kotsch, M., Bartel, F., Fussel, S., Lautenschlager, C., Schmidt, U., Wurl, P., Bache, M., Schmidt, H., Taubert, H., Meyer, A., 2003. Elevated expression level of survivin protein in soft-tissue sarcomas is a strong independent predictor of Survival¹. *Clin. Cancer Res.* 9, 1098–1104.
- Khan, S., Aspe, J.R., Asumen, M.G., Almaguel, F., Odumoso, O., Acevedo-Martinez, S., Leon, M.D., Langridge, W.H.R., Wall, N.R., 2009. Extracellular, cell-permeable survivin inhibits apoptosis while promoting proliferative and metastatic potential. *Br. J. Canc.* 100, 1073–1086.
- Khan, S., Jutzy, J.M., Aspe, J.R., McGregor, D.W., Neidigh, J.W., Wall, N.R., 2011. Survivin is released from cancer cells via exosomes. *Apoptosis* 16, 1–12.
- Khan, S., Jutzy, J.M.S., Valenzuela, M.M.A., Turay, D., Aspe, J.R., Ashok, A., Mirshahidi, S., Mercola, D., Lilly, M.B., Wall, N.R., 2012. Plasma-derived exosomal survivin, a plausible biomarker for early detection of prostate cancer. *PLoS One* 7, e46737.
- Konopka, K., Spain, C., Yen, A., Overlind, N., Gebremedhin, S., Duzgunes, N., 2009. Correlation between the level of survivin and survivin promoter-driven gene expression in cancer and non-cancer cells. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 14, 70–89.
- Kreger, B.T., Johansen, E.R., Cerione, R.A., Antonyak, M.A., 2016. The enrichment of survivin in exosomes from breast cancer cells treated with paclitaxel promotes cell survival and chemoresistance. *Cancers* 8, 111.
- Li, D., Hu, C., Li, H., 2018. Survivin as a novel target protein for reducing the proliferation of cancer cells. *Biomed. Rep.* 8, 399–406.
- Li, W., Luo, S., Ma, G., Wang, L., 2019. Impact of liver kinase B1 on p53 and survivin and its correlation with prognosis in gastric cancer. *Oncotargets Ther.* 12, 1439–1445.
- Li, X.-M., Wang, L.-L., Luo, J., Wei, Q.-L., 2015. A dual-amplified electrochemical detection of mRNA based on duplex-specific nuclease and bio-bar-code conjugates. *Biosens. Bioelectron.* 65, 245–250.
- Li, X.L., Shan, S., Xiong, M., Xia, X.H., Xu, J.J., Chen, H.Y., 2013. On-chip selective capture of cancer cells and ultrasensitive fluorescence detection of survivin mRNA in a single living cell. *Lab Chip* 13, 3868–3875.
- Liu, A.-L., Zhong, G.-X., Chen, J.-Y., Weng, S.-H., Huang, H.-N., Chen, W., Lin, L.-Q., Lei, Y., Fu, F.-H., Sun, Z.-L., Lin, X.-H., Lin, J.-H., Yang, S.-Y., 2013a. A sandwich-type DNA biosensor based on electrochemical co-reduction synthesis of graphene-three dimensional nanostructure gold nanocomposite films. *Anal. Chim. Acta* 767, 50–58.
- Liu, J., Zhou, H., Xu, J.-J., Chen, H.-Y., 2013b. Dual-biomarker-based logic-controlled electrochemical diagnosis for prostate cancers. *Electrochem. Commun.* 32, 27–30.
- Liu, J., Zhou, H., Xu, J.J., Chen, H.Y., 2012. Switchable 'On-Off-On' electrochemical technique for direct detection of survivin mRNA in living cells. *Analyst* 137, 3940–3945.
- Lorenzetti, M.A., Mosna, M.J., Matteo, E.N.D., Lombardi, M.G., Colli, S.L., Preciado, M.V., 2019. Overexpression of survivin in pediatric Hodgkin lymphoma tumor cells: characterization of protein expression and splice-variants transcription profile. *Exp. Mol. Pathol.* 108, 24–31.
- Mazur, J., Roy, K., Kanwar, J.R., 2018. Recent advances in nanomedicine and survivin targeting in brain cancers. *Nanomedicine (Lond.)* 13 (1), 105–137.
- Melnychuk, N., Klymchenko, A.S., 2018. DNA-functionalized dye-loaded polymeric nanoparticles: ultrabright FRET platform for amplified detection of nucleic acids. *J. Am. Chem. Soc.* 140, 10856–10865.
- Mita, A.C., Mita, M.M., Nawrocki, S.T., Giles, F.J., 2008. Survivin: key regulator of mitosis and apoptosis and novel target for cancer therapeutics. *Clin. Cancer Res.* 14 (16), 5000–5005.
- Mobahat, M., Narendran, A., Riabowol, K., 2014. Survivin as a preferential target for cancer therapy. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 2494–2516.
- Muchmore, S., Chen, J., Jakob, C., Zakula, D., Matayoshi, E., Wu, W., Zhang, H., Li, F., Ng, S., Altieri, D., 2000. Crystal structure and mutagenic analysis of the inhibitor-of-apoptosis protein survivin. *Mol. Cell* 6, 173–182.
- Nguyen, H.M., Dao, M.Q., La, H.T., 2019. Performance of Survivin mRNA as a Biomarker for Breast Cancer Among Vietnamese Women. *Breast Dis.* pre-press, pp. 1–6.
- Nitin, N., Santangelo, P.J., Kim, G., Nie, S., Bao, G., 2004. Peptide-linked molecular beacons for efficient delivery and rapid mRNA detection in living cells. *Nucleic Acids Res.* 32, e58.
- Olie, R., Simões-Wüst, A., Baumann, B., Leech, S., Fabbro, D., Stahel, R., Zangemeister-Wittke, U., 2000. A novel antisense oligonucleotide targeting survivin expression induces apoptosis and sensitizes lung cancer cells to chemotherapy. *Cancer Res.* 60, 2805–2809.
- Peng, X.-H., Cao, Z.-H., Xia, J.-T., Carlson, G.W., Lewis, M.M., Wood, W.C., Yang, L., 2005. Real-time detection of gene expression in cancer cells using molecular beacon imaging: new strategies for cancer research. *Cancer Res.* 65, 1909–1917.
- Pennati, M., Folini, M., Zaffaroni, N., 2008. Targeting survivin in cancer therapy. *Expert Opin. Ther. Targets* 12, 463–476.
- Piao, Y., Liu, F., Seo, T.S., 2012. A novel molecular beacon bearing a graphite nanoparticle as a nanoquencher for in situ mRNA detection in cancer cells. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 4, 6785–6789.
- Qiao, G., Gao, Y., Li, N., Yu, Z., Zhuo, L., Tang, B., 2011. Simultaneous detection of intracellular tumor mRNA with Bi-color imaging based on a gold nanoparticle/molecular beacon. *Chem. Eur. J.* 17, 11210–11215.
- Ratajczak, K., Krazinski, B.E., Kowalczyk, A.E., Dworakowska, B., Jakiela, S., Stobiecka, M., 2018a. Hairpin-hairpin molecular beacon interactions for detection of survivin mRNA in malignant SW480 cells. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 10, 17028–17039.
- Ratajczak, K., Krazinski, B.E., Kowalczyk, A.E., Dworakowska, B., Jakiela, S., Stobiecka, M., 2018b. Optical biosensing system for the detection of survivin mRNA in colorectal cancer cells using a graphene oxide carrier-bound oligonucleotide molecular beacon. *Nanomaterials* 8, 510.
- Ryan, B.M., O'Donovan, N., Duffy, M.J., 2009. Survivin: a new target for anti-cancer therapy. *Cancer Treat. Rev.* 35, 553–562.
- Rödel, F., Sprenger, T., Kaina, B., Liersch, T., Rödel, C., Fulda, S., Hehlhans, S., 2012. Survivin as a prognostic/predictive marker and molecular target in cancer therapy. *Curr. Med. Chem.* 19 (22), 3679–3688.
- Sah, N.K., Khan, Z., Khan, G.J., Bisen, P.S., 2006. Structural, functional and therapeutic biology of survivin. *Cancer Lett.* 244, 164–171.
- Santangelo, P.J., Nix, B., Tsourkas, A., Bao, G., 2004. Dual FRET molecular beacons for mRNA detection in living cells. *Nucleic Acids Res.* 32, e57.
- Sarela, A.I., Macadam, R.C.A., Farnery, S.M., Markham, A.F., Guilloua, P.J., 2000. Expression of the antiapoptosis gene, survivin, predicts death from recurrent colorectal carcinoma. *Gut* 46, 645–650.
- Schimmer, A.D., 2004. Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice. *Cancer Res.* 64, 7183–7190.
- Seferos, D.S., Giljohann, D.A., Hill, H.D., Prigodich, A.E., Mirkin, C.A., 2007. Nano-flares: probes for transfection and mRNA detection in living cells. *J. Am. Chem. Soc.* 129, 15477–15479.
- Smolewski, P., Robak, T., 2011. Inhibitors of apoptosis proteins (IAPs) as potential molecular targets for therapy of hematological malignancies. *Curr. Mol. Med.* 11 (8), 633–649.
- Stobiecka, M., Chalupa, A., 2015. Modulation of plasmon-enhanced resonance energy transfer to gold nanoparticles by protein survivin channelled-shell gating. *J. Phys. Chem. B* 119 (41), 13227–13235.
- Stobiecka, M., Chalupa, A., 2016. DNA strand replacement mechanism in molecular beacons encoded for the detection of cancer biomarkers. *J. Phys. Chem. B* 120, 4782–4790.
- Stobiecka, M., Chalupa, A., Dworakowska, B., 2016a. Piezometric biosensors for anti-apoptotic protein survivin based on buried positive-potential barrier and immobilized monoclonal antibodies. *Biosens. Bioelectron.* 84, 37–43.
- Stobiecka, M., Dworakowska, B., Jakiela, S., Lukasiak, A., Chalupa, A., Zembrzycki, K., 2016b. Sensing of survivin mRNA in malignant astrocytes using graphene oxide nanocarrier-supported oligonucleotide molecular beacons. *Sensor. Actuator. B* 235, 136–145.

- Su, C., 2016. Survivin in survival of hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* 379, 184–190.
- Turan, G., Usta, C.S., Usta, A., Kanter, M., Tavli, L., Karacan, M., Celik, C., Eser, M., 2014. The expression of HER-2/neu (c-erbB2), survivin and cycline D1 in serous ovarian neoplasms: their correlation with clinicopathological variables. *J. Mol. Histol.* 45, 679–687.
- Verdecia, M., Huang, H., Dutil, E., Kaiser, D., Hunter, T., Noel, J., 2000. Structure of the human anti-apoptotic protein survivin reveals a dimeric arrangement. *Nat. Struct. Biol.* 7, 602–608.
- Wang, J., Li, X.-L., Zhang, J.-D., Hao, N., Xu, J.-J., Chen, H.-Y., 2015. Integration of DNA bio-gates and duplex-specific nuclease signal amplification: towards electrochemiluminescence detection of survivin mRNA. *Chem. Commun.* 51, 11673–11676.
- Wang, T., Liu, Z., Zhang, Z., Tang, S., Yue, M., Feng, S., Hu, M., Xuan, L., Chen, Y., 2017. Evaluation of antitumor activity of survivin short interfering RNA delivered by lipid nanoparticles in colon cancer *in vitro* and *in vivo*. *Oncol. Lett.* 14 (2), 2001–2008.
- Wang, Z.-q., Zhao, J., Zeng, J., Wu, K.-j., Chen, Y.-l., Wang, X.-y., Chang, L.S., He, D.-l., 2011. Specific survivin dual fluorescence resonance energy transfer molecular beacons for detection of human bladder cancer cells. *Acta Pharmacol. Sin.* 32, 1522–1528.
- Wheatley, S.P., Altieri, D.C., 2019. Survivin at a glance. *J. Cell Sci.* 132, jcs223826.
- Wolanin, K., Piwocka, K., 2007. Role of survivin in mitosis. *Postepy Biochem.* 53 (1), 10–18.
- Xu, X., Li, P., Fu, D., Wei, Z., Xu, S., Xu, F., Tian, F., Ge, J., Zhang, Z., Cheng, W., 2018. Combined use of urinary Survivin detection and liquid-based cytology for the early diagnosis of bladder urothelial carcinoma. *Oncol. Lett.* 15, 7739–7743.
- Xue, Y., An, R., Zhang, D., Zhao, J., Wang, X., Yang, L., He, D., 2011. Detection of survivin expression in cervical cancer cells using molecular beacon imaging: new strategy for the diagnosis of cervical cancer. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 159, 204–208.
- Yang, J.H., Zhang, Y.-C., Qian, H.Q., 2004. Survivin antisense oligodeoxynucleotide inhibits growth of gastric cancer cells. *World J. Gastroenterol.* 10, 1121–1124.
- Yang, L., Cao, Z., Lin, Y., Wood, W.C., Staley, C.A., 2005. Molecular beacon imaging of tumor marker gene expression in pancreatic cancer cells. *Cancer Biol. Ther.* 4, 561–570.
- Yang, L., Cao, Z., Yan, H., Wood, W., 2003. Coexistence of high levels of apoptotic signaling and inhibitor of apoptosis proteins in human tumor cells: implication for cancer specific therapy. *Cancer Res.* 63, 6815–6824.
- Yang, Y., Xu, J., Zhang, Q., 2018. Detection of urinary survivin using a magnetic particles-based chemiluminescence immunoassay for the preliminary diagnosis of bladder cancer and renal cell carcinoma combined with LAPTM4B. *Oncol. Lett.* 15, 7923–7933.
- Yie, S.M., Lou, B., Ye, S.R., Cao, M., He, X., Li, P., Hu, K., Rao, L., Wu, S.M., Xiao, H.B., Gao, E., 2008. Detection of survivin-expressing circulating cancer cells (CCCs) in peripheral blood of patients with gastric and colorectal cancer reveals high risks of relapse. *Ann. Surg. Oncol.* 15, 3073–3082.
- Yie, S.M., Lou, B., Yeb, S.R., He, X., Cao, M., Xie, K., Ye, N.Y., Lin, R., Wu, S.M., Xiao, H.B., Gao, E., 2009. Clinical significance of detecting survivin-expressing circulating cancer cells in patients with non-small cell lung cancer. *Lung Canc.* 63, 284–290.
- Yie, S.M., Luo, B., Ye, N.Y., Xie, K., Ye, S.R., 2006. Detection of Survivin-expressing circulating cancer cells in the peripheral blood of breast cancer patients by a RT-PCR ELISA. *Clin. Exp. Metastasis* 23, 279–289.

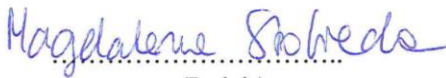
Warszawa, 23.10.2024

Magdalena Stobiecka
magdalena_stobiecka@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Nauki Biologiczne
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy M. Stobiecka, K. Ratajczak, S. Jakiela, (2019) Toward early cancer detection: Focus on biosensing systems and biosensors for an anti-apoptotic protein survivin and survivin mRNA, *Biosensors and Bioelectronics*, 137, 58-71 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu koncepcji, pisaniu oraz edycji manuskryptu, odpowiedziach na recenzje, a także pozyskaniu finansowania.


(Podpis)

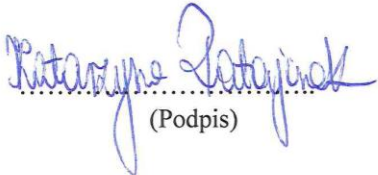
Warszawa, 23.10.2024

Katarzyna Ratajczak
katarzyna_ratajczak@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Nauki Biologiczne
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy M. Stobiecka, K. Ratajczak, S. Jakiela, (2019) Toward early cancer detection: Focus on biosensing systems and biosensors for an anti-apoptotic protein survivin and survivin mRNA, *Biosensors and Bioelectronics*, 137, 58-71 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na przeglądzie i zebraniu przedmiotowej literatury, pisaniu i edycji wstępnej oraz ostatecznej wersji manuskryptu, a także odpowiedziach na recenzje.


.....
(Podpis)

Warszawa, 23.10.2024

Sławomir Jakiela
slawomir_jakiela@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Nauki Biologiczne
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy M. Stobiecka, K. Ratajczak, S. Jakiela, (2019) Toward early cancer detection: Focus on biosensing systems and biosensors for an anti-apoptotic protein survivin and survivin mRNA, *Biosensors and Bioelectronics*, 137, 58-71 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu koncepcji, pisaniu oraz edycji manuskryptu, a także odpowiedziach na recenzje.

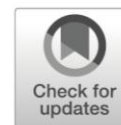

.....
(Podpis)

PUBLIKACJA 4

Monitoring of dynamic ATP level changes by oligomycin-modulated ATP synthase inhibition in SW480 cancer cells using fluorescent “On-Off” switching DNA aptamer

Ratajczak K., Łukasiak A., Grel H., Dworakowska B., Jakiela S., Stobiecka M.

Analytical and Bioanalytical Chemistry, (2019) 411(26), 6899-6911,



Monitoring of dynamic ATP level changes by oligomycin-modulated ATP synthase inhibition in SW480 cancer cells using fluorescent “On-Off” switching DNA aptamer

Katarzyna Ratajczak¹ · Agnieszka Lukasiak¹ · Hubert Grel¹ · Beata Dworakowska¹ · Sławomir Jakiela¹ · Magdalena Stobiecka¹

Received: 5 June 2019 / Revised: 22 July 2019 / Accepted: 31 July 2019 / Published online: 12 August 2019
© The Author(s) 2019

Abstract

Adenosine triphosphate (ATP) is the main energy source in cells and an important biomolecule participating in cellular reactions in living organisms. Since the ATP level changes dynamically reflecting the development of a debilitating disease or carcinogenesis, we have focused in this work on monitoring of the oligomycin (OMC)-modulated ATP synthase inhibition using a fluorescent-switching DNA aptamer designed for the detection of ATP (Apt(ATP)), as the model for studies of dynamic ATP level variation. The behavior of the ATP aptamer has been characterized using fluorescence spectroscopy. The Intramolecular fluorescence resonance energy transfer (iFRET) operates in the proposed aptamer from the FAM dye moiety to guanines of the aptamer G-quadruplex when the target ATP is present and binds to the aptamer changing its conformation. The iFRET process enables the detection of ATP down to the limit of detection, LOD = 17 μ M, without resorting to any extra chemi-amplification schemes. The selectivity coefficients for relevant interferent triphosphates (UTP, GTP, and CTP) are low for the same concentration as that of ATP. We have demonstrated an efficient transfection of intact cells and OMC-treated SW480 colon cancer cells with Apt(ATP), using microscopic imaging, iFRET measurements, and cell viability testing with MTT method. The applicability of the switching DNA aptamer for the analysis of real samples, obtained by lysis of SW480 cells, was also tested. The proposed Apt(ATP) may be considered as a viable candidate for utilization in measurements of dynamic ATP level modulation in cells in different stages of cancer development and testing of new drugs in pharmacological studies.

Keywords Adenosine triphosphate · ATP aptamer · Oligomycin · ATP synthase inhibition · Intramolecular fluorescence resonance energy transfer (iFRET) · Microscopic images

Introduction

Adenosine triphosphate (ATP) is the key molecular energy supplier for cellular reactions [1, 2]. The deviations in ATP level have been attributed to serious diseases, including

cardiovascular diseases [3], Huntington’s disease [4], hypoxia [5, 6], and inflammatory diseases [7]. The depletion of intracellular ATP level has been found to promote the necrosis pathway in cells over the apoptosis process [8–10]. On the other hand, the increased extracellular ATP level is characteristic for the tumor sites and its microenvironment [11–14]. Recently, it was also shown that the ATP acts as a hydrotrope to help solubilize hydrophobic proteins [15]. Therefore, monitoring of ATP content in living cells has become an important tool for characterization of cell homeostasis and assessment of ATP production in different stages of the diseases [16, 17]. Consequently, sensitive and inexpensive analytical methods for probing of intracellular ATP levels are highly desired.

Among many methods of ATP determination reviewed recently [14, 18–20], the methods based on ATP aptamer molecular beacons are the most convenient, sensitive, and

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00216-019-02061-0>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Sławomir Jakiela
slawomir_jakiela@sggw.pl

✉ Magdalena Stobiecka
magdalena_stobiecka@sggw.pl

¹ Department of Biophysics, Warsaw University of Life Sciences (SGGW), 159 Nowoursynowska Street, 02776 Warsaw, Poland

biocompatible. The unique features of aptamers are due to the inherent nucleic acid biorecognition ability and sensitive fluorescence resonance energy transfer (FRET) detection system [21]. Owing to these features, the aptamer molecular beacons find diverse applications in many fields. Recently, the fluorescein-labeled aptamer was utilized for the detection of one of the most toxic mycotoxins aflatoxin B₁ (AFB₁) [22]. AFB₁ was also detected by Ye and coworkers [23] using fluorescence polarization (FP) assay with graphene oxide for signal enhancement. Su et al. [24] have utilized the FAM-aptamer-G-quadruplex construct for the detection of organic compound melamine widely applied in manufacturing of plastics. Hence, the sensing platforms for ATP detection based on aptamers have been selected for this investigation.

The DNA and RNA sequences for specific ATP binding were first introduced by the Szostak's group [25, 26] in the 1990s. Since that time, numerous modifications of ATP aptamers with fluorescent or electrochemical tags were proposed for the design of biosensors [27], as well as the electro-luminescence [28] and chemiluminescence assays [29–31] for the detection of ATP. Exemplary aptasensors for sensitive detection of ATP down to pM range are presented in Table 1. With the variety of sensing systems available for ATP determination, the selection of the sensing platform depends largely on the conditions of the analysis. The methods offering ultra-high sensitivities may be useful when high sample dilution is required due to the biological matrix effects. However, for real-time sensing in cells, less sensitive but robust systems possibly based on a single probe molecule would be required. The latter approach is especially desired since the intracellular ATP content is often very high and can reach up to 150 mM [47].

Since a model system mimicking biochemical processes leading to ATP generation is required for monitoring of dynamic changes in ATP production assessment, we have developed a system based on SW480 colon cancer cells with modulation of ATP synthase inhibition by exogenous oligomycin (OMC). In cells, ATP is mainly produced by ATP synthase [48, 49]. This enzyme is also involved in the major pathway of proton flow into the mitochondrial matrix. To our knowledge, there are no publications on the effect of oligomycin (OMC) on ATP contents in living cells studied using fluorescent Apt(ATP) biosensing techniques. In recent studies, the ROS generation and uncoupling of the Warburg effect in SW480 cells have been achieved by treatment with a natural flavonoid morin [50] and a decrease in GSH and ATP levels have been found using HPLC analysis applied to cell lysate. A selective detection of ATP in mitochondria and lysosomes has been reported by Swamy et al. [51] using fluorescent probes of rhodamine derivatives with thiourea.

In the present work, our investigations have focused on exploring the utilization of fluorescent “On-Off” switching DNA aptamer for monitoring of ATP in untreated and OMC-treated SW480 cancer cells. In our aptaprobe designs,

we have employed a fluorescein (FAM)-labeled DNA aptamer (Apt(ATP)) without any further sensitivity amplification. The oligomycin-modulated ATP synthase inhibition was investigated using intramolecular fluorescence resonance energy transfer (iFRET), microscopic imaging, oxygen consumption measurements, and MTT viability test. In the presence of ATP, the aptamer changes conformation and binds with ATP forming an aptamer-ATP complex showing strong FAM fluorescence quenching due to the proximity to guanine nucleobase in the new aptamer conformation. We have analyzed the specificity and selectivity of the Apt(ATP) against interferents of similar structure, such as GTP, UTP, and CTP. The utility of the developed aptaprobe for detection of ATP in SW480 cell lysate samples was also evaluated. The proposed method has a potential for utilization in measurements of cellular ATP production in different stages of disease such as cancer development.

Materials and methods

Chemicals

Fluorescein (FAM)-labeled DNA aptamer for the recognition of ATP with the following sequence 5'-TCTCTCACCTGGGG GAGTATTGCGGAGGAAGGT-FAM-3' has been synthesized by the Laboratory of DNA Sequencing and Oligonucleotides Synthesis, Institute of Biochemistry and Biophysics of the Polish Academy of Sciences (IBB PAS, Warsaw, Poland). The purity of this oligonucleotide was tested with HPLC. Oligomycin A, adenosine 5'-triphosphate disodium salt hydrate grade I (ATP), guanosine triphosphate (GTP), cytidine 5'-triphosphate disodium salt (CTP), uridine 5'-triphosphate trisodium salt dehydrate (UTP), trizma hydrochloride (Tris-HCl), hydrogen peroxide solution (H₂O₂), magnesium chloride (MgCl₂), carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone (FCCP) and sodium chloride (NaCl), 0.25% Trypsin-EDTA solution were obtained from Sigma-Aldrich Chemical Company (St. Louis, MO, USA).

Fetal bovine serum (FBS) was obtained from Gibco (Rockville, MD, USA). Penicillin/streptomycin and Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) were obtained from the cell culture company PAA (Immuniq, Warsaw, Poland). All chemicals were of analytical grade purity. Aqueous solutions were prepared with freshly deionized water with 18.2 MΩ cm resistivity (Millipore, Poland). All concentrations of added reagents cited in this paper are final concentrations obtained after mixing, unless otherwise noted.

Apparatus

The fluorescence spectra were recorded using Spectrometer model LS55 (PerkinElmer, Waltham, MA, USA), with 20 kW pulsed Xenon light source and a photomultiplier tube

Table 1 Sensitive aptasensors for ATP detection

No.	Oligonucleotide sequence for ATP targeting	Linearity/LOD	Buffer	Method	Ref.
1	ADNA: 5'-TCA CAG ATG AGT TT-SH-3' RDNA: 5'-HS-CCC AGG TTC TCT-3' TRDNA: 5'-ACT CAT CTG TGA AGA GAA CCT GGG GGA GTA TTG CGG AAG GTT-3' ABA (5'-ACC TGG GGG AGT ATT GCG GAG GAA GGT-3') FTTC-labeled ABA (F-ABA, 5'-FTTC-ACC TGG GGG AGT ATT CCG GAG GAA GGT-3') 5'-CTCTCACCTGGGG GAGTATTCGGAGGAAAGGT-FAM-3'	Linear range 1 nM to 10 μM LOD = 0.2 nM	10 mM Tris-HCl, pH 7.4 + 50 μM [Ru(NH ₃) ₆] ³⁺	Electrochemical	[32]
2	5'-thiol-modified aptamer: 5'-TTT TTT ACC TGG GGG AGT ATT CCG GAG GAA GGT-3' 5'-HS-(CH ₂) ₆ -ACCTGGGGAGTATTGCCGAGAAGGT 5'-biotin-ACCTCTCCCG CAATACTCCCCAGGT	LOD = 50 nM	20 mM phosphate buffer solution (pH 7.4)	Colorimetric	[33]
3	5'-thiol-modified aptamer: 5'-TTT TTT ACC TGG GGG AGT ATT CCG GAG GAA GGT-3' 5'-HS-(CH ₂) ₆ -ACCTGGGGAGTATTGCCGAGAAGGT 5'-biotin-ACCTCTCCCG CAATACTCCCCAGGT	Linear range 10–800 nM LOD = 4.5 nM	20 mM Tris-HCl (146 mM NaCl, 5.0 mM KCl, 1.0 mM MgCl ₂ , pH 7.4)	Fluorimetric	[34]
4	5'-thiol-modified aptamer: 5'-TTT TTT ACC TGG GGG AGT ATT CCG GAG GAA GGT-3' 5'-HS-(CH ₂) ₆ -ACCTGGGGAGTATTGCCGAGAAGGT 5'-biotin-ACCTCTCCCG CAATACTCCCCAGGT	Linear range 0.2–10.0 μM LOD = 0.1 μM	16.0 mM Tris-HCl (15.0 mM KCl, 300.0 mM NaCl, pH 7.4)	Colorimetric	[35]
5	5'-thiol-modified aptamer: 5'-TTT TTT ACC TGG GGG AGT ATT CCG GAG GAA GGT-3' 5'-HS-(CH ₂) ₆ -ACCTGGGGAGTATTGCCGAGAAGGT 5'-biotin-ACCTCTCCCG CAATACTCCCCAGGT	Linear range 0.018–90.72 μM LOD = 6 nM	100 mM Na ₂ HPO ₄ + Na ₂ HPO ₄ , 5 mM MgCl ₂ , pH 7.4, and abbr. PBS+	Electrochemical	[36]
6	ATP binding aptamer: 5'-AACCTGGGGGAGT ATTGGCGAGGAA GGT-3' ABA: 5'-ACCTGGGGGA GTATTGGCGAGGAAAGGT-3' cDNA: 5'-NH ₂ -(CH ₂) ₆ -ACCTTCC TCCGCAATACTCCCCAGGT-3' Oligonucleotide 5'-TAACCCCTA ACCCCT-3'	Linear range 0.1–60 μM LOD = 33 nM	20 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl ₂ , and 300 mM NaCl, pH = 8.3	Fluorimetric	[37]
7	ATP-binding aptamer: 5'-AAC CTG GGG GAG TAT TGC GGA AGGT-3' Complementary strand: 5'-ACC TTC CTC CGC AAT ACT CCC CA GGT-3'	Linear range 100 nM–5 nM LOD = 14.2 nM	20 mM PBS; (100 mM NaCl, 10 mM KCl, 1 mM MgCl ₂ , pH 7.4)	Fluorimetric	[38]
8	DNA ₁ : 3'-SH-(CH ₂) ₆ -TGG AAG GAG GCG TTA TGA GGG GGT CCA-5' DNA ₂ : 3'-AA CGC CTC CTT CCA-FAM-5' MB-like DNA: 5'-HS-(CH ₂) ₆ -CCT CTC CGT GTC TTG TAC TTC CCG TCA GAG A GGBiotin-3'	Linear range 0.1–10 μM LOD = 33 nM	10 mM PBS pH 3.0	Fluorimetric	[39]
9	DNA ₁ : 3'-SH-(CH ₂) ₆ -TGG AAG GAG GCG TTA TGA GGG GGT CCA-5' DNA ₂ : 3'-AA CGC CTC CTT CCA-FAM-5' MB-like DNA: 5'-HS-(CH ₂) ₆ -CCT CTC CGT GTC TTG TAC TTC CCG TCA GAG A GGBiotin-3'	Linear range 0.5–50 μM LOD = 140 nM	20 mM Tris-HCl (2 mM MgCl ₂ , pH 8.3)	Fluorimetric	[40]
10	Oligo A: 5'-p-TAC AAG ACA C-3' Oligo B: 5'-GAC GGG AAG-3' ABA: 5'-ATGTCACCTGGGGAGTATT CGCGAAGGCTCTTA 3'	Linear range 0.1–10 μM LOD = 15.2 nM	10 mM PBS (0.1 M NaCl, pH = 7.0)	Fluorimetric	[41]
11	RDS: 5'-ATGTCACCTGGGGAGGCTCTGTA 3' PCS1: 5'-HS-(CH ₂) ₆ -TACAGACCTTCC 3' PCS2: 5'-CCAGGTGACAT-(CH ₂) ₆ -SH 3' ABA: 5'-HS-(CH ₂) ₆ -ACC TGG GGG AGT ATT CGC GAG GAA GGT-3' BCS: 5'-biotin-ACC TTC	Linear range 0.1–1000 nM LOD = 0.05 nM	20 mM Tris-HCl (5 mM MgCl ₂)	Electrochemical	[42]
12	CTC CGC AAT ACT CCC CCA GGT-3' Aptamer 1 (Apt 1): TTTTTTTTTTTTTTTTAC CTGGGGAGTAT Aptamer 2 (Apt 2): TC CGGAGGAAGGTT TTTTTTTTTTTTTTT	Linear range 0.1–100 nM LOD = 0.1 nM	25 mM Tris-HCl (100 mM NaCl, pH 8.2)	Electrochemical	[43]
13	TBA: 5'-GTGGTAGGCC AGGTTGGGGTGACT-3' cTBA: 5'-GTGTGTAGTCA CCCCACTGCC-3' ABA: 5'-ACCTGGGGAGTA TTGCGAGGAAGGT-3' cABA: 5'-CTTCTCTCCCAAT ACTCCCCCAAGGT-3'	Linear range 0.01–100 nM LOD = 0.01 nM	10 mM PBS (0.1 M KCl, 2 mM Fe(CN) ₆ ^{3-/4-} , pH 7.4)	Electrochemical	[44]
14	CTC CGC AAT ACT CCC CCA GGT-3' Aptamer 1 (Apt 1): TTTTTTTTTTTTTTTTAC CTGGGGAGTAT Aptamer 2 (Apt 2): TC CGGAGGAAGGTT TTTTTTTTTTTTTTT	Linear range 100 nM–100 μM LOD = 10.29 nM	10 mM Tris-HCl (10 mM MgCl ₂ , 50 mM NaCl, pH 7.9)	Fluorimetric	[45]
15	TBA: 5'-GTGGTAGGCC AGGTTGGGGTGACT-3' cTBA: 5'-GTGTGTAGTCA CCCCACTGCC-3' ABA: 5'-ACCTGGGGAGTA TTGCGAGGAAGGT-3' cABA: 5'-CTTCTCTCCCAAT ACTCCCCCAAGGT-3'	LOD = 23.4 nM	50 mM Tris-HCl (100 mM NaCl, 10 mM MgCl ₂ , pH 7.5)	Fluorimetric	[46]

detector. The excitation and emission slit widths were set to 5.0 nm and scan speed to 500 nm/min. The measurements were performed in 20 mM Tris-HCl buffer + 100 mM NaCl + 5 mM MgCl₂ solutions with pH 7.4. The excitation and emission wavelengths were set to $\lambda_{\text{ex}} = 480$ nm and $\lambda_{\text{em}} = 516$ nm, respectively.

The images of fluorescence emission of the aptamer probe from transfected cells were acquired with a Nikon Eclipse TE300 inverted light microscope with a B-2A fluorescence filter with a 30–50 nm bandwidth excitation filter, long-pass dichromatic mirror, and long-pass barrier filter. The images were recorded digitally using a Canon Power Shot A640 scope-mounted camera. All images were made with the same exposure. The images were then imported into Adobe Photoshop Elements 2019 for enhancement of lighting by adjusting the Levels function for green channel to clear the background below level 17 and saturating the high light above the level 141.

The cell oxygen consumption after addition of oligomycin to SW480 cell culture was measured at 37 °C using a Clark-type electrode and an Oroboros-2k high-resolution respirometer (Oroboros, Innsbruck, Austria).

The calculations of polymorphic structures of Apt(ATP)s, their folding energies, and melting temperatures were performed using the University of Albany web server DINAMelt providing the program UNAFold ver. 3.9 with a Quikfold application (RNA Institute, University of Albany, Albany, NY, USA).

Cell culture

The experiments with oligomycin-modulated ATP synthase inhibition were performed using SW480 cell line purchased from ATCC (LGC Standards Sp. z.o.o., Lomianki, Poland). The cells were cultured in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium) with added 10% FBS (fetal bovine serum, Gibco, Rockville, MD, USA) and were maintained in a humidified air atmosphere containing 5% CO₂ at 37 °C (Shel Lab Model 2123-TC CO₂ Incubator Cornelius, OR, USA). Every 2–3 days, the cells were further subcultured. The cells remaining after the experiments were handled according to safety protocols.

Cells transfection with Apt(ATP) @LIP

Transfection experiments were conducted on SW480 cells using commercial transfer agents Lipofectamine® LTX and PLUS™ Reagent (Life Technologies, USA) which formed liposomes able to cross a cell membrane. In the presence of Apt(ATP), these agents formed liposomes loaded with ATP aptamer (Apt(ATP)@LIP). To deliver ATP aptamers into the SW 480 cells, 521 μ L of transfection solution containing aptamer, Lipofectamine, Plus Reagent solutions, and

DMEM were added to the cells (1.6×10^5 cells/mL), so that the final concentration of aptamer was 49 nM. Different concentrations of oligomycin (final concentration 1 or 5 μ M) were added to the cells 20 h before the transfection of cells with Apt(ATP)@LIP. After adding the transfection solution, cells were incubated for 2 h at 37 °C, followed by washing and resuspension in the DMEM (3.5 mL) and recording of cell images. Next, a trypsin solution was added (0.5 mL, 0.25% solution) to detach cells and fluorescence measurements were performed. For the data collection and analysis, a PerkinElmer FL WinLab™ software was used.

Cell viability

MTT test was performed to determine the cell viability following transfection of SW480 cells with ATP synthase inhibitor, oligomycin (OMC). Typically, cells (1.6×10^5 cells/mL) were incubated in 2 mL culture medium containing OMC with different concentrations (0, 0.3, 1, and 5 μ M) for 20 h. After the incubation, an aliquot of 100 μ L of 5 mg/mL of yellow MTT reagent was added to the SW480 cells in a CO₂ incubator. The tetrazolium salt MTT is reduced in the mitochondria of metabolically active cells to a formazan product enabling to evaluate the cells' viability. After 3 h of exposure, the cells were detached from the culture dish by trypsin and centrifuged at 153 rcf to pellet the cells. Then, 1500 μ L of a lysis buffer containing dimethyl sulfoxide and ethanol (DMSO: EtOH = 1:1) was added to 500 μ L of cell suspension to dissolve the insoluble purple formazan product. After 15 min of incubation at 37 °C, the samples were diluted with Tris-HCl buffer and absorbance measurements at 570 nm were performed.

Measurements of oxygen consumption

The measurements of oxygen consumption after the addition of oligomycin were performed using the procedure reported earlier [52]. Briefly, after trypsinization, SW480 cells were harvested by centrifugation at 200g for 5 min, resuspended in serum-free culture medium at a concentration of 1×10^6 cells/mL, and placed in testing chambers.

The solutions of oligomycin tested (0.3 μ M and 1 μ M) were added to the chambers after the respiratory flux had been stabilized. Next, after the mitochondrial oxygen consumption depletion, FCCP (1 μ M) was added as a positive control to uncouple oxidative phosphorylation. Results are presented as means $\pm$ S.E.M. Paired *t* tests were performed to evaluate the differences before and after addition of compounds. A value of $P < 0.05$ was accepted as being significant. The number of experiments ($n = 3$) means three separate experiments.

Cell lysis

To obtain the cells lysate, ca. 1.6×10^5 cells/mL were washed with PBS buffer and 1 mL of trypsin was added for 15 min at 37 °C for detaching of cells from the culture dish. Then, the centrifugation at 1600 rpm for 10 min was performed and the supernatant was discarded. Then, 1000 μ L of a solubilization solution containing 20% (w/v) SDS (200 mg/mL), 50% (v/v) DMF (36.55 mg/mL), 2% (v/v) acetic acid, and 25 mM HCl was added. Next, 10 μ L of cell lysate with final dilution 1:300 was added to measurement buffer (20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) with Apt(ATP). Then different concentrations of ATP (33.3, 66.7, 100, and 133.3 μ M ATP, final concentration) were added and fluorescence measurements at excitation wavelength $\lambda_{\text{ex}} = 480$ nm were performed.

Results and discussion

Detection of ATP using fluorescent ATP aptamer

The mechanism of operation of ATP aptamer (Apt(ATP)) is depicted in Fig. 1a. In the presence of ATP, the aptamer binds with ATP forming an aptamer-ATP complex, and exhibits strong FAM fluorescence quenching by intramolecular

fluorescence resonance energy transfer (iFRET). In a Tris-HCl buffer solution of pH 7.4, corresponding to the intracellular pH of SW480 cells, the Apt(ATP) shows a fluorescence emission with maximum at $\lambda_{\text{em}} = 516$ nm for excitation at $\lambda_{\text{ex}} = 480$ nm, as illustrated in Fig. 1b, curve 1. Upon the addition of adenosine triphosphate solution (Fig. 1b, curves 2 to 11), the fluorescence signal of Apt(ATP) is strongly quenched due to the expected interactions of Apt(ATP) with ATP. The conformation of Apt(ATP) is changed and iFRET from the FAM dye moiety to guanines of the aptamer G-quadruplex occurs. The quenching efficiency approaches 67%, as the ATP emission intensity decreases steadily with increasing C_{ATP} from $I_{\text{FL},0} = 898.2$ a.u. to $I_{\text{FL},11} = 295.5$ a.u. (Fig. 1c). The quenching function $I_{\text{FL},0}/I_{\text{FL}}$ is linear for the concentration range from 0 to 333 μ M ATP as indicated in the Stern-Volmer plot in Fig. 1d. The slope of the fitting line in this figure represents the quenching constant K_{SV} , according to the Stern-Volmer equation:

$$I_{\text{FL},0}/I_{\text{FL}} = 1 + K_{\text{SV}} C_{\text{Q}} \quad (1)$$

where the quencher concentration C_{Q} is given by the concentration of ATP: $C_{\text{Q}} = C_{\text{ATP}}$. The value of K_{SV} determined from the experimental data is $K_{\text{SV}} = (5.7 \pm 0.2) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$.

The limit of detection LOD for adenosine triphosphate, determined by iFRET from the dependence of fluorescence

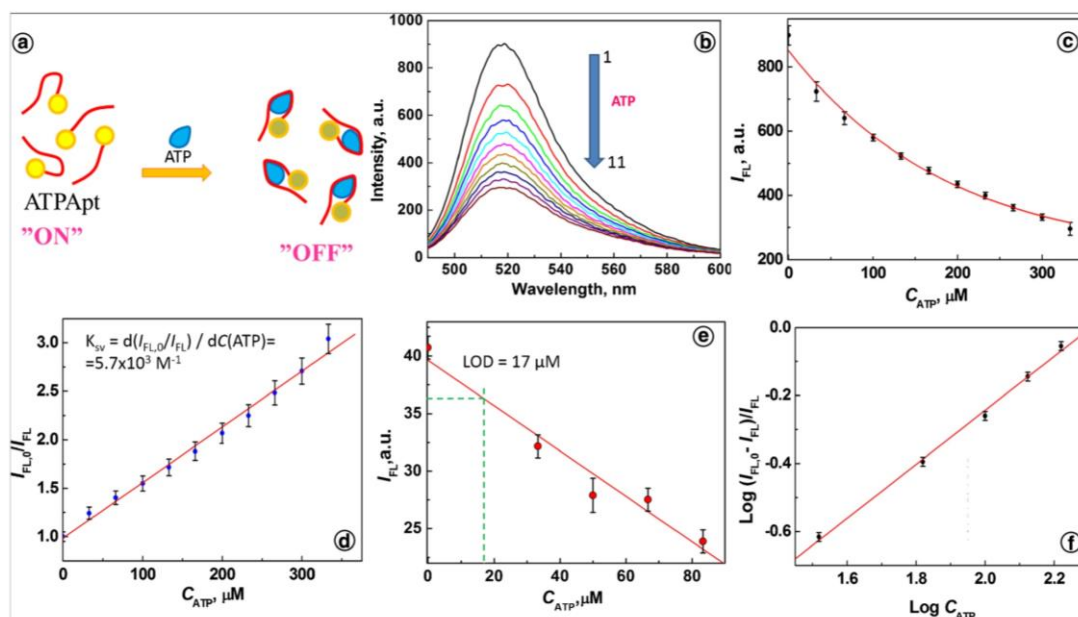


Fig. 1 a Principle of ATP aptamer operation. b Fluorescence spectra for ATP aptamer after addition of ATP at different concentrations, C_{ATP} (mM): (1) 0, (2) 0.033, (3) 0.066, (4) 0.1, (5) 0.13, (6) 0.16, (7) 0.2, (8) 0.23, (9) 0.26, (10) 0.3, (11) 0.33. c Dependence of I_{FL} vs. C_{ATP} d Stern-

Volmer plot. e Dependence of I_{FL} vs. C_{ATP} for $C_{\text{Apt}} = 16.7$ nM. f Dependence of $\log(I_{\text{FL},0} - I_{\text{FL}})/I_{\text{FL}}$ vs. $\log C_{\text{ATP}}$; conditions: $C_{\text{Apt}} = 66.7$ nM; 20 mM Tris-HCl with 100 mM NaCl and 5 mM MgCl₂, pH 7.4; $\lambda_{\text{ex}} = 480$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 516$ nm

quenching of Apt(ATP) on the ATP concentrations by a 3σ method, is $LOD = 24 \mu M$. A higher sensitivity of Apt(ATP) was achieved by lowering the aptamer concentration to 16.7 nM . Under this condition, $LOD = 17 \mu M$ was obtained, as shown in Fig. 1 e. These results indicate a good sensitivity of Apt(ATP) toward ATP and this sensing method is comparable with recently published results for single-component ATP probes [53–55].

The size of the binding site (n) between Apt(ATP) and ATP was determined from the slope of the logarithmic plot (Fig. 1f):

$$\log \left[\frac{(I_{FL,0} - I_{FL})}{I_{FL}} \right] = \log K_b + n \log C_Q \quad (2)$$

The plot provides the value of the binding site size, $n = 0.8$, indicating that the ratio of aptamers to ATP molecules in a complex is approximately 1:1. This is consistent with the data obtained by other researchers [26, 29, 56]. Upon the interaction with ATP, aptamer changes conformation and assumes a new tertiary structure due to the intramolecular and intermolecular interactions such as aromatic stacking and hydrogen bonding between Apt and ATP molecules [29, 57]. According to the works of Szostak and coworkers [26], the ATP molecule is bound in a binding pocket of the aptamer above the G-quadruplex and between two adenines belonging to the two free oligonucleotide chains. The conformational changes after the interactions with ATP were also observed for DNA three-way junction system [56].

A response of an Apt(ATP) probe to the higher concentrations of ATP, in the millimolar range, is presented in Fig. S1 in the Electronic Supplementary Material (ESM). The measurements under these conditions are characterized with a lower probe sensitivity, necessary to cover the larger dynamic range, including the elevated ATP levels in some cells under extreme conditions.

Initial aptamer conformations in the absence of target ATP

The potential secondary structures of the oligonucleotide aptamer for ATP (Apt(ATP)), in the absence of the ATP ligand, have been studied using UNAFold software [58, 59]. The obtained results are presented in Fig. 2a. For Apt(ATP) sequence used in the experiments and without FAM fluorescence dye, for 100 nM Apt(ATP) in 100 mM NaCl with 5 mM MgCl_2 solution at 25°C , four structures of Apt(ATP) were found. All structures had a negative Gibbs free energy of formation. The most thermodynamically stable was structure 1 with $\Delta G^\circ = -1.7 \text{ kcal/mol}$. The calculated thermodynamic data for the formation of conformational structures of Apt(ATP) and the respective equilibrium constants obtained from the dependence $\Delta G^\circ = -RT \ln K$ are presented in Table 1. The tertiary structure of ATP aptamer designed according to Szostak et al. [26] and used in experiments is depicted in Fig.

2 b. The structures 2 and 4 may switch directly to the tertiary structure upon interaction with target ATP because their loops are composed of G-rich sequences which can fold into the characteristic G-quadruplex structure.

It follows from the analysis of thermodynamic data in Table 2 that Apt(ATP) structure 1 is predominant in a salt solution and it is also the most resistant to the formation of the G-quadruplex necessary to bind ATP ligands. The likely mechanism of ATP binding by the aptamer is thus via transition of Apt 1 to Apt 2, binding ATP, and completing the conformation change to structure 5.

Intracellular ATP determination via liposomal transfection of cancer cells with Apt(ATP)

Further investigations were focused on monitoring of the ATP synthase inhibition, modulated with oligomycin, in SW480 colorectal cancer cells, using ATP-sensing DNA aptamer. The decrease in ATP production due to the inhibition of ATP synthase can be readily discernible using the DNA aptamer. Simultaneous sensing and imaging of ATP in untreated and treated SW480 cells have been realized through inverted light microscope. A scheme of the cellular uptake of Apt aptamer with FAM fluorescence dye is presented in Fig. 3 a. In this scheme, a transfection of SW480 cells with Apt(ATP) using Lipofectamine carriers, Apt(ATP)@Lip, is shown. Thus, the ATP aptamer is delivered via a liposomal endocytosis to SW480 cells [60]. The Apt(ATP) with FAM fluorescence tag generates a strong green emission signal induced by the presence of intracellular ATP. The method applied was not targeting the organelles. Fluorescence probes for selective detection of ATP in mitochondria and lysosomes were investigated by Swamy et al. [51]. After entering the cell and interactions with ATP, inherently present in cytosol, a decrease in fluorescence signal of Apt(ATP) is observed due to the changes in conformation of Apt(ATP) and quenching of FAM dye (Fig. 3b–d). The interaction of cells with OMC causes a decrease of the production of ATP which is reflected in the observed increase of the aptamer fluorescence due to the weaker quenching at lower ATP concentration (Fig. 3f, g, j).

In Fig. 3, presented are cell images in the light-dark field (b–d) and in the dark field (e–g). The intensity of a green emission signal, related to the emission of FAM fluorophore, is correlated with Apt(ATP) introduced to cells after 135 min of incubation. It is seen that transfection with non-treated cells has shown the weakest green signal as compared with cells treated with oligomycin. The morphology of untreated SW480 cells is presented in Fig. 3 h and the dark field image of these untreated cells (control) is shown in Fig. 3 i, with no discernible fluorescence observed, as expected. After the interaction with OMC, the morphology of cells was not changed (data not shown). The data obtained in Fig. 3 b–g were

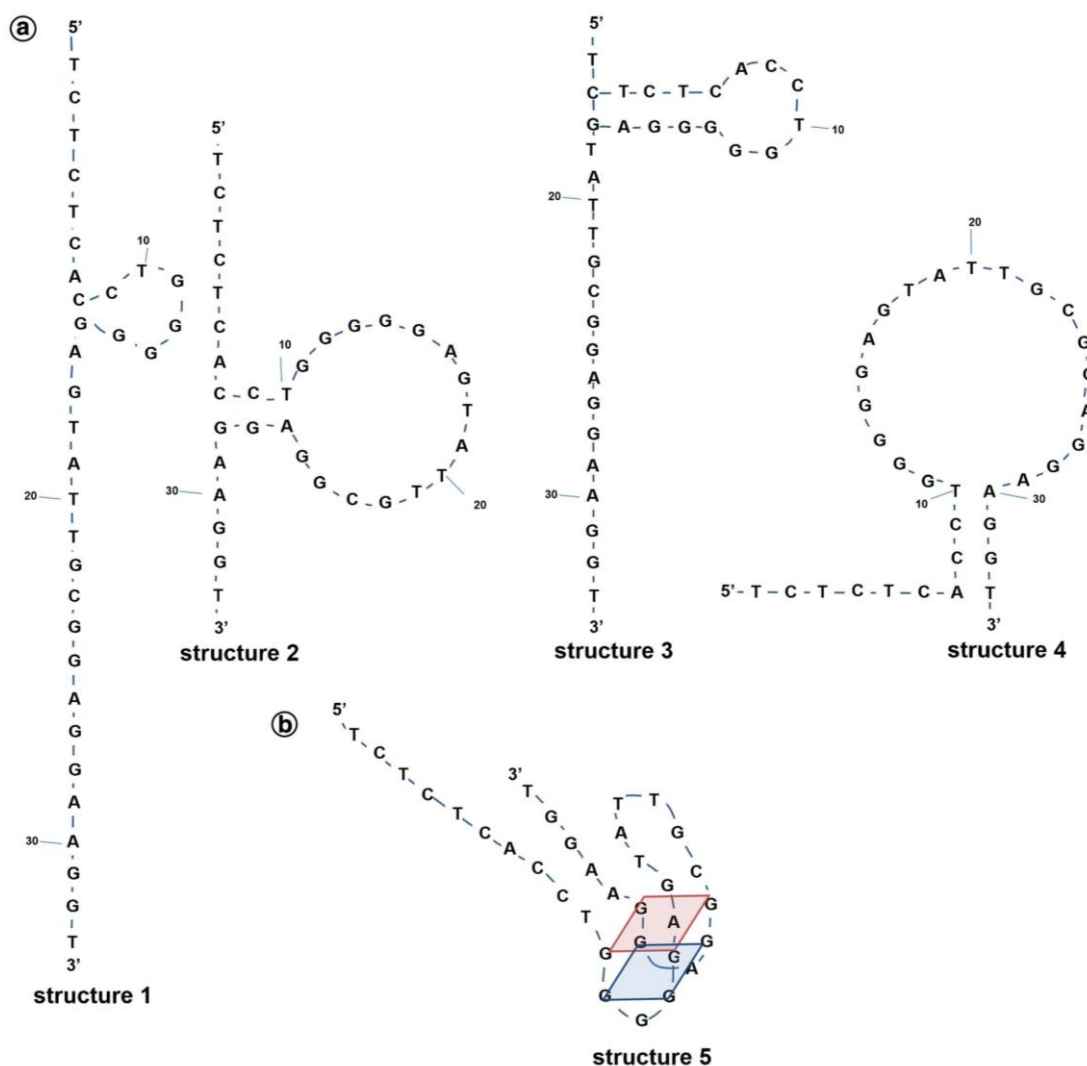


Fig. 2 **a** Four secondary structures of Apt(ATP) obtained in 100 mM NaCl with 5 mM MgCl_2 solution at 25 °C using UNAFold program. **b** Tertiary structure of Apt(ATP)

confirmed by fluorescence measurements. The relative fluorescence signal of FAM of Apt(ATP) in transfected

cells is presented in Fig. 3 j. The experiment with untreated cells (0 μM of OMC) was performed as a control. It is

Table 2 Thermodynamic data for the formation of conformational polymorphic structures of Apt(ATP) calculated for 100 nM Apt(ATP) + 100 mM NaCl solution and 5 mM MgCl_2 at 25 °C

Apt(ATP)	ΔG° kcal/mol	ΔH° kcal/mol	ΔS° cal/(mol K)	t_m °C	K
Structure 1	−1.7	−22.30	−69.09	49.6	17.7
Structure 2	−1.31	−25.70	−81.80	41.0	9.14
Structure 3	−1.06	−26.90	−86.67	37.2	5.99
Structure 4	−0.99	−23.30	−74.83	38.2	5.32

Calculated using the UNAFold program

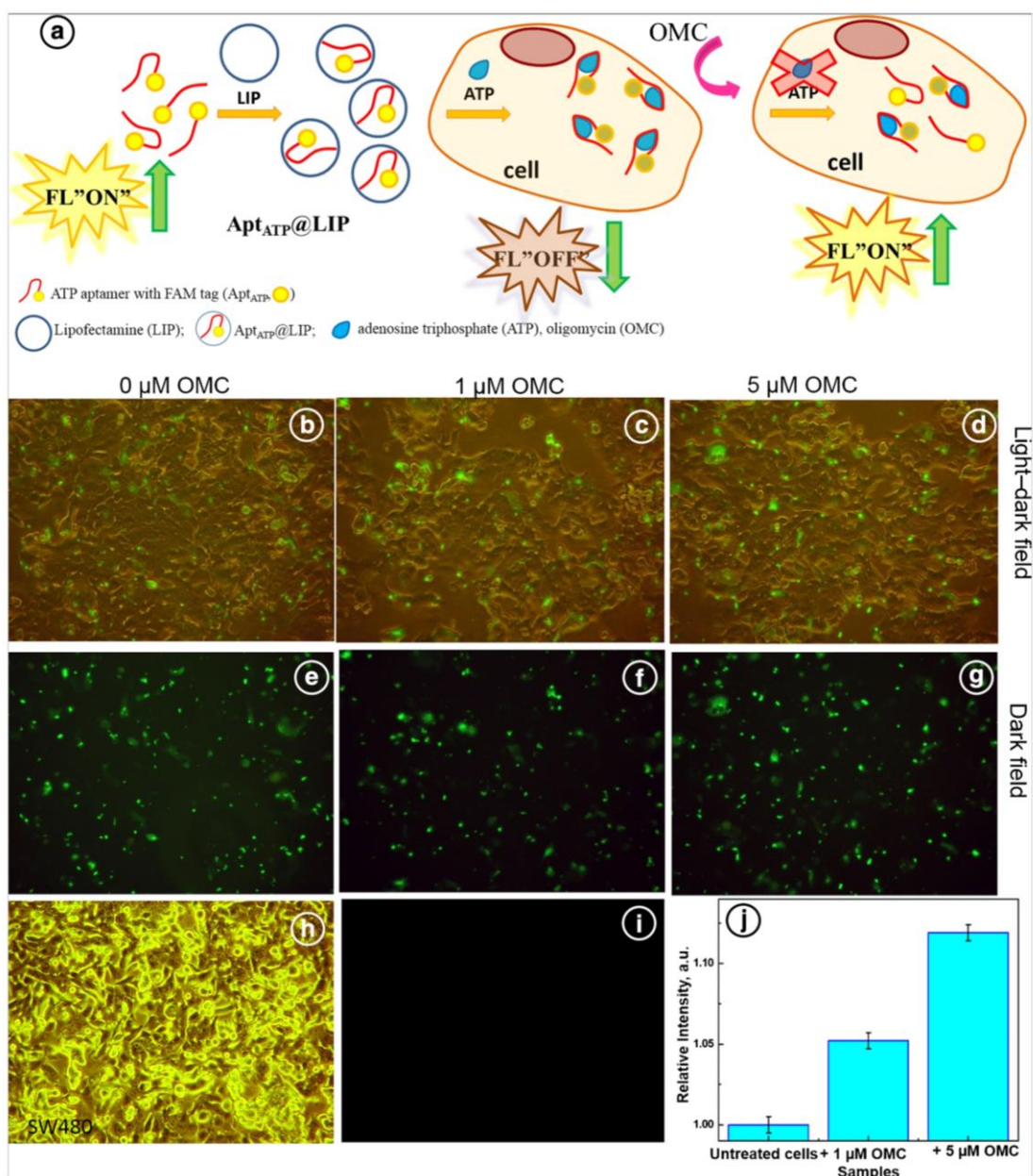


Fig. 3 **a** Schematic view of the formation of Apt(ATP)@LIP for ATP recognition and ATP detection in cells. **b–g** Detection of ATP content in fixed SW480 cells untreated and treated with 1 and 5 μM concentration of oligomycin (OMC) for 20 h and transfected with Apt(ATP)@LIP for 135 min. **b–d** light-dark field, **e–g** dark field. **h** Morphology of the

untreated SW480 cells. **i** Dark field fluorescence image of untreated SW480 cells (control). **j** Comparison of the relative intensity of fluorescence for SW480 cells transfected with Apt(ATP)@LIP after addition of OMC, C_{OMC} (μM) (1) 0, (2) 1.0, (3) 5.0, with incubation time $t_{\text{inc}} = 20$ h

clearly seen that the addition of oligomycin at concentration 1 and 5 μM, respectively, per 20 h, is manifested by

the increase of relative fluorescence signal about 5.2% and 11.9%, respectively. It indicates that the ATP

production is diminished and therefore less binding between ATP and Apt(ATP) occurs and higher fluorescence signal of Apt(ATP) is observed. At the 0.05 level, these values are significantly different. Hao et al. [61] have shown that the treatment of H1299 cell line with oligomycin at concentrations of 100 and 1000 ng/mL results in a complete elimination of the respiration in 1 h. The authors have also shown that ATP levels were fully rebalanced within 4 h of the oligomycin treatment suggesting that the loss of oxidative phosphorylation (OXPHOS) of ATP was replaced with the increased glycolysis of ATP. Therefore, in our experiments, after 20 h of OMC treatment, the extra ATP production in SW480 cells by OXPHOS and glycolysis processes is likely to contribute to the non-linear dependence of Apt(ATP) signal on OMC concentration. The measured fluorescence signal of Apt(ATP) depends directly on ATP concentration.

Modulation of oxygen consumption in cells with ATP synthase inhibitor oligomycin

Data obtained by fluorescence measurements and microscopic images concerning the effect of oligomycin on mitochondrial ATP synthase and inhibition of ATP production were further confirmed by oxygen consumption in SW480 cells. In normal cells, ATP is mainly produced through oxidative phosphorylation (OXPHOS) in mitochondria and through glycolysis. However, in various cancer cells, the OXPHOS capacity is reduced and glycolysis is enhanced [62]. It is well known that oligomycin (OMC) is an inhibitor of mitochondrial F₀ ATP synthase activity (Fig. 4a). OMC blocks the flow of protons. We have found that the application of 0.3 μ M OMC to SW480 cells results in a threefold decrease in mitochondrial oxygen consumption rate, as calculated from the changes in oxygen concentration flux (Fig. 4b). For higher doses of oligomycin (1 μ M), additional inhibition of respiration level was observed but value was not

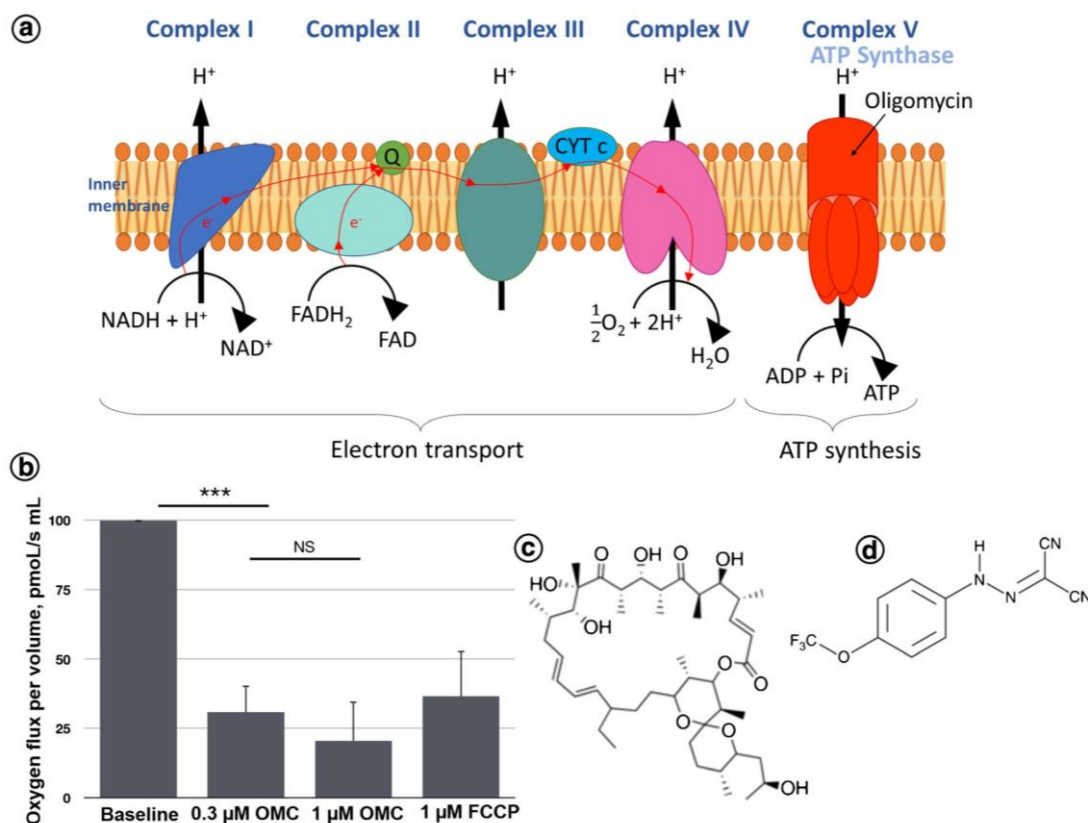


Fig. 4 **a** Schematic illustration of mechanism of oligomycin (OMC) action in mitochondrial respiratory chain site. **b** Effect of OMC and FCCP on mitochondrial oxygen consumption reflecting ATP synthase activity in SW 480 cell line. **c** Structure of OMC. **d** Structure of FCCP.

Conditions: $C_{OMC} = 0.3$ and 1 μ M; $C_{FCCP} = 1$ μ M, $n = 3$. ***Significantly different to baseline values with $p < 0.01$. NS—1 μ M OMC values not significant to oligomycin 0.3 μ M values

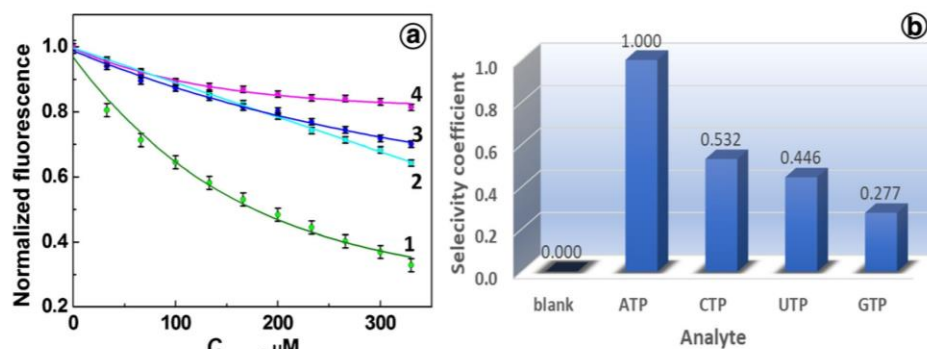


Fig. 5 **a** Dependence of normalized fluorescence intensity of an ATP aptamer on concentration of nucleoside triphosphates: (1) ATP, (2) CTP, (3) UTP, (4) GTP. **b** Block diagram of selectivity coefficient for analytes

$C_{\text{Analytes}} = 330 \mu\text{M}$. Conditions: $C_{\text{Apt}} = 66.7 \text{ nM}$, 20 mM Tris-HCl buffer with 100 mM NaCl and 5 mM MgCl_2 , pH 7.4

significant in comparison with oligomycin at 0.3 μM value, indicating that 0.3 μM OMC had the maximum effect. The mitochondrial oxygen consumption decreased from the control normalized baseline rate of 100 pmol/(s mL) for untreated cells to 30.8 pmol/(s mL) and 20.5 pmol/(s mL) for 0.3 and 1 μM of oligomycin, respectively. The results were obtained immediately after OMC addition and indicate that the 20-h action of oligomycin on cells reported in previous experiments caused a total inhibition of ATP production. Interestingly, when a 1 μM mitochondrial oxidative phosphorylation uncoupler FCCP activator of proton conductance through the plasma membrane was applied, the activity of mitochondrial respiratory chain was partially restored and mitochondrial oxygen consumption increased to 36.6 pmol/(s mL). Therefore, our experimental data confirm that oligomycin can be used to modulate the mitochondrial ATP synthase inhibition and ATP production. These data are supported by the Hao et al. studies performed on H1299 cancer cells

[61]. Suppression of mitochondrial production of ATP due to OMC was also reported for SW620 cells by Lin et al. [63].

Selectivity of the ATP aptamer-based fluorescence assay

The specificity of Apt(ATP) enables detection of ATP in complex biological samples. To evaluate the ATP aptamer selectivity against other nucleoside triphosphates such as GTP, CTP, and UTP, which are potential interferents, the selectivity tests were performed. The effect of the addition of nucleotides to a solution of Apt(ATP) is illustrated in Fig. 5 a. It is seen that addition of nucleoside triphosphates other than ATP with increasing concentrations results in weaker quenching of fluorescence emission of Apt(ATP) than that observed for ATP by iFRET. From the selected interferents, the weakest quenching was observed for GTP

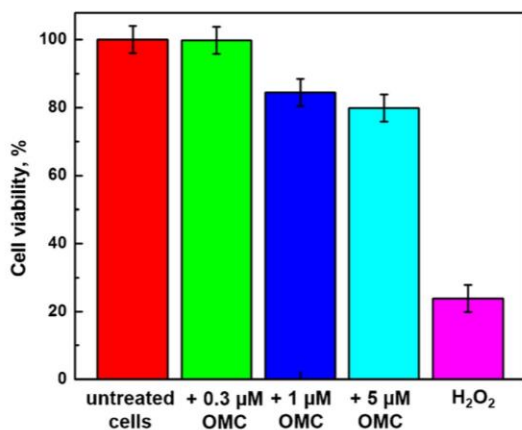


Fig. 6 The results of MTT cell viability tests for cells treated with 0.3 μM , 1 μM , and 5 μM OMC; positive control: (OMC)=0 μM ; negative control: (H_2O_2)=8 M

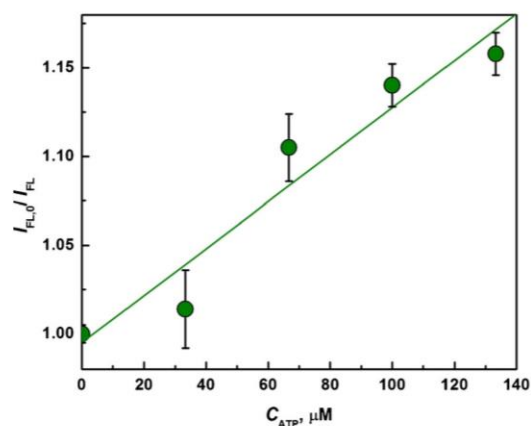


Fig. 7 Test of Apt(ATP) sensitivity to the addition of ATP to a lysate solution of SW480 cells

(18.6%) and strongest for CTP (35.7%), which compare favorably with that for ATP (67.1%).

The selectivity coefficients calculated for nucleoside triphosphates are shown in Fig. 5 b for 330 μM solutions of each triphosphate and 66.7 nM aptamer probe in 20 mM Tris-HCl saline buffer, pH 7.4. The values of selectivity coefficients, marked at each bar, range from 0.532 to 0.277.

Cell viability decrease in OMC-treated cells

The effect of OMC treatment on cell viability was investigated using SW480 colon cancer cells. Since OMC inhibits ATP synthase, the cells treated with OMC are deprived of energy, and thus, their viability should be lower than that for untreated cells. The cell viability tests for untreated cells and those treated with OMC have been performed using a standard colorimetric MTT assay and the results are presented in Fig. 6. The test for untreated SW480 cells was used as the positive control and it shows 100% cell viability. It is seen that the addition of 0.3 μM of oligomycin for 20 h to SW480 cell line causes a negligible change in cell viability in comparison with control sample (untreated cells). The addition of oligomycin with 1 μM and 5 μM concentrations caused 15.5% and 20.1% decrease in cell viability, respectively. Lin and co-workers have shown that no obvious differences in cell viability between untreated SW620 cells and those treated with 12.6 and 25.2 μM OMC for 24 h were observed. They obtained 35.3% signal decrease with 25.2 μM OMC after a 48-h treatment [63]. In Fig. 6, we have also included a negative control with H_2O_2 . A cell viability decrease of 76.1% was observed. These results are corroborated by recently published data. Tharakan's group has shown that the blood-brain barrier endothelial cells treated with high concentration of H_2O_2 (> 10 mM) have shown a significant decrease in cell viability and induction of apoptosis [64]. Kaushik et al. have found that the reactive oxygen species (ROS) such as H_2O_2 generated by soft jet plasma and chemically induced ROS systems decreased the viability and intracellular ATP values of cancer T98G (glioblastoma), A549 (lung adenocarcinoma), normal HEK293 (embryonic kidney), and MRC5 (lung fibroblast) cells. Also, the ROS increased the apoptotic population [65].

Sensing of ATP in cancer cell lysate

The applicability of the proposed Apt(ATP) probe for the analysis of ATP in real samples was also tested using the cell lysate obtained by lysis of SW480 cancer cells. In Fig. 7, measurements of Apt(ATP) fluorescence upon the addition of ATP to the cell lysate diluted 1:300 in 20 mM Tris-HCl + 100 mM NaCl + 5 mM MgCl_2 buffer are presented. The experiments were carried out using the diluted original lysate sample and samples spiked with 33, 66, 99, and 133 μM ATP (final added concentration). It is shown that the fluorescence

signal of Apt(ATP) in lysate decreases by 16% for 133 μM ATP addition, confirming high sensitivity of the aptamer probe in 300-fold diluted cancer cell lysate. The high regression coefficient of the linear fitting to the experimental data, $R^2 = 0.964$, indicates that the mechanism of intramolecular FRET remains operating in the lysate solution. The linear fitting equation is given by $I_0/I = 1 + 1.32 \times 10^{-3} C_{\text{ATP}}$ where C_{ATP} is given in (μM).

Conclusions

The production of ATP is a key factor driving the life processes which strongly depend on energy supply. We have demonstrated that ATP production modulation by ATP synthase inhibitor, oligomycin, and the increased intracellular ATP level due to carcinogenesis can conveniently be monitored with a robust fluorescence "On-Off" switching aptamer probe, without any other added reagents or analyte labelling. We have successfully transfected living SW480 colon cancer cells with Apt(ATP), enabling fluorescence monitoring of intracellular ATP. The modulation of ATP production was correlated with oxygen consumption measurements in living cells and changes in cell viability tested using MTT method. Our results indicate that the Apt(ATP) has high selectivity toward ATP and good discrimination against non-specific interactions with cytosol and lysate components. Hence, the developed methodology may be applied in pharmacological studies and cancer research for convenient monitoring of dynamic ATP level modulation by new drugs under development and in the assessment of cancer growth rate.

Funding information This research was supported by funding provided by the Program OPUS of the National Science Centre, Poland, Grant No. 2017/25/B/ST4/01362.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made.

References

1. Hanson RW. The role of ATP in metabolism. *Biochem Educ.* 1989;17:86–92.
2. Zhang J, Han X, Lin Y. Dissecting the regulation and function of ATP at the single-cell level. *PLoS Biol.* 2018;16:e3000095.

3. Doenst T, Nguyen TD, Abel ED, Phil D. Cardiac metabolism in heart failure - implications beyond ATP production. *Circ Res*. 2013;113:709–24.
4. Olah J, Klivenyi P, Gardian G, Vecsei L, Orosz F, Kovacs GG, et al. Increased glucose metabolism and ATP level in brain tissue of Huntington's disease transgenic mice. *FEBS J*. 2008;275:4740–55.
5. Heerlein K, Schulze A, Hotz L, Bartsch P, Mairbaurl H. Hypoxia decreases cellular ATP demand and inhibits mitochondrial respiration of A549 cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2005;32:44–51.
6. Boutilier RG. Mechanisms of cell survival in hypoxia and hypothermia. *J Exp Biol*. 2001;204:3171–81.
7. Faas MM, Saez T, Vos P. Extracellular ATP and adenosine: the Yin and Yang in immune responses? *Mol Asp Med*. 2017;55:9–19.
8. Nikolettou V, Markaki M, Palikaras K, Tavernarakis N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta*. 1833;2013:3448–59.
9. Wilfred L, Menza SA, Levine JS. Graded ATP depletion can cause necrosis or apoptosis of cultured mouse proximal tubular cells. *Am J Phys*. 1998;274:F315–F27.
10. Nicotera P, Leist M, Ferrando-May E. Intracellular ATP, a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *Toxicol Lett*. 1998;102–103:139–42.
11. Virgilio FD, Sarti AC, Falzoni S, Marchi ED, Adinolfi E. Extracellular ATP and P2 purinergic signalling in the tumour microenvironment. *Nat Rev Cancer*. 2018;18:601–18.
12. Pellegatti P, Raffaghello L, Bianchi G, Piccardi F, Pistoia V, Di Virgilio F. Increased level of extracellular ATP at tumor sites: in vivo imaging with plasma membrane luciferase. *PLoS One*. 2008;3:e2599.
13. Zhang C, Liu Z, Liu X, Wei L, Liu Y, Yu J, et al. Targeted metabolic analysis of nucleotides and identification of biomarkers associated with cancer in cultured cell models. *Acta Pharm Sin B*. 2013;3:254–62.
14. Mânica A, da Silva Rosa Bonadiman B, Cardoso A, Paiz A, Siepko C, de Souza J, et al. The signaling effects of ATP on melanoma-like skin cancer. *Cell Signal*. 2019;59:122–30.
15. Patel A, Malinowska L, Saha S, Wang J, Alberti S, Krishnan Y, et al. ATP as a biological hydrotrope. *Science*. 2017;356:753–6.
16. Rajendran M, Dane E, Conley J, Tantama M. Imaging adenosine triphosphate (ATP). *Biol Bull*. 2016;231:73–84.
17. Imamura H, Nhat KPH, Togawa H, Saito K, Iino R, Kato-Yamada Y, et al. Visualization of ATP levels inside single living cells with fluorescence resonance energy transfer-based genetically encoded indicators. *PNAS*. 2009;106:15651–6.
18. Manfredi G, Yang L, Gajewski CD, Mattiazzi M. Measurements of ATP in mammalian cells. *Methods Enzymol*. 2002;26:317–26.
19. Liu Y, Lee D, Wu D, Swamy KMK, Yoon J. A new kind of rhodamine-based fluorescence turn-on probe for monitoring ATP in mitochondria. *Sensors Actuators B Chem*. 2018;265:429–34.
20. Wu Y, Wen J, Li H, Sun S, Xu Y. Fluorescent probes for recognition of ATP. *Chin Chem Lett*. 2017;28:1916–24.
21. Stobiecka M, Chalupa A. Biosensors based on molecular beacons. *Chem Pap*. 2015;69(1):62–76. <https://doi.org/10.1515/chempap-2015-0026>.
22. Li Y, Sun L, Zhao Q. Development of aptamer fluorescent switch assay for aflatoxin B₁ by using fluorescein-labeled aptamer and black hole quencher 1-labeled complementary DNA. *Anal Bioanal Chem*. 2018;410:6269–77.
23. Ye H, Lu Q, Duan N, Wang Z. GO-amplified fluorescence polarization assay for high-sensitivity detection of aflatoxin B₁ with low dosage aptamer probe. *Anal Bioanal Chem*. 2019;411:1107–15.
24. Su R, Zheng H, Dong S, Sun R, Qiao S, Sun H, et al. Facile detection of melamine by a FAM-aptamer-G-quadruplex construct. *Anal Bioanal Chem*. 2019;411:2521–30.
25. Sassanfar M, Szostak JW. An RNA motif that binds ATP. *Nature*. 1993;364:550–3.
26. Huizenga DE, Szostak JW. A DNA aptamer that binds adenosine and ATP. *Biochemistry*. 1995;34:656–65.
27. Song S, Wang L, Li J, Zhao J, Fan C. Aptamer-based biosensors. *Trends Anal Chem*. 2008;27:108–17.
28. Zhao T, Lin C, Yao Q, Chen X. A label-free electrochemiluminescent sensor for ATP detection based on ATP-dependent ligation. *Talanta*. 2016;154:492–7.
29. Ng S, Lim H, Ma Q, Gao Z. Optical aptasensors for adenosine triphosphate. *Theranostics*. 2016;6:1683–702.
30. Nutiu R, Li Y. Structure-switching signaling aptamers. *J Am Chem Soc*. 2003;125:4771–8.
31. Babu E, Mareeswaran PM, Ramdass A, Ramesh P, Rajagopal S. Label free luminescence strategy for sensitive detection of ATP using aptamer-Ru(II) complexes. *J Lumin*. 2016;175:267–73.
32. Li W, Nie Z, Xu X, Shen Q, Deng C, Chen J, et al. A sensitive, label free electrochemical aptasensor for ATP detection. *Talanta*. 2009;78:954–8.
33. Huo Y, Qi L, Lv X-J, Lai T, Zhang J, Zhang Z-Q. A sensitive aptasensor for colorimetric detection of adenosine triphosphate based on the protective effect of ATP-aptamer complexes on unmodified gold nanoparticles. *Biosens Bioelectron*. 2016;78:315–20.
34. Zhang L, Wei H, Li J, Li T, Li D, Li Y, et al. A carbon nanotubes based ATP apta-sensing platform and its application in cellular assay. *Biosens Bioelectron*. 2010;25:1897–901.
35. Chen S-J, Huang Y-F, Huang C-C, Lee K-H, Lin Z-H, Chang H-T. Colorimetric determination of urinary adenosine using aptamer-modified gold nanoparticles. *Biosens Bioelectron*. 2008;23:1749–53.
36. Huang H, Tan Y, Shi J, Liang G, Zhu J-J. DNA aptasensor for the detection of ATP based on quantum dots electrochemiluminescence. *Nanoscale*. 2010;2:606–12.
37. Ji D, Wang H, Ge J, Zhang L, Li J, Bai D, et al. Label-free and rapid detection of ATP based on structure switching of aptamers. *Anal Biochem*. 2017;526:22–8.
38. Song Q, Peng M, Wang L, He D, Ouyang J. A fluorescent aptasensor for amplified label-free detection of adenosine triphosphate based on core-shell Ag@SiO₂ nanoparticles. *Biosens Bioelectron*. 2016;77:237–41.
39. Lee J, Cang J, Chen Y, Chen W, Ou C, Chang H. Detection of adenosine 5'-triphosphate by fluorescence variation of oligonucleotide-templated silver nanoclusters. *Biosens Bioelectron*. 2014;58:266–71.
40. Wei Y, Chen Y, Li H, Shuang S, Dong C, Wang G. An exonuclease I-based label-free fluorometric aptasensor for adenosine triphosphate (ATP) detection with a wide concentration range. *Biosens Bioelectron*. 2015;63:311–6.
41. Meng C, Dai Z, Guo W, Chu Y, Chen G. Selective and sensitive fluorescence aptamer biosensors of adenosine triphosphate. *Nanomater Nanotechnol*. 2016;6(33):1–6.
42. Wang Y, He X, Wang K, Ni X. A sensitive ligase-based ATP electrochemical assay using molecular beacon-like DNA. *Biosens Bioelectron*. 2010;25:2101–6.
43. Du Y, Li B, Wang F, Dong S. Au nanoparticles grafted sandwich platform used amplified small molecule electrochemical aptasensor. *Biosens Bioelectron*. 2009;24:1979–83.
44. Zhou J, Huang H, Xuan J, Zhang J, Zhu J-J. Quantum dots electrochemical aptasensor based on three-dimensionally ordered macroporous gold film for the detection of ATP. *Biosens Bioelectron*. 2010;26:834–40.
45. Zhou S-S, Zhang L, Cai Q-Y, Dong Z-Z, Geng X, Ge J, et al. A facile label-free aptasensor for detecting ATP based on fluorescence enhancement of poly(thymine)-templated copper nanoparticles. *Anal Bioanal Chem*. 2016;408:6711–7.

46. Kong L, Xu J, Xu Y, Xiang Y, Yuan R, Chai Y. A universal and label-free aptasensor for fluorescent detection of ATP and thrombin based on SYBR Green I dye. *Biosens Bioelectron.* 2013;42:193–7.
47. Kaczmarek P, Szczepanik W, Jezowska-Bojczuk M. Acid–base, coordination and oxidative properties of systems containing ATP, L-histidine and Ni(II) ions. *Dalton Trans.* 2005;22:3653–7.
48. Kucharczyk R, Zick M, Bietenhader M, Rak M, Couplan E, Blondel M, et al. Mitochondrial ATP synthase disorders: molecular mechanisms and the quest for curative therapeutic approaches. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1793:186–99.
49. Houštěk J, Pícková A, Vojtěšková A, Mráček T, Pecina P, Ješina P. Mitochondrial diseases and genetic defects of ATP synthase. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1757:1400–5.
50. Sithara T, Arun K, Syama H, Reshmitha T, Nisha P. Morin inhibits proliferation of SW480 colorectal cancer cells by inducing apoptosis mediated by reactive oxygen species formation and uncoupling of warburg effect. *Front Pharmacol.* 2017;8:640.
51. Swamy KMK, Eom S, Liu Y, Kim G, Lee D, Yoon J. Rhodamine derivatives bearing thiourea groups serve as fluorescent probes for selective detection of ATP in mitochondria and lysosomes. *Sensors Actuators B Chem.* 2019;281:350–8.
52. Lukasiak A, Skup A, Chlopicki S, Łomnicka M, Kaczara P, Proniewski B, et al. SERCA, complex I of the respiratory chain and ATP-synthase inhibition are involved in pleiotropic effects of NS1619 on endothelial cells. *Eur J Pharmacol.* 2016;786:137–47.
53. Chen F, Cai C, Chen X, Chen C. “Click on the bidirectional switch”: the aptasensor for simultaneous detection of lysozyme and ATP with high sensitivity and high selectivity. *Sci Rep.* 2016;18814:1–7.
54. Cai L, Chen Z-Z, Dong X-M, Tang H-W, Pang D-W. Silica nanoparticles based label-free aptamer hybridization for ATP detection using hoechst33258 as the signal reporter. *Biosens Bioelectron.* 2011;29:46–52.
55. Ma K, Wang H, Li H, Wang S, Li X, Xu B, et al. A label-free aptasensor for turn-on fluorescent detection of ATP based on AIE-active probe and water-soluble carbon nanotubes. *Sensors Actuators B Chem.* 2016;230:556–8.
56. Seemann IT, Singh V, Azarkh M, Drescher M, Hartig JS. Small-molecule-triggered manipulation of DNA three-way junctions. *J Am Chem Soc.* 2011;133:4706–9.
57. Lin C, Patel D. Structural basis of DNA folding and recognition in an AMP-DNA aptamer complex: distinct architectures but common recognition motifs for DNA and RNA aptamers complexed to AMP. *Chem Biol.* 1997;4:817–32.
58. Markham N, Zuker M. UNAFold: software for nucleic acid folding and hybridization. In: Keith JM, editor. *Bioinformatics: structure, function and applications*: Humana Press; 2008. p. 3–31.
59. Markham NR, Zuker M. DINAMelt web server for nucleic acid melting prediction. *Nucleic Acids Res.* 2005;33:W577–W81.
60. Ratajczak K, Krazinski BE, Kowalczyk AE, Dworakowska B, Jakiela S, Stobiecka M. Hairpin–hairpin molecular beacon interactions for detection of survivin mRNA in malignant SW480 cells. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2018;10:17028–39. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b02342>.
61. Hao W, Chang C-PB, Tsao C-C, Xu J. Oligomycin-induced bioenergetic adaptation in cancer cells with heterogeneous bioenergetic organization. *J Biol Chem.* 2010;285:12647–54.
62. Zheng J. Energy metabolism of cancer: glycolysis versus oxidative phosphorylation (review). *Oncol Lett.* 2012;4:1151–7.
63. Lin C, Liu L, Ou L, Pan S, Lin C, Wei Y. Role of mitochondrial function in the invasiveness of human colon cancer cells. *Oncol Rep.* 2018;39:316–30.
64. Shaji CA, Robinson BD, Yeager A, Beeram MR, Davis ML, Isbell CL, et al. The tri-phasic role of hydrogen peroxide in blood-brain barrier endothelial cells. *Sci Rep.* 2019;9(133):1–9.
65. Kaushik N, Uddin N, Sim GB, Hong YJ, Baik KY, Kim CH, et al. Responses of solid tumor cells in DMEM to reactive oxygen species generated by non-thermal plasma and chemically induced ROS systems. *Sci Rep.* 2015;5(8587):1–11.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Materialy uzupełniające:

Analytical and Bioanalytical Chemistry

Electronic Supplementary Material

Monitoring of dynamic ATP level changes by oligomycin-modulated ATP synthase inhibition in SW480 cancer cells using fluorescent “On-Off” switching DNA aptamer

Katarzyna Ratajczak, Agnieszka Lukasiak, Hubert Grel, Beata Dworakowska,
Sławomir Jakiela, Magdalena Stobiecka

Detection of ATP using fluorescent ATP aptamer (Apt(ATP))

A response of an Apt(ATP) probe to the higher concentrations of ATP, in the mM range, is presented in Figure S1. The measurements under these conditions are characterized with a lower probe sensitivity, necessary to cover the larger dynamic range, including the elevated ATP levels in some cells under extreme conditions.

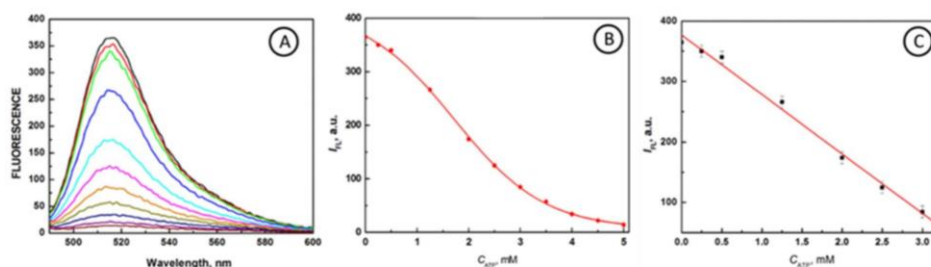


Fig. S1 (A) Fluorescence spectra for ATP aptamer after addition of ATP at different concentrations from 0 to 5 mM; (B) Dependence of I_{FL} vs. C_{ATP} in a wide range from 0 to 5 mM ATP; (C) Linear part of the dependence of I_{FL} vs. C_{ATP}

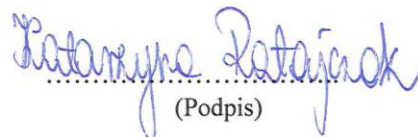
Warszawa, 23.10.2024

Katarzyna Ratajczak
katarzyna_ratajczak@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Nauki Biologiczne
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy K. Ratajczak, A. Łukasiak, H. Grel, B. Dworakowska, S. Jakiela, M. Stobiecka, (2019) Monitoring of dynamic ATP level changes by oligomycin-modulated ATP synthase inhibition in SW480 cancer cells using fluorescent “On-Off” switching DNA aptamer, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 411(26), 6899-6911 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na przeglądzie literatury, wykonaniu badań opisanych w manuskrypcie, w tym scharakteryzowanie opracowanej sondy, doświadczenia przy użyciu spektroskopii fluorescencyjnej, hodowla komórek i transfekcja ich przy użyciu liposomów, a także opracowaniu i analizie wyników, pisaniu i edycji manuskryptu.


(Podpis)

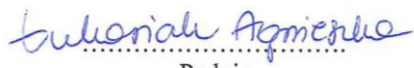
Warszawa, dn. 26.01.2022r.

Agnieszka Łukasiak
agnieszka_lukasiak@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Nauki Biologiczne
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Ratajczak K., Lukasiak A., Grel H., Dworakowska B., Jakiela S., Stobiecka M. **2019** Monitoring od dynamic ATP level changes by oligomycin-modulated ATP synthase inhibition in SW480 cancer cells using fluorescent „On-Off switching DNA aptamer *Anal Bioanal Chem* **2019 Oct; 411(26)** mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na przygotowaniu protokołu do oceny przeżywalności komórek SW480 w obecności oligomycyny za pomocą testu z MTT (Ryc. 6) oraz pomiarach szybkości oddychania komórek SW480 przy pomocy elektrody tlenowej (Ryc. 4).


Podpis

Warszawa, 23.10.2024

Hubert Grel
hubert_grel@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Nauki Biologiczne
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy K. Ratajczak, A. Łukasiak, H. Grel, B. Dworakowska, S. Jakiela, M. Stobiecka, (2019) Monitoring of dynamic ATP level changes by oligomycin-modulated ATP synthase inhibition in SW480 cancer cells using fluorescent “On-Off” switching DNA aptamer, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 411(26), 6899-6911 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu wyników do Rysunku 1B oraz przygotowaniu wstępnej wersji manuskryptu.

.....Hubert Grel.....
(Podpis)

Warszawa, 18.01.2022

Beata Dworakowska
beata_dworakowska@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Nauki Biologiczne
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Katarzyna Ratajczak, Agnieszka Łukasiak, Hubert Grel, Beata Dworakowska, Sławomir Jakieła i Magdalena Stobiecka, 2019, Monitoring of dynamic ATP level changes by oligomycin-modulated ATP synthase inhibition in SW480 cancer cells using fluorescent “On-Off” switching DNA aptamer, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 411, 6899–6911 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na wykonaniu fotografii użytych do fig. 3.



Podpis

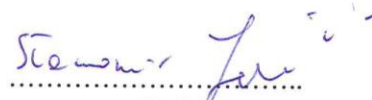
Warszawa, 23.10.2024

Sławomir Jakiela
slawomir_jakiela@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Nauki Biologiczne
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy K. Ratajczak, A. Łukasiak, H. Grel, B. Dworakowska, S. Jakiela, M. Stobiecka, (2019) Monitoring of dynamic ATP level changes by oligomycin-modulated ATP synthase inhibition in SW480 cancer cells using fluorescent “On-Off” switching DNA aptamer, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 411(26), 6899-6911 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na pisaniu manuskryptu i odpowiedziach na recenzje.


.....
(Podpis)

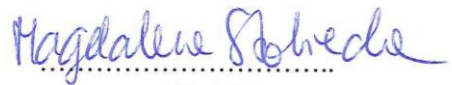
Warszawa, 23.10.2024

Magdalena Stobiecka
magdalena_stobiecka@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Nauki Biologiczne
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy K. Ratajczak, A. Łukasiak, H. Grel, B. Dworakowska, S. Jakiela, M. Stobiecka, (2019) Monitoring of dynamic ATP level changes by oligomycin-modulated ATP synthase inhibition in SW480 cancer cells using fluorescent “On-Off” switching DNA aptamer, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 411(26), 6899-6911 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu metodologii i koncepcji badań jak również pisaniu i edycji manuskryptu, odpowiedziach na recenzje oraz pozyskaniu finansowania.



(Podpis)

PUBLIKACJA 5

DNA Aptamer Beacon Probe (ABP) for Monitoring of Adenosine Triphosphate Level
in SW480 Cancer Cells Treated with Glycolysis Inhibitor 2-Deoxyglucose

Ratajczak K., Stobiecka M.

International Journal of Molecular Sciences 2023, 24(11), 9295



Article

DNA Aptamer Beacon Probe (ABP) for Monitoring of Adenosine Triphosphate Level in SW480 Cancer Cells Treated with Glycolysis Inhibitor 2-Deoxyglucose

Katarzyna Ratajczak * and Magdalena Stobiecka *

Department of Physics and Biophysics, Warsaw University of Life Sciences, 159 Nowoursynowska Street, 02776 Warsaw, Poland

* Correspondence: katarzyna_ratajczak@sggw.edu.pl (K.R.); magdalena_stobiecka@sggw.edu.pl (M.S.)

Abstract: Early cancer screening enables timely detection of carcinogenesis, and aids in prompt clinical intervention. Herein, we report on the development of a simple, sensitive, and rapid fluorometric assay based on the aptamer probe (aptamer beacon probe, ABP) for monitoring the energy-demand biomarker adenosine triphosphate (ATP), an essential energy source that is released into the tumor microenvironment. Its level plays a significant role in risk assessment of malignancies. The operation of the ABP for ATP was examined using solutions of ATP and other nucleotides (UTP, GTP, CTP), followed by monitoring of ATP production in SW480 cancer cells. Then, the effect of a glycolysis inhibitor, 2-deoxyglucose (2-DG), on SW480 cells was investigated. The stability of predominant ABP conformations in the temperature range of 23–91 °C and the effects of temperature on ABP interactions with ATP, UTP, GTP, and CTP were evaluated based on quenching efficiencies (QE) and Stern-Volmer constants (K_{SV}). The optimized temperature for best selectivity of ABP toward ATP was 40 °C ($K_{SV} = 1093 \text{ M}^{-1}$, QE = 42%). We have found that the inhibition of glycolysis in SW480 cancer cells by 2-deoxyglucose resulted in lowering of ATP production by 31.7%. Therefore, monitoring and modulation of ATP concentration may aid in future cancer treatment.

Keywords: aptamer beacon probe (aptaprobe, ABP); ATP detection; biosensing assay; fluorescence spectroscopy; SW480 cancer cells; 2-deoxyglucose (2-DG) glycolysis inhibitor



Citation: Ratajczak, K.; Stobiecka, M. DNA Aptamer Beacon Probe (ABP) for Monitoring of Adenosine Triphosphate Level in SW480 Cancer Cells Treated with Glycolysis Inhibitor 2-Deoxyglucose. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 9295. <https://doi.org/10.3390/ijms24119295>

Academic Editor: Nuno Vale

Received: 15 April 2023

Revised: 20 May 2023

Accepted: 23 May 2023

Published: 26 May 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

In view of the rising numbers of cancer cases around the world, extensive efforts have recently been devoted to developing novel effective cancer treatments, addressing specific features of carcinogenesis, tumor growth, and metastasis. Cancer is currently the leading cause of death worldwide, with 19.3 million new cases and near 10 million deaths reported in 2020 [1]. Colorectal cancer (CRC) is the third-most common malignancy and the second-most deadly cancer type worldwide. The global number of new CRC cases (colon, rectal, anal) is predicted to reach 3.2 million in 2040, based on projections of aging, population growth, and human development [2]. It is estimated that over 153,000 new CRC cases will be diagnosed in the United States in 2023 [3].

Due to fast tumor growth, invasion into neighboring cells, and cancer cells' migration, early diagnosis and prompt treatment are crucial in the fight against cancer [4]. The timely detection of cancer biomarkers, even before symptoms appear, plays a pivotal role in successful cancer treatment. To achieve this end, a widespread cancer screening has been advised. Due to the large number of subjects involved in such a cancer screening, the methods used for cancer biomarker detection must fulfill the requirements of low cost, simple operation, and high sensitivity and reliability. Therefore, it is of great urgency to develop biosensing probes for prognostic cancer biomarker detection in early cancer screening. In previous studies [5–7], we have designed highly sensitive biosensing systems for the detection of cancer biomarkers, including the anti-apoptotic protein survivin and its

mRNA. The proposed systems were based on fluorescent molecular-beacon probes, and were applied for testing SW480 human colorectal cancer cells. We have also designed an immunosensor based on monoclonal antibodies against protein survivin [8]. In the present work, we have focused on the development of a new biosensing platform for monitoring adenosine triphosphate (ATP), whose production is upregulated in cancer cells to support the elevated demands for energy supply needed by fast-growing and proliferating cancer cells.

The adenosine triphosphate plays a key role in many biologically important processes [9], such as proliferation [10], metabolism [11,12], differentiation [13] and apoptosis [14], where the main function of ATP is to provide energy to cellular processes, including facilitating energy transfer, intracellular signalling, and the synthesis of proteins, DNA, and RNA [15].

Recently, it has been found that the ATP level is also increased in the tumor microenvironment (TME). The ATP is released into the TME by the tumor itself, as well as by the host cells, and can be involved in the migration and activation of immune cells, in addition to supporting the metabolism and growth of tumor and stromal cells. Thus, TME ATP is often considered to be a biochemical hallmark of the host–tumor interface [16–18]. Yang et al. [19,20] have shown that extracellular ATP can promote breast carcinoma invasion, and plays a vital role in mediating breast cancer chemoresistance. Salvestrini et al. [14] have discovered that the activation of ATP plasma membrane ion channels (P2X7R) with high doses of ATP can induce acute apoptosis of myeloid leukemia (AML) blast cells. Fiorillo et al. [15,21] have found that the ATP-high MDA-MB-231 cells exhibit a 20–40-fold and 15–60-fold increase in their ability to undergo cell migration and invasion, respectively, relative to the ATP-low cell population. Furthermore, it appears that in the drug-resistant cells, mitochondrial ATP production is dysregulated, leading to enhanced aerobic glycolysis and elevated intracellular ATP levels, as well as increased levels of hypoxia-inducible factor-1 alpha (HIF-1 α) [22].

Therefore, due to its active role in carcinogenesis, ATP may be considered a non-specific cancer biomarker that may become a new suitable molecular target in cancer therapy, enabling the hinderance of metastasis and cancer propagation. In addition, the determination of the intracellular ATP concentration in biological samples is crucial for monitoring of disease progression.

It has generally been accepted that one of the hallmarks of neoplastic diseases is the change in energy metabolism, with an upsurge in glycolysis, producing energy-carrying ATP molecules, at the cost of the usual oxidative phosphorylation (OXPHOS), even under normoxic conditions. This change, known as the Warburg effect, provides a vast amount of energy that cancer cells need for extensive proliferation [23–25]. The modulation of ATP production in cancer cells by glycolysis inhibitors may become a novel approach to control cancer growth and proliferation. Martin et al. [26,27] have reported that cancer treatment in combination with ATP-depleting agents and anticancer drugs markedly enhanced tumor regression, e.g., MAP = 6-methylmercaptapurine riboside (MMPR) + 6-aminonicotinamide (6-AN) + *N*-(phosphonacetyl)-L-aspartic acid (PALA) with two anticancer agents: 5-fluorouracil (FU) + Adriamycin (Adr) [28], MAP + FU [29]. Wang et al. [30] have also shown that the depletion of ATP can be considered a therapeutic strategy for cancer treatment. The authors have utilized micelles composed of branched polyethylene glycol (bPEG), Pluronic P123 cationic multiblock copolymer, and low molecular weight polyethyleneimine (PEI) (PSPP/PTX/siRNA) as a codelivery carrier of small interfering RNA (siRNA) against polo-like kinase1 (PLK1) and paclitaxel (PTX) for effective reversal of cancer multidrug resistance (MDR) *in vitro* and *in vivo*. Song et al. [31] have applied a smart nanoagent based on the assembly of quantum dots (QDs), tannic acid (TA), and doxorubicin (DOX) chemodrug (QDs@TA-PEG/DOX) for depleting intracellular ATP content and increasing cells' chemosensitivity.

The decrease of intracellular ATP production by treating cancer cells with 2-deoxyglucose (2-DG) was recently reported by Kaushik et al. [32], who applied luciferase and luciferin-

based assay and observed a 12% and 16% intracellular ATP level decrease in THP-1 and U937 human leukemic cancer cell lines, respectively, when treated for 24 h with 1 mM 2-DG. The treatment of human lung A549 carcinoma cells with 20 mM 2-DG for 2.5 h also resulted in ca. 30% ATP level suppression [33]. According to Maximchik et al. [34], the treatment with 20 mM 2-DG caused about a 25–30% drop in the ATP level in HCT116 human colorectal carcinoma cell line, and a 60–80% ATP level drop in the SK-N-BE(2) neuroblastoma cell line. Sahra et al. [35] have observed a 60% decrease of intracellular ATP concentration in LNCaP androgen-sensitive human prostate adenocarcinoma cells treated for 24 h with 1 mM 2-DG.

The results presented above indicate that the excess energy production associated with cancer progression can be restrained by applying inhibitors of glycolysis. These inhibitors suppress the intracellular ATP level and contribute to the retardation of tumor growth and metastasis.

In studies of processes leading to the suppression of energy supply, the measurement of the level of ATP, the main energy source, becomes the key factor for successful assessment of the progress achieved. Therefore, together with the monitoring of biomarkers specific to various cancer types, the monitoring of ATP is one of the most important issues. Although a range of assays and biosensing platforms for ATP determination have been proposed, a highly sensitive, inexpensive, and rapid method is desired for possible application in widespread cancer screening. Among these methods, some of the most promising are listed below.

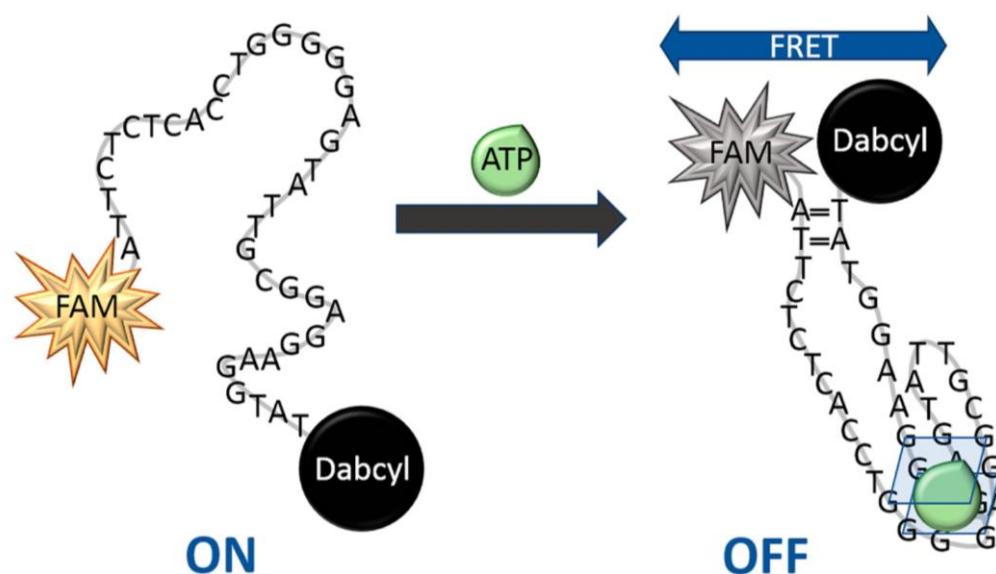
Recently, several methods for the detection of ATP, based on aptamers, have been proposed. The aptamers used included synthetic DNA or RNA oligonucleotides that bind with high affinity and specificity to the targeted molecules [36–38]. The first successfully selected DNA aptamer that binds adenosine and ATP in solutions was outlined in 1995 by Huizenga and Szostak [39]. This aptaprobe, which consisted of two small Watson-Crick helices and two G-quartets, is still one of the most-studied aptamers for ATP detection. However, some changes and modifications of these aptamers have recently been proposed and utilized in more complex biosensing systems and biosensors to achieve a lower limit of detection for ATP, at the cost of simplicity and rapidity of the assay operation [40–43]. The complex assay developed by Guo [44], based on two aptamers and a multiplication circle, was able to achieve a remarkably low limit of detection for ATP: 38 nM. Zhou et al. [45] have developed a platform based on surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS). The authors have utilized split aptamers (apt1 and apt2) attached to a nanolayer of gold nanoparticle-decorated graphene oxide (GO/AuNP) and gold nanoparticles (AuNP), respectively. In the presence of ATP, interactions with split aptamers on AuNP have occurred, leading to a closer proximity between nanomaterials. This results in enhanced SERS signals for the detection of ATP, and a very low limit of detection: LOD = 0.85 pM ATP.

Due to the complex nature of neoplasia, associated with the effects of multiple factors such as genes, proteins, and biologic pathways, it is necessary to develop analytical biosensing platforms based on different panels, specific to different relevant biomarkers. Such a multi-panel platform can offer a high reliability for cancer diagnostics and screening. Recently, growing evidence indicates that the use of panels of biomarkers offers a significant improvement in cancer diagnostic accuracy [46–48].

In our previous studies, we have developed biosensing systems based on molecular beacons and biosensors for the detection of survivin mRNA and other cancer biomarkers [4–6]. We have also shown that the fluorescein modified ATP aptamer may be used for monitoring ATP levels in untreated and oligomycin-treated cancer cells [49].

In the present work, we have developed a novel aptamer beacon probe (aptaprobe, ABP) modified with fluorescein (FAM) at the 5' end, and quencher (Dabcyl) at the 3' end of the DNA oligonucleotide with G-quadruplex structure. The new aptamer beacon probe consists of a single-stranded oligonucleotide loop and a duplex stem, formed by self-complementary ends of the strand containing two bases, thus resembling a specific hairpin structure. The sequence of ABP was based on the DNA strand originally developed by

Huizenga and Szostak [39] that involved the G-rich 27-nucleotide sequence of ATP-binding aptamer 5'-ACCTGGGGGAGTATTGCGGAGGAAGGT-3'. This strand was extended in the present work with the addition of seven nucleotides—ATTCTCTC—at the 5' end, and two nucleotides—AT—at the 3' end of this sequence. Since the loop of ABP is rich in guanines, during the interactions with ATP, the square planar structure of the characteristic G-quadruplex can be formed (Scheme 1). Upon binding of ATP to ABP, the FAM fluorescent dye and the Dabcyl quencher, which are attached at the ends of ABP sequence and are widely separated from each other, get closer together, enabling an efficient Förster resonance energy transfer (FRET), resulting in FAM fluorescence quenching, as depicted in Scheme 1. First, we have performed physicochemical investigations of this aptamer probe in buffer solutions. Our initial aim was to evaluate the effects of several experimental parameters including the incubation time of aptaprobe and the experimental temperature on biosensing assay performance. The ATP aptamer selectivity against other nucleoside triphosphates such as GTP, CTP, and UTP was also evaluated on the basis of quenching efficiencies (QE) and Stern-Volmer constants (K_{SV}). Furthermore, testing of the assay developed using biological samples was performed. The SW480 human colorectal cancer cells lysate (300-fold diluted) and lysate from SW480 cells treated with 2-deoxyglucose glycolysis inhibitor (300-fold diluted) were used for this purpose. We have demonstrated that the proposed simple and rapid fluorometric assay based on DNA aptamer beacon can be designed and used for the detection and monitoring of intracellular ATP levels in cancer cells for diagnostics and prognostication. The obtained results also indicate that further investigation is warranted to follow the modulation of ATP levels by glycolysis inhibitors as a potential cancer treatment.



Scheme 1. Schematic view of the conversion of the aptamer beacon probe (ABP) from the random coil conformation to the G-quadruplex in the presence of ATP. The random coil ABP is in equilibrium with predominant structures 1–4, presented in Figure 1.

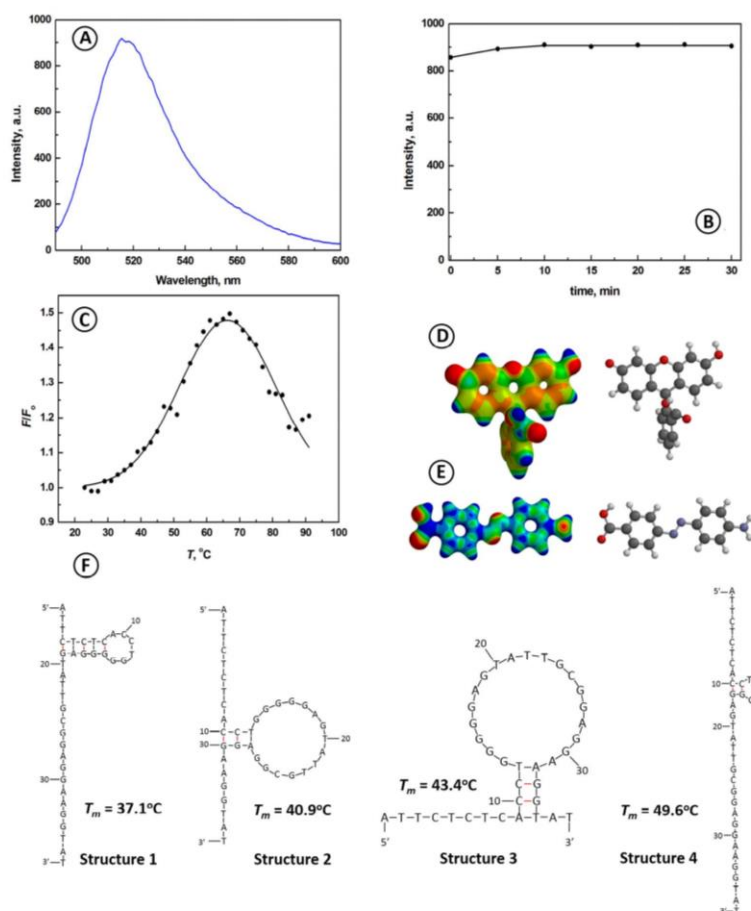


Figure 1. (A) Fluorescence emission spectrum for aptamer beacon probe (aptaprobe, ABP) for $\lambda_{ex} = 480$ nm; (B) Dependence of the fluorescence emission intensity of aptaprobe on time for peak emission at $\lambda_{em} = 517$ nm; (C) The melting characteristics for aptaprobe, $\lambda_{em} = 517$ nm; (D,E) Electronic and chemical structures of the fluorophore fluorescein; (D) Quencher Dabcyl (E) attached to the ends of the aptaprobe nucleotide sequence; electron density surfaces ($d = 0.08$ a.u.) with mapped electrostatic potential (color coded: from negative—red to positive—blue); (F) main theoretical aptaprobe structures with their melting temperatures. Conditions: $C_{ABP} = 133$ nM, $\lambda_{ex} = 480$ nm, buffer solution: 20 mM Tris-HCl + 100 mM NaCl + 5 mM $MgCl_2$, room temperature 21 °C.

2. Results and Discussion

2.1. Characterization of the ATP Aptamer Beacon Probe

The aptamer beacon probe (ABP) designed in this work consists of a single-stranded 37-mer oligonucleotide, with the strand sequence: 5'-ATTCTCTCACCTGGGGGAGTATTG-CGGAGGAAGGTAT-3', and a fluorophore-quencher pair attached to the ends of the strand. The fluorophore (fluorescein, FAM) of the pair was bonded to the 5' end of the oligonucleotide strand, and the quencher (Dabcyl) was bonded to the 3' end of the strand. The electronic and chemical structures of FAM and Dabcyl are presented in Figure 1 in panels D–E, with the electrostatic potential mapped on the constant electron density surface for $d = 0.08$ a.u. The quantum mechanical calculations have revealed that the conformation

of the oligonucleotide strand of the aptaprobe is dependent on the temperature of the medium, ionic strength of the buffer electrolyte, and the concentration of Mg^{2+} ions. To determine the temperature ranges of the predominant conformations of ABP, the theoretical melting temperatures for the predominant conformations were calculated. They are listed together with the most stable ABP structures in Figure 1F. The calculations were carried out using UNAFold 3.9 program with Quikfold application provided at the DINAMelt web server of the University of Albany, New York [50,51]. The program is based on the unified base-pair theory. The obtained results indicate that the ABP can form four different small-loop hairpin structures, with melting temperatures from 37.1 °C for structure 1, 40.9 °C for structure 2, 43.4 °C for structure 3, to 49.6 °C for structure 4. These calculations corroborate the recent studies of the Myong group [52], indicating that the efficient formation of the G-quadruplex needs the help of ATP. Although the formation of a G-quadruplex is a thermodynamically favorable process for a random DNA strand, it requires some extensive bending of the DNA strand, and thus it is kinetically hindered. Hence, the faster formation of simpler, although metastable beacon forms, presented in Figure 1F, prevails in absence of other interacting species. However, these structures are metastable in the presence of ATP, and formation of the G-quadruplex is feasible due to the strong bonding of ATP to the guanines of ABP. It must be emphasized that aptamer structures 1–4, although predominant in temperature ranges up to 49.6 °C (see: Figure 1), are in thermodynamic equilibrium with the random coil structure of ABP, such as the one shown in Scheme 1, left panel.

The fluorescence emission spectrum for 133 μM DNA aptaprobe in a TRIS-HCl buffer at room temperature of 21 °C is presented in Figure 1A. A well-defined emission peak at $\lambda = 516$ nm with intensity of 904.5 a.u. is observed. This peak is ascribed to the intrinsic fluorescence of FAM dye attached to the aptamer strand. As seen in Figure 1B, the peak emission intensity stabilizes within 15 min and then remains unchanged. Therefore, all subsequent experiments were performed after 15 min of ABP stabilization. At room temperature, the predominant conformation of the aptamer is represented by structure 1 in Figure 1F. In this structure, the distance between fluorophore FAM and quencher Dabcyl is large, and as such, no intra-molecular fluorescence quenching is expected.

To evaluate the stability of ATP aptamer structure and its conformation changes, the influence of temperature on the operation of the aptamer beacon was investigated. As shown in Figure 1C, the temperature scan from 23 °C to 91 °C, with a scan rate of 2 deg/min, produced a reversible three-state (OFF-ON-OFF) melting characteristic of ABP. A similar phenomenon was observed for molecular beacon (MB) complementary to survivin mRNA [53]. It is seen that during the temperature scan from 23 °C to 67 °C, the intensity of the emission signal increases from $F = 1$ a.u. to $F = 1.498$ a.u. The distance between FAM dye at 5' end of the aptamer and Dabcyl quencher at 3' end increases, resulting in the increasing emission of the light by the fluorophore. Interestingly, upon further temperature increase from 67 °C to 91 °C, the fluorescence does not remain constant but decreases slightly to the level of $F = 1.205$ a.u. It becomes clear that with increasing temperature, the flexible single-stranded DNA aptamer assumes dynamically random conformations. The distance between FAM dye at the 5' end of the aptamer and Dabcyl quencher at the 3' end can momentarily come close enough to each other during the random arms' waving to cause the self-quenching by the FRET process. The melting temperature of the highest-temperature stable conformation of ABP (structure 4) is $t_m = 49.6$ °C, which means that above this temperature, the concentration of conformation 4 is less than that of the random coil structures. The experimental apparent melting temperature $t_{m,app}$, determined by the simplex fitting algorithm, is slightly higher than theoretically predicted for aptamer structure 4, and equals 51.4 ± 1.2 °C (Figure 1C). This value is slightly higher than that of structure 4, since conformations 1–3 are still present at temperatures above their melting points at low concentrations and contribute to the measured fluorescence emission. It is worth noting that for a shorter 27-nucleotide ATP-binding aptamer, originally developed by Huizenga and Szostak [39], the experimentally obtained melting temperature was 45.2 ± 0.5 °C, as determined by Slavkovic et al. [54] using UV melting curves. Therefore,

the aptamer beacon probe developed in the present work shows somewhat higher stability at elevated temperatures than the benchmark probe of Huizenga and Szostak [39].

2.2. Temperature Dependence of the Interactions of Aptamer Beacon Probe with ATP and Other Nucleotides

In the presence of ATP, the temperature dependence of the aptaprobe fluorescence changes dramatically, as illustrated in Figure 2A, line 1. The fluorescence intensities were normalized according to the equation:

$$I_{\text{norm}} = F/F_0 \quad (1)$$

where F is the fluorescence intensity of aptamer in the presence of nucleotides, and F_0 is the fluorescence intensity of ABP alone in buffer solution.

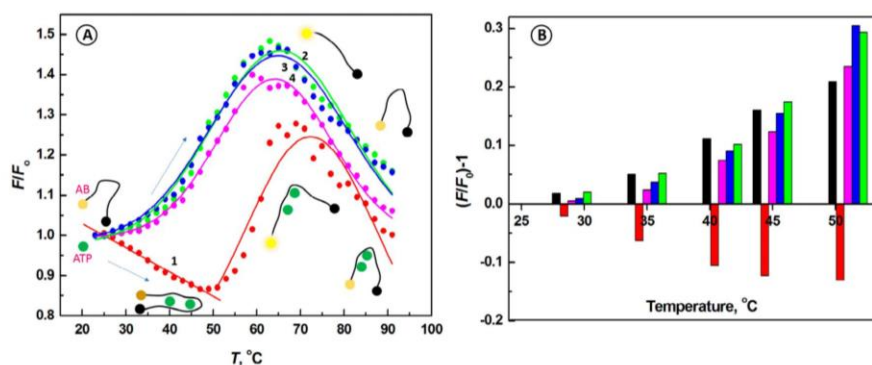


Figure 2. (A) Melting characteristics for the aptamer beacon probe with ATP (red, 1) and other nucleotides: GTP (green, 2), UTP (blue, 3), and CTP (violet, 4); INSET: pictorial view of changing conformations of aptaprobe alone and aptaprobe with ATP; arrows indicate direction of temperature scan. (B) The dependence of $(F/F_0)-1$ vs. temperature for aptaprobe alone (black bar, 1), and aptaprobe interactions with nucleotides: remaining bars in each group: ATP (red, 2), CTP (violet, 3), UTP (blue, 4), and GTP (green, 5). Conditions: $C_{\text{ABP}} = 133 \text{ nM}$, $C_{\text{nuc}} = 625 \text{ }\mu\text{M}$; $\lambda_{\text{ex}} = 480 \text{ nm}$, temperature scan: 23–91 °C; buffer solution: 20 mM Tris-HCl + 100 mM NaCl + 5 mM MgCl_2 .

During the temperature scan from 23 °C to 49 °C, performed after mixing of ATP with the aptamer beacon, the relative ABP fluorescence signal F/F_0 decreased steadily from 1 to 0.867 (Figure 2, line 1, red), indicating the binding of ATP to the aptamer, concomitant with the aptamer undergoing conformation change. In the new ABP conformation, facilitating the aptamer beacon probe–ATP complex formation, the distance between the FAM dye and Dabcyl quencher becomes smaller, enabling the FRET process between them to occur. Hence, due to the high binding affinity of the aptamer to ATP, resulting in the enhanced FRET, the fluorescence intensity decreased despite the temperature increase, confirming the higher thermal stability of the ABP–ATP complex, in comparison to the bare aptamer conformations. During further temperature scan, above 51 °C, the fluorescence signal of ABP recovered, gradually increasing to reach the maximum level $F/F_0 = 1.247$ at the peak temperature $t_p = 69 \text{ }^\circ\text{C}$, followed by a decrease to $F/F_0 = 1.02$ at 91 °C due to the aptamer melting and formation of randomly coiled ABP structure.

In further studies, the effects of other nucleotides, including UTP, GTP, and CTP, on the operation of the aptamer beacon were examined (Figure 2, lines 2–4). Unlike in the case of ATP (line 1, red), other nucleotides (GTP, line 2, green; UTP, line 3, blue; CTP, line 4, violet) do not cause remarkable changes in the aptamer probe melting characteristics after interactions of these nucleotides with the aptamer. It indicates, that in the cases of UTP, GTP, and CTP, the interactions of the aptamer with target nucleotides are much weaker in

comparison to those with ATP, and no ABP-nucleotide complex is formed, leading to an unobstructed three-state transition, OFF-ON-OFF process, upon heating. Thus, the melting curves look similar to those for the bare aptamer (Figure 1C). These results confirm that the proposed aptamer probe binds specifically with ATP. We have observed this type of behavior, manifested by the increased quenching with increasing temperature, in other random coil DNA structures [53].

Figure 2B shows the dependence of the relative fluorescence change $(F/F_0)-1$ on temperature for ABP interactions with ATP, UTP, GTP, and CTP. It is clearly seen that binding of the aptamer with ATP results in a fluorescence decrease, while for the aptaprobe alone and for aptaprobe binding with other nucleotides, the fluorescence signal increased. The decrease in fluorescence for aptamer beacon probe-ATP solutions was the largest for temperatures in the range from 40 °C to 50 °C, providing an excellent selectivity for ATP and best discrimination against other nucleotides. These findings indicate that the proposed aptamer probe offers a good selectivity and sensitivity.

2.3. Selectivity of the Biosensing System

Testing of the selectivity of aptamer beacon probe was performed with triphosphate nucleotides, as illustrated in Figure 3. It is clearly seen that the interactions of aptaprobe with ATP at 23 °C induced stronger quenching of fluorescence than those of ABP with other nucleotides (Figure 3A,B). The observed aptaprobe fluorescence quenching efficiency (QE) for ATP was QE = 32%, while that for other nucleotides was 25%, 25%, and 20%, for CTP, UTP, and GTP, respectively. It indicates a higher affinity of the aptamer for ATP in comparison with that of other nucleotides. However, the difference between QE values for ATP and the remaining nucleotides at 23 °C was insufficient for discrimination against the effects of other nucleotides and effective ATP determination. To gain more insight into the nature of the binding of the aptaprobe with nucleotides and to optimize conditions for the expansion of the gap between QE for ATP and other nucleotides, the Stern-Volmer quenching dependencies were investigated. As such, we have determined the Stern-Volmer quenching constants K_{SV} for ATP, UTP, GTP, and CTP. As shown in Figure 3B, to determine the quenching constant K_{SV} , the values of the ratio F_0/F were plotted against the concentration of different nucleotides C_{nucl} . According to the Stern-Volmer equation, we have:

$$F_0/F = 1 + K_{SV}C_{nucl} \quad (2)$$

where F_0 and F are the fluorescence intensities for the aptamer beacon probe in the absence and the presence of nucleotides, respectively; K_{SV} is the quenching constant, and C_{nucl} is the concentration of the respective nucleotide—ATP, CTP, UPT, or GTP—acting as the quencher.

The fluorescence quenching data obtained for 23 °C have revealed that the Stern-Volmer quenching constants are $K_{SV} = 721 \pm 31 \text{ M}^{-1}$ for ATP, $K_{SV} = 540 \pm 49 \text{ M}^{-1}$ for CTP, $K_{SV} = 540 \pm 33 \text{ M}^{-1}$ for UTP, and $K_{SV} = 405 \pm 28 \text{ M}^{-1}$ for GTP. These results confirm the highest affinity of the aptamer beacon probe towards ATP molecules.

Due to the largest fluorescence signal decrease for interaction of ABP with ATP in the temperature range of 40 °C to 50 °C, a temperature of 40 °C was chosen for subsequent experiments. At 40 °C, the fluorescence quenching efficiency (QE) of aptaprobe towards ATP was significantly higher in comparison to that of room temperature, and the value of QE = 42% was obtained (Figure 3C). In contrast, for other nucleotides such as UTP, GTP, and CTP, much lower values of QEs were achieved at 40 °C, approaching QE = 18% for CTP, QE = 14% for GTP, and QE = 18% for UTP. Hence, by optimizing the experimental conditions, we were able to increase the response of the ABP towards ATP, while at the same time, the ABP response towards other nucleotides decreased significantly.

In order to see how Stern-Volmer quenching constants and the quenching process are affected by temperature, the interactions of aptaprobe with ATP and other nucleotides including UTP, GTP, and CTP have been investigated at 40 °C (Figure 3D). We have found that the value of the Stern-Volmer quenching constant for ATP (Figure 3D, line 1) increased

1.52-fold to $K_{SV} = 1093 \pm 43 \text{ M}^{-1}$, in comparison to the value of K_{SV} obtained at room temperature ($K_{SV} = 721 \pm 31 \text{ M}^{-1}$). These results clearly indicate that a stronger binding affinity of ATP to the aptamer beacon probe is observed at higher temperature. The increase of K_{SV} with temperature is likely to be due to the activation of the aptamer conformational transformation, enabling stronger ATP binding. On the other hand, the values of the Stern-Volmer quenching constants for UTP, GTP, and CTP nucleotides decreased at 40 °C to $K_{SV} = 367 \pm 42 \text{ M}^{-1}$ for CTP (Figure 3D, line 2), $K_{SV} = 307 \pm 45 \text{ M}^{-1}$ for UTP (Figure 3D, line 3), and $240 \pm 15 \text{ M}^{-1}$ for GTP (Figure 3D, line 4), respectively. These results additionally confirm the high specificity of aptaprobe toward ATP in comparison with UTP, CTP, and GTP nucleotides.

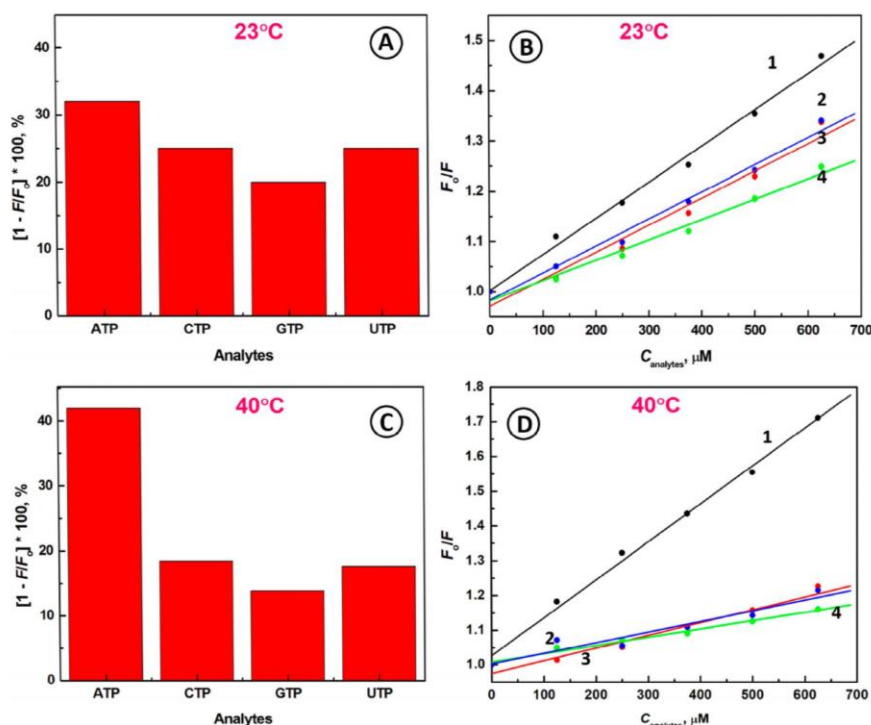


Figure 3. Fluorescence quenching efficiency of aptamer beacon after interaction with 625 μM solutions of nucleotides (ATP, CTP, GTP, UTP) at (A) 23 °C and (C) 40 °C; The Stern-Volmer plot of F_0/F vs. C_{nucl} : (1) ATP, (2) UTP, (3) CTP, (4) GTP, at (B) 23 °C and (D) 40 °C; Conditions: $C_{\text{ABP}} = 133 \text{ nM}$, $\lambda_{\text{ex}} = 480 \text{ nm}$; solution: 20 mM Tris-HCl buffer + 100 mM NaCl + 5 mM MgCl_2 .

These results corroborate the data obtained in earlier experiments, and indicate that aptamer beacon probe is specific and suitable for the detection of ATP.

2.4. Detection of ATP Molecules

The feasibility of the determination of ATP using the developed aptamer beacon probe was investigated using melting temperature measurements and fluorescence spectroscopy. As illustrated in Figure 4A, the interactions of ATP molecules with the aptamer beacon probe resulted in quenching of aptamer FAM fluorescence by 32% for 625 μM ATP, at 23 °C.

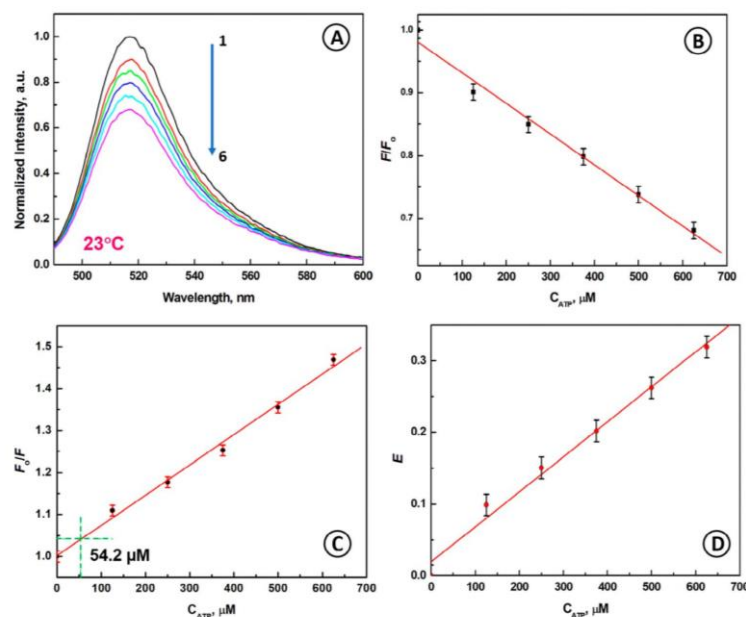


Figure 4. (A) Normalized fluorescence emission spectra of aptamer beacon for different concentrations of ATP; (B) The dependence of F/F_0 vs. C_{ATP} ; (C) The dependence of F_0/F vs. C_{ATP} showing the 3 σ LOD with a dashed line; (D) Dependence of quenching efficiency E on C_{ATP} ; conditions: C_{ATP} [μM]: (1) 0, (2) 125, (3) 250, (4) 375, (5) 500, (6) 625; C_{ABP} = 133 nM, λ_{ex} = 480 nm; solution: 20 mM Tris-HCl buffer + 100 mM NaCl + 5 mM $MgCl_2$, temperature 23 °C.

The dependence of F/F_0 vs. C_{ATP} is presented in Figure 4B. Upon the addition of ATP to the sensing system, a fluorescence change that is inversely proportional to the ATP concentration increase from 0 to 625 μM was observed. The Stern-Volmer plot is presented in Figure 4C. The linear fitting was performed for the obtained experimental data, obtaining the following calibration line equation:

$$F_0/F = 1 + 0.72 \times 10^{-3} C_{ATP} \quad (3)$$

where C_{ATP} is expressed in [μM]. The LOD, determined for the standard 3 σ deviation is:

$$LOD = 3\sigma/\text{slope} = 3 \times 0.013/0.00072 = 54.2 \mu M \quad (4)$$

The quenching efficiency (0–0.32) of the aptamer beacon for different concentrations of ATP is shown in Figure 4D. It is seen that at 23 °C, the plot of quenching efficiency E vs. C_{ATP} is linear in the investigated ATP concentration range.

By increasing the temperature to 40 °C, the ATP detection limit can be further decreased to LOD = 27.4 μM ATP, as is shown in Figure 5A. In Figure 5B, the dependence of E vs. C_{ATP} is depicted. Obviously, the higher temperature causes much greater fluorescence self-quenching (42%) of the ABP–ATP complex than that observed at a lower temperature (31%), for the same 625 μM ATP concentration.

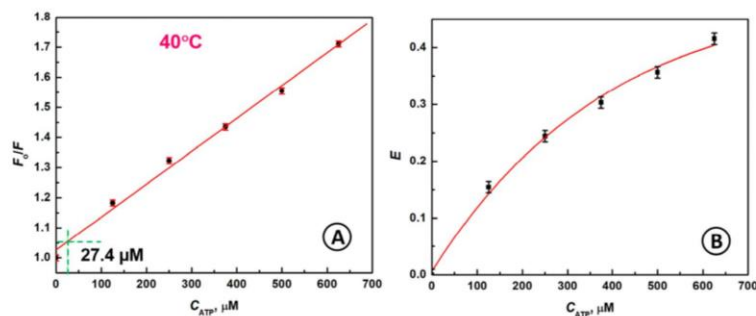


Figure 5. (A) The dependence of F_0/F vs. C_{ATP} showing the 3σ LOD with a dashed line; (B) Dependence of quenching efficiency E on C_{ATP} ; conditions: C_{ATP} [μM]: (1) 0, (2) 125, (3) 250, (4) 375, (5) 500, (6) 625; $C_{ABP} = 133$ nM, $\lambda_{ex} = 480$ nm; solution: 20 mM Tris-HCl buffer + 100 mM NaCl + 5 mM $MgCl_2$, temperature $40^\circ C$.

A comparison of the aptamer sequences, conditions, and detection limits reported recently for ATP sensors and assays based on DNA and RNA aptamers is presented in Table 1. The sensitivity and operational simplicity of the fluorescence turn-off aptaprobe biosensing system developed in this work are competitive to other biosensing assays listed in this table.

Table 1. Examples of ATP detection using fluorescence turn-on aptamer beacon probes.

No.	Fluorescence Aptaprobe	C_{probe} , μM	Buffer Solution	ATP Detection (LOD), [μM]	References
1.	Cy5-TGGAAGGAGCG TTA TGA GGG GGT CCA	3.3	300 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 0.1% Tween 20, pH = 8.3	34	[55]
2.	DNA1- GGGTGGG/iSp9/ACCTGGGG- AGTA	12	Tris-HCl, pH 9.0	28	[56]
	DNA2- CCCTGCGGAGGAAGGT/iSp9/G- GGTAGGG	4			
3.	TCTCTCACCTGGGGAGTATTGC- GGAGGAAGGT-FAM	0.0667	20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, pH 7.4	17	[49]
4.	FAM- ATTCTCTCACCTGGGGAGTATT- GCGGAGGAAGGTAT-Dabcyl	0.133	20 mM Tris-HCl buffer, 100 mM NaCl 5 mM $MgCl_2$, pH 7.4	27	This work
5.	ATACCTGGGGAGTATAGCTGTGT- GACGCAACACTAGCGGAGGAAGGTAT	0.5	25 mM Tris-HCl, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 3 mM $MgCl_2$, 0.02% Tween20, pH 7.4	40	[57]
6.	GUCGCACGUAGUGG- PyUGUGUGUGUGGCGAC	1.5	10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.2, 100 mM NaCl, 10 mM $MgCl_2$	90	[58]
7.	GUCGCACGPyUAGUGG- UGUGUGUGUGGCGAC	1.5	10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.2, 100 mM NaCl, 10 mM $MgCl_2$	820	[58]
8.	FAM- ACCTGGGGAGTATTGCGGAGG- AAGGT T ₁₀	0.5	15 mM Tris buffer, pH 8.5	28	[59]
9.	FAM-ACC TGG GGG AGT ATT GCG GAG GAA GGT-NH ₂	20	15 mM Tris buffer, pH 8.5	19	[59]

2.5. Determination of ATP in Cell Lysate Matrix Using Standard Addition Procedure

In the next step towards monitoring ATP levels in cancer cells, the applicability of the proposed biosensing assay was tested in the presence of SW480 cancer cell lysate, diluted 300-fold in buffer solution. The lysate of cancer cells treated with 10 mM 2-deoxyglucose (2-DG) for 24 h was also used in testing. The concentration of ATP in lysate solutions was determined using a new method derived from the basic Stern-Volmer Equation (2). This method enables simultaneous determination of the K_{SV} quenching constant in the presence of the lysate matrix and the ATP concentration in the lysate. For this purpose, the Stern-Volmer equation has been rewritten in the form:

$$F_0/F = 1 + K_{SV}C_{res} + K_{SV}C_{added} \quad (5)$$

where C_{res} is the unknown concentrations of ATP introduced to the sample from lysate, and C_{added} is the concentrations of ATP added in the standard addition procedure. In the series of solutions analyzed, the term $1 + K_{SV}C_{res}$ remains constant, so we define it as:

$$K_{res} = 1 + K_{SV}C_{res} \quad (6)$$

The new form of the Stern-Volmer equation:

$$F_0/F = K_{res} + K_{SV}C_{added} \quad (7)$$

indicates that the graphs of the Stern-Volmer function F_0/F plotted against the added quencher concentration C_{added} will no longer pass through the terminal point 0,1, which is now replaced with a new critical point 0, K_{res} . This new characteristic point is critical since it is dependent on the concentration of the “hidden” quencher (ATP) in the lysate and enables its determination.

This determination can be performed either graphically, as illustrated in Figure 6, or by calculation using the formula:

$$C_{res} = (K_{res} - 1)/K_{SV} \quad (8)$$

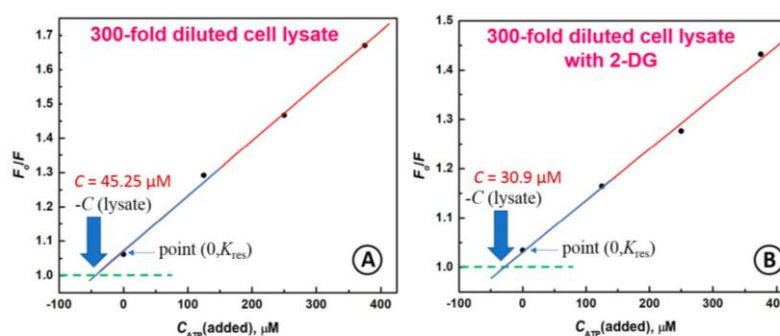


Figure 6. (A) The standard addition procedure for detection of ATP concentrations in cell lysate ($n = 3$) (A) and lysate of cells treated with 10 mM 2-DG for 24 h ($n = 2$); (B) Conditions: $C_{ABP} = 133$ nM, C_{ATP} [μ M]: (1) 0, (2) 125, (3) 250, (4) 375; $\lambda_{ex} = 480$ nm; solution: SW480 cells lysate 300-fold diluted in 20 mM Tris-HCl buffer with 100 mM NaCl + 5 mM $MgCl_2$.

The solution from cell lysate (300-fold diluted in buffer solution) was spiked with an ATP solution to obtain increasing ATP concentrations: 125 μ M, 250 μ M, and 375 μ M. The experiments were repeated triply for untreated cells and twice for treated cells. It was found that the obtained relative standard deviation (RSD) for ATP determination was between 5.87% and 9.88 % for untreated SW480 cell lysate, and between 3.86% and 4.17% for lysate from cell treated with 2-DG (Table 2). The obtained results indicate that the

inhibition of glycolysis in SW480 cancer cells by 10 mM 2-deoxyglucose (2-DG) for 24 h results in lowering of ATP production by 31.7%. Similar results were obtained by Choi and Lee [60]. The authors have shown ca. 20% ATP depletion in HeLa cells treated with 10 mM concentration of 2-DG for 24 h. Zhao et al. [61] observed a decrease of ATP synthesis by ca. 25% after treatment of WT 9-7 cells with 5 mM 2-DG for 48 h.

Table 2. The relative standard deviation (RSD) for ATP in 300-fold diluted cell lysates (n = 2–3).

Samples	Added, μM	RSD (%)
lysate from untreated SW480 cancer cells	125	5.87
	250	9.01
	375	9.88
lysate from SW480 cancer cells treated with 2-DG	125	4.17
	250	3.86
	375	4.15

This means that the effective control of the excess energy production, necessary for cancer progression, can be achieved by suppressing the intracellular ATP level, enabling the inhibition of the tumor growth and metastasis.

In our previous studies, we have utilized an “On-Off” switching DNA aptamer for transfection of the SW480 cancer cells, using Lipofectamine carriers, for monitoring of ATP levels in untreated and oligomycin-treated SW480 cells [49]. The images of fluorescence emission from the aptamer probe in transfected cells were successfully acquired with a Nikon Eclipse TE300 inverted light microscope with fluorescence filters. Therefore, the aptasensor developed in the present work has potential for future utilization in imaging of ATP in cancer cells. It can also aid in the development of new methods of energy production modulation, enabling the inhibition of cancer growth and metastasis. Hence, the proposed biosensing assay may enable the development of new anticancer therapies based on reprogramming the energy production in cancer cells.

3. Materials and Methods

3.1. Chemicals

The novel DNA aptamer beacon probe, designed for recognition of ATP, consisted of a 37-mer oligonucleotide strand and a fluorophore-quencher pair (FAM-Dabcyl) attached to the ends of the strand with the following sequence: 5'-FAM-ATTCTCTCACCTGGGGGAG-TATTGCGGAGGAAGGTAT-Dabcyl-3'. It was synthesized by the FUTUREsynthesis Sp. z o.o. Poznan, Poland. The purity of this oligonucleotide was tested with HPLC. Adenosine 5'-triphosphate disodium salt hydrate (ATP), guanosine 5'-triphosphate sodium salt hydrate (GTP), cytidine 5'-triphosphate disodium salt (CTP), uridine 5'-triphosphate trisodium salt dihydrate (UTP), trizma hydrochloride (Tris-HCl), magnesium chloride (MgCl_2), sodium chloride (NaCl), and 2-deoxyglucose (2-DG) were obtained from Sigma-Aldrich Chemical Company (St. Louis, MO, USA). All chemicals were of analytical grade purity. Aqueous solutions were prepared with freshly deionized water with 18.2 M Ω cm resistivity (Millipore, Poland). All concentrations of added reagents cited in this paper are final concentrations obtained after mixing, unless otherwise noted.

3.2. Instrumentation

The fluorescence spectra were recorded using Spectrometer model LS55 (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA), with a 20 kW pulsed Xenon light source and a photomultiplier tube detector. The excitation and emission slit widths were set to 5.0 nm and scan speed to 500 nm/min. The excitation wavelength was set to $\lambda_{\text{ex}} = 480$ nm. The measurements were performed in 20 mM Tris-HCl buffer + 100 mM NaCl + 5 mM MgCl_2 solutions with pH 7.4. During the temperature dependence experiments, the temperature was scanned stepwise

with a step height of 2 °C, and measurements were performed after 1 min of waiting at each temperature.

3.3. Cell Culture

The experiments with cancer cells were performed using a SW480 cell line purchased from ATCC (LGC Standards Sp. z o.o., Lomianki, Poland). The cells were cultured in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium) with added 10% FBS (fetal bovine serum, Gibco, Rockville, MD, USA) and were maintained in a humidified air atmosphere containing 5% CO₂ at 37 °C (Shel Lab Model 2123-TC CO₂ Incubator Cornelius, OR, USA). Every 3 days, the cells were further subcultured. The cells remaining after the experiments were handled according to safety protocols.

3.4. Cell Lysate

SW480 cells were detached from the culture dish by 2 mL trypsin-EDTA at 37 °C for 5–10 min and centrifuged twice in PBS solution at 0.9 RPM for 3.5 min to pellet the cells. Then, 1500 µL of a lysis buffer containing dimethyl sulfoxide and ethanol (DMSO:EtOH = 1:1) was added to the cells' pellet and centrifuged at 4 °C for 10 min at 14,000 g. The supernatant obtained was 10 times diluted with Tris-HCl buffer and used as a stock solution of the cell lysate in the following experiments. Next, 100 µL of cell lysate with final dilution 1:300 was added to the measurement buffer (20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) with ABP. Then, solutions with different concentrations of ATP (125, 250, and 375 µM ATP, final concentration) were added and fluorescence measurements, at the excitation wavelength $\lambda_{ex} = 480$ nm, were performed.

In experiments with glycolysis inhibitors, the SW480 cell line culture was first exposed to 10 mM 2-DG for 24 h, followed by the cells' lysis.

3.5. Calculations

The calculations of predominant aptaprobe structures and their melting temperatures were performed using the University of Albany web server DINAMelt, providing the program UNAFold ver. 3.9 with a Quikfold application (RNA Institute, University of Albany, Albany, NY, USA).

The curve fitting to the experimental data points was carried out using the simplex routine embedded in the Origin graphing software (OriginLab Corp., Northampton, MA, USA, <https://www.originlab.com/>).

4. Conclusions

In this work, we have developed a rapid and highly sensitive aptamer beacon probe for fluorescent detection of ATP in cancer cell lysate. The proposed aptamer beacon probe is based on the single-stranded oligonucleotide specific to ATP molecules, and is functionalized with a fluorescent dye (FAM) and a quencher (Dabcyl) at the opposite ends of the probe strand. The likely interferents, such as molecules with similar chemical structure, including GTP, CTP, and UTP, have also been investigated. Several experimental parameters, including the incubation time of ABP and the effect of experimental temperature on the biosensing assay performance, were investigated using quenching efficiency (QE) and Stern-Volmer constants (K_{SV}). We have found that the best selectivity of the aptamer beacon probe toward ATP was observed at 40 °C, for which the parameters $K_{SV} = 1093 \text{ M}^{-1}$ and QE = 42% were obtained. The proposed biosensing assay enables the detection of ATP concentration in a 300-fold diluted cells' lysate, obtained from both the untreated SW480 cancer cells, as well as from cells treated with 2-deoxyglucose (2-DG). We have shown that the applied treatment with 2-DG glycolysis inhibitor results in lowering of ATP production by 31.7%. The obtained results indicate that ATP may act as a non-specific cancer biomarker in a multi-panel platform for cancer diagnostics and screening. We have demonstrated that the proposed aptamer beacon probe for fluorometric monitoring of ATP level modulation can serve as a powerful tool in future cancer treatments based on controlling energy

sources in cancer cells and the tumor microenvironment. Since ATP is also formed in many processes other than the cellular respiration, such as in the beta-oxidation, ketosis, lipid- and protein-catabolism, as well as under anaerobic conditions [62], further investigations of slowing down ATP production in cancer cells, which is required for their extensive energy needs for proliferation and metastasis, are warranted.

Author Contributions: Conceptualization, M.S. and K.R.; methodology, K.R. and M.S.; formal analysis, K.R. and M.S.; investigation, K.R.; writing—original draft preparation, K.R. and M.S.; writing—review and editing, M.S. and K.R.; supervision, M.S.; funding acquisition, K.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Program PRELUDIUM 19 of the National Science Centre, Poland, Grant No. 2020/37/N/ST4/02567.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J. Clin.* **2021**, *71*, 209–249. [\[CrossRef\]](#)
2. Xi, Y.; Xu, P. Global colorectal cancer burden in 2020 and projections to 2040. *Transl. Oncol.* **2021**, *14*, 101174. [\[CrossRef\]](#)
3. Siegel, R.L.; Wagle, N.S.; Cercek, A.; Smith, R.A.; Jemal, A. Colorectal cancer statistics, 2023. *CA Cancer J. Clin.* **2023**, *73*, 233–254. [\[CrossRef\]](#)
4. Stobiecka, M.; Ratajczak, K.; Jakiela, S. Toward early cancer detection: Focus on biosensing systems and biosensors for an anti-apoptotic protein survivin and survivin mRNA. *Biosens. Bioelectron.* **2019**, *137*, 58–71. [\[CrossRef\]](#)
5. Ratajczak, K.; Krazinski, B.E.; Kowalczyk, A.E.; Dworakowska, B.; Jakiela, S.; Stobiecka, M. Hairpin–Hairpin Molecular Beacon Interactions for Detection of Survivin mRNA in Malignant SW480 Cells. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10*, 17028–17039. [\[CrossRef\]](#)
6. Ratajczak, K.; Krazinski, B.E.; Kowalczyk, A.E.; Dworakowska, B.; Jakiela, S.; Stobiecka, M. Optical Biosensing System for the Detection of Survivin mRNA in Colorectal Cancer Cells Using a Graphene Oxide Carrier-Bound Oligonucleotide Molecular Beacon. *Nanomaterials* **2018**, *8*, 510. [\[CrossRef\]](#)
7. Stobiecka, M.; Dworakowska, B.; Jakiela, S.; Lukasiak, A.; Chalupa, A.; Zembrzycki, K. Sensing of Survivin mRNA in Malignant Astrocytes Using Graphene Oxide Nanocarrier-Supported Oligonucleotide Molecular Beacons. *Sens. Actuators B* **2016**, *235*, 136–145. [\[CrossRef\]](#)
8. Stobiecka, M.; Chalupa, A.; Dworakowska, B. Piezometric biosensors for anti-apoptotic protein survivin based on buried positive-potential barrier and immobilized monoclonal antibodies. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *84*, 37–43. [\[CrossRef\]](#)
9. Ratajczak, K.; Stobiecka, M. Ternary Interactions and Energy Transfer Between Fluorescein Isothiocyanate, Adenosine Triphosphate, and Graphene Oxide Nanocarriers. *J. Phys. Chem. B* **2017**, *121*, 6822–6830. [\[CrossRef\]](#)
10. Coppi, E.; Pugliese, A.M.; Urbani, S.; Melani, A.; Cerbai, E.; Mazzanti, B.; Bosi, A.; Saccardi, R.; Pedata, F. ATP Modulates Cell Proliferation and Elicits Two Different Electrophysiological Responses in Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells* **2007**, *25*, 1840–1849. [\[CrossRef\]](#)
11. Rajendran, M.; Dane, E.; Conley, J.; Tantama, M. Imaging Adenosine Triphosphate (ATP). *Biol. Bull.* **2016**, *231*, 73–84. [\[CrossRef\]](#)
12. Rigoulet, M.; Bouchez, C.L.; Paumard, P.; Ransac, S.; Cuvellier, S.; Duvezin-Caubet, S.; Mazat, J.P.; Devin, A. Cell energy metabolism: An update. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Bioenerg.* **2020**, *1861*, 148276. [\[CrossRef\]](#)
13. Martinello, T.; Baldoin, M.C.; Morbiato, L.; Paganin, M.; Tarricone, E.; Schiavo, G.; Bianchini, E.; Sandonà, D.; Betto, R. Extracellular ATP signaling during differentiation of C2C12 skeletal muscle cells: Role in proliferation. *Mol. Cell. Biochem.* **2011**, *351*, 183–196. [\[CrossRef\]](#)
14. Salvestrini, V.; Orecchioni, S.; Talarico, G.; Reggiani, F.; Mazzetti, C.; Bertolini, F.; Orioli, E.; Adinolfi, E.; Di Virgilio, F.; Pezzi, A.; et al. Extracellular ATP induces apoptosis through P2X7R activation in acute myeloid leukemia cells but not in normal hematopoietic stem cells. *Oncotarget* **2017**, *8*, 5895–5908. [\[CrossRef\]](#)
15. Fiorillo, M.; Ózsvári, B.; Sotgia, F.; Lisanti, M.P. High ATP Production Fuels Cancer Drug Resistance and Metastasis: Implications for Mitochondrial ATP Depletion Therapy. *Front. Oncol.* **2021**, *11*, 3875. [\[CrossRef\]](#)
16. Di Virgilio, F.; Sarti, A.C.; Falzoni, S.; De Marchi, E.; Adinolfi, E. Extracellular ATP and P2 purinergic signalling in the tumour microenvironment. *Nat. Rev. Cancer* **2018**, *18*, 601–618. [\[CrossRef\]](#)
17. Vultaggio-Poma, V.; Sarti, A.C.; Di Virgilio, F. Extracellular ATP: A Feasible Target for Cancer Therapy. *Cells* **2020**, *9*, 2496. [\[CrossRef\]](#)

18. Di Virgilio, F.; Adinolfi, E. Extracellular purines, purinergic receptors and tumor growth. *Oncogene* **2017**, *36*, 293–303. [\[CrossRef\]](#)
19. Yang, H.; Geng, Y.-H.; Wang, P.; Zhou, Y.-T.; Yang, H.; Huo, Y.-F.; Zhang, H.-Q.; Li, Y.; He, H.-Y.; Tian, X.-X.; et al. Extracellular ATP promotes breast cancer invasion and epithelial-mesenchymal transition via hypoxia-inducible factor 2 α signaling. *Cancer Sci.* **2019**, *110*, 2456–2470. [\[CrossRef\]](#)
20. Yang, H.; Geng, Y.-H.; Wang, P.; Zhang, H.-Q.; Fang, W.-G.; Tian, X.-X. Extracellular ATP promotes breast cancer chemoresistance via HIF-1 α signaling. *Cell Death Dis.* **2022**, *13*, 199. [\[CrossRef\]](#)
21. Fiorillo, M.; Scatena, C.; Naccarato, A.G.; Sotgia, F.; Lisanti, M.P. Bedaquiline, an FDA-approved drug, inhibits mitochondrial ATP production and metastasis in vivo, by targeting the gamma subunit (ATP5F1C) of the ATP synthase. *Cell Death Differ.* **2021**, *28*, 2797–2817. [\[CrossRef\]](#)
22. Zhou, Y.; Tozzi, F.; Chen, J.; Fan, F.; Xia, L.; Wang, J.; Gao, G.; Zhang, A.; Xia, X.; Brasher, H.; et al. Intracellular ATP levels are a pivotal determinant of chemoresistance in colon cancer cells. *Cancer Res.* **2012**, *72*, 304–314. [\[CrossRef\]](#)
23. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **2011**, *144*, 646–674. [\[CrossRef\]](#)
24. Pelicano, H.; Martin, D.; Xu, R.-H.; Huang, P. Glycolysis inhibition for anticancer treatment. *Oncogene* **2006**, *25*, 4633–4646. [\[CrossRef\]](#)
25. Zhao, Y.; Butler, E.; Tan, M. Targeting cellular metabolism to improve cancer therapeutics. *Cell Death Dis.* **2013**, *4*, e532. [\[CrossRef\]](#)
26. Martin, D.S.; Bertino, J.R.; Koutcher, J.A. ATP Depletion + Pyrimidine Depletion Can Markedly Enhance Cancer Therapy: Fresh Insight for a New Approach1. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 6776–6783.
27. Martin, D.S.; Stolfi, R.L.; Colofiore, J.R.; Nord, L.D.; Sternberg, S. Biochemical Modulation of Tumor Cell Energy in Vivo: II. A Lower Dose of Adriamycin is Required and a Greater Antitumor Activity is Induced when Cellular Energy is Depressed. *Cancer Investig.* **1994**, *12*, 296–307. [\[CrossRef\]](#)
28. Stolfi, R.L.; Colofiore, J.R.; Nord, L.D.; Martin, D.S. Enhanced antitumor activity of an adriamycin + 5-fluorouracil combination when preceded by biochemical modulation. *Anti-Cancer Drugs* **1996**, *7*, 100–104. [\[CrossRef\]](#)
29. Stolfi, R.L.; Colofiore, J.R.; Nord, L.D.; Koutcher, J.A.; Martin, D.S. Biochemical Modulation of Tumor Cell Energy: Regression of Advanced Spontaneous Murine Breast Tumors with a 5-Fluorouracil-containing Drug Combination1. *Cancer Res.* **1992**, *52*, 4074–4081.
30. Wang, H.; Li, Y.; Zhang, M.; Wu, D.; Shen, Y.; Tang, G.; Ping, Y. Redox-Activatable ATP-Depleting Micelles with Dual Modulation Characteristics for Multidrug-Resistant Cancer Therapy. *Adv. Healthc. Mater.* **2017**, *6*, 1601293. [\[CrossRef\]](#)
31. Song, X.-R.; Li, S.-H.; Guo, H.; You, W.; Tu, D.; Li, J.; Lu, C.-H.; Yang, H.-H.; Chen, X. Enhancing Antitumor Efficacy by Simultaneous ATP-Responsive Chemodrug Release and Cancer Cell Sensitization Based on a Smart Nanoagent. *Adv. Sci.* **2018**, *5*, 1801201. [\[CrossRef\]](#)
32. Kaushik, N.; Lee, S.J.; Choi, T.G.; Baik, K.Y.; Uhm, H.S.; Kim, C.H.; Kaushik, N.K.; Choi, E.H. Non-thermal plasma with 2-deoxy-D-glucose synergistically induces cell death by targeting glycolysis in blood cancer cells. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 8726. [\[CrossRef\]](#)
33. Chow, L.W.C.; Cheng, K.-S.; Leong, F.; Cheung, C.-W.; Shiao, L.-R.; Leung, Y.-M.; Wong, K.-L. Enhancing tetrandrine cytotoxicity in human lung carcinoma A549 cells by suppressing mitochondrial ATP production. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **2019**, *392*, 427–436. [\[CrossRef\]](#)
34. Maximchik, P.; Abdurakhmanov, A.; Inozemtseva, E.; Tyurin-Kuzmin, P.A.; Zhivotovsky, B.; Gogvadze, V. 2-Deoxy-D-glucose has distinct and cell line-specific effects on the survival of different cancer cells upon antitumor drug treatment. *FEBS J.* **2018**, *285*, 4590–4601. [\[CrossRef\]](#)
35. Ben Sahra, I.; Laurent, K.; Giuliano, S.; Larbret, F.; Ponzio, G.; Gounon, P.; Le Marchand-Brustel, Y.; Giorgetti-Peraldi, S.; Cormont, M.; Bertolotto, C.; et al. Targeting cancer cell metabolism: The combination of metformin and 2-deoxyglucose induces p53-dependent apoptosis in prostate cancer cells. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 2465–2475. [\[CrossRef\]](#)
36. Javaherian, S.; Musheev, M.U.; Kanoatov, M.; Berezovski, M.V.; Krylov, S.N. Selection of aptamers for a protein target in cell lysate and their application to protein purification. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, e62. [\[CrossRef\]](#)
37. Aljohani, M.M.; Cialla-May, D.; Popp, J.; Chinnappan, R.; Al-Kattan, K.; Zourob, M. Aptamers: Potential Diagnostic and Therapeutic Agents for Blood Diseases. *Molecules* **2022**, *27*, 383. [\[CrossRef\]](#)
38. Grabowska, I.; Sharma, N.; Vasilescu, A.; Iancu, M.; Badea, G.; Boukherroub, R.; Ogale, S.; Szunerits, S. Electrochemical Aptamer-Based Biosensors for the Detection of Cardiac Biomarkers. *ACS Omega* **2018**, *3*, 12010–12018. [\[CrossRef\]](#)
39. Huizenga, D.E.; Szostak, J.W. A DNA aptamer that binds adenosine and ATP. *Biochemistry* **1995**, *34*, 656–665. [\[CrossRef\]](#)
40. Zhang, Z.; Oni, O.; Liu, J. New insights into a classic aptamer: Binding sites, cooperativity and more sensitive adenosine detection. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, 7593–7601. [\[CrossRef\]](#)
41. Biniuri, Y.; Luo, G.-F.; Fadeev, M.; Wulf, V.; Willner, I. Redox-Switchable Binding Properties of the ATP-Aptamer. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 15567–15576. [\[CrossRef\]](#)
42. Ng, S.; Lim, H.S.; Ma, Q.; Gao, Z. Optical Aptasensors for Adenosine Triphosphate. *Theranostics* **2016**, *6*, 1683–1702. [\[CrossRef\]](#)
43. Liu, W.; Zhu, X.; Moznab, M.; Nagahara, L.; Hu, T.Y.; Li, C.-Z. Lighting up ATP in cells and tissues using a simple aptamer-based fluorescent probe. *Microchim. Acta* **2021**, *188*, 352. [\[CrossRef\]](#)
44. Guo, Y.; Wu, J.; Ju, H. Target-driven DNA association to initiate cyclic assembly of hairpins for biosensing and logic gate operation. *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 4318–4323. [\[CrossRef\]](#)

45. Zhou, C.; Yu, Z.; Yu, W.; Liu, H.; Zhang, H.; Guo, C. Split aptamer-based detection of adenosine triphosphate using surface enhanced Raman spectroscopy and two kinds of gold nanoparticles. *Microchim. Acta* **2019**, *186*, 251. [\[CrossRef\]](#)
46. Wu, Y.; Wang, C.; Wang, C.; Wang, P.; Chang, X.; Han, L.; Zhang, Y. Multiple Biomarker Simultaneous Detection in Serum via a Nanomaterial-Functionalized Biosensor for Ovarian Tumor/Cancer Diagnosis. *Micromachines* **2022**, *13*, 2046. [\[CrossRef\]](#)
47. Wang, Y.; Luo, J.; Liu, J.; Sun, S.; Xiong, Y.; Ma, Y.; Yan, S.; Yang, Y.; Yin, H.; Cai, X. Label-free microfluidic paper-based electrochemical aptasensor for ultrasensitive and simultaneous multiplexed detection of cancer biomarkers. *Biosens. Bioelectron.* **2019**, *136*, 84–90. [\[CrossRef\]](#)
48. Kuntamung, K.; Jakmunee, J.; Ounnunkad, K. A label-free multiplex electrochemical biosensor for the detection of three breast cancer biomarker proteins employing dye/metal ion-loaded and antibody-conjugated polyethyleneimine-gold nanoparticles. *J. Mater. Chem. B* **2021**, *9*, 6576–6585. [\[CrossRef\]](#)
49. Ratajczak, K.; Lukasiak, A.; Grel, H.; Dworakowska, B.; Jakiela, S.; Stobiecka, M. Monitoring of dynamic ATP level changes by oligomycin-modulated ATP synthase inhibition in SW480 cancer cells using fluorescent “On-Off” switching DNA aptamer. *Anal. Bioanal. Chem.* **2019**, *411*, 6899–6911. [\[CrossRef\]](#)
50. Markham, N.R.; Zuker, M. DINAMelt Web Server for Nucleic Acid Melting Prediction. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, W577–W581. [\[CrossRef\]](#)
51. Markham, N.; Zuker, M. UNAFold: Software for Nucleic Acid Folding and Hybridization. In *Bioinformatics: Structure, Function and Applications*; Keith, J.M., Ed.; Humana Press: Totowa, NJ, USA, 2008; Volume 453, pp. 3–31.
52. Tippiana, R.; Chen, M.C.; Demeshkina, N.A.; Ferré-D’Amaré, A.R.; Myong, S. RNA G-quadruplex is resolved by repetitive and ATP-dependent mechanism of DHX36. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 1855. [\[CrossRef\]](#)
53. Stobiecka, M.; Chalupa, A. DNA Strand Replacement Mechanism in Molecular Beacons Encoded for Detection of Cancer Biomarkers. *J. Phys. Chem. B* **2016**, *120*, 4782–4790. [\[CrossRef\]](#)
54. Slavkovic, S.; Zhu, Y.; Churcher, Z.R.; Shoara, A.A.; Johnson, A.E.; Johnson, P.E. Thermodynamic analysis of cooperative ligand binding by the ATP-binding DNA aptamer indicates a population-shift binding mechanism. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 18944. [\[CrossRef\]](#)
55. Wang, Y.; Wang, Y.; Liu, B. Fluorescent detection of ATP based on signaling DNA aptamer attached silica nanoparticles. *Nanotechnology* **2008**, *19*, 415605. [\[CrossRef\]](#)
56. Wang, D.; Geng, F.; Wang, Y.; Ma, Y.; Li, G.; Qu, P.; Shao, C.; Xu, M. Design of a Fluorescence Turn-on and Label-free Aptasensor Using the Intrinsic Quenching Power of G-Quadruplex to AMT. *Anal. Sci. Int. J. Jpn. Soc. Anal. Chem.* **2020**, *36*, 965–970. [\[CrossRef\]](#)
57. Bing, T.; Mei, H.; Zhang, N.; Qi, C.; Liu, X.; Shanguan, D. Exact tailoring of an ATP controlled streptavidin binding aptamer. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 15111–15114. [\[CrossRef\]](#)
58. Park, Y.; Nim-anussornkul, D.; Vilaivan, T.; Morii, T.; Kim, B.H. Facile conversion of ATP-binding RNA aptamer to quencher-free molecular aptamer beacon. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2018**, *28*, 77–80. [\[CrossRef\]](#)
59. Liu, Z.; Chen, S.; Liu, B.; Wu, J.; Zhou, Y.; He, L.; Ding, J.; Liu, J. Intracellular Detection of ATP Using an Aptamer Beacon Covalently Linked to Graphene Oxide Resisting Nonspecific Probe Displacement. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 12229–12235. [\[CrossRef\]](#)
60. Choi, Y.; Lee, J.H. The combination of tephrosin with 2-deoxy-D-glucose enhances the cytotoxicity via accelerating ATP depletion and blunting autophagy in human cancer cells. *Cancer Biol. Ther.* **2011**, *12*, 989–996. [\[CrossRef\]](#)
61. Zhao, J.; Ma, Y.; Zhang, Y.; Fu, B.; Wu, X.; Li, Q.; Cai, G.; Chen, X.; Bai, X.-Y. Low-dose 2-deoxyglucose and metformin synergically inhibit proliferation of human polycystic kidney cells by modulating glucose metabolism. *Cell Death Discov.* **2019**, *5*, 76. [\[CrossRef\]](#)
62. Dunn, J.; Grider, M.H. Physiology, Adenosine Triphosphate. In *StatPearls*; StatPearls Publishing: Treasure Island, FL, USA, 2023.

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

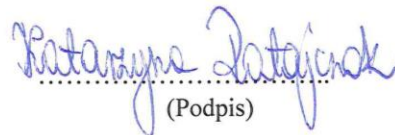
Warszawa, 23.10.2024

Katarzyna Ratajczak
katarzyna_ratajczak@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Nauki Biologiczne
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy K. Ratajczak, M. Stobiecka, (2023), DNA Aptamer Beacon Probe (ABP) for Monitoring of Adenosine Triphosphate Level in SW480 Cancer Cells Treated with Glycolysis Inhibitor 2-Deoxyglucose, *International Journal of Molecular Sciences*, 24(11), mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu metodologii i koncepcji badań, wykonaniu badań opisanych w manuskrypcie, w tym scharakteryzowanie opracowanej sondy, doświadczenia przy użyciu spektroskopii fluorescencyjnej, hodowla komórek i traktowanie ich inhibitorem, a także opracowaniu i analizie wyników, pisaniu i edycji manuskryptu, odpowiedziach na recenzje, wykonywaniu obowiązków autora korespondencyjnego oraz pozyskaniu finansowania.


(Podpis)

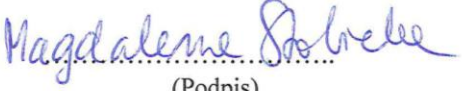
Warszawa, 23.10.2024

Magdalena Stobiecka
magdalena_stobiecka@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Nauki Biologiczne
Szkoly Głównej Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy K. Ratajczak, M. Stobiecka, (2023), DNA Aptamer Beacon Probe (ABP) for Monitoring of Adenosine Triphosphate Level in SW480 Cancer Cells Treated with Glycolysis Inhibitor 2-Deoxyglucose, *International Journal of Molecular Sciences*, 24(11), mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał opracowaniu metodologii i koncepcji badań jak również pisaniu i edycji manuskryptu, odpowiedziach na recenzje.


(Podpis)