

Nowa metoda wyznaczania stałych równowagi tworzenia kompleksów, stężeń oraz współczynników dyfuzji w roztworach i żywych komórkach przy nano- do pikomolarnych stężeniach reagentów. Robert Holyst

Aby zrozumieć jak funkcjonują żywe komórki potrzebujemy informacji na temat ruchu białek w ich wnętrzu oraz oddziaływań tych białek (tworzenia kompleksów) z innymi białkami, błonami komórkowymi i DNA w komórce. Białka tworzące kompleksy w żywych komórkach często występują w małej liczbie kopii. Na przykład w komórce *E. coli* ($\sim 1 \mu\text{m}^3$) występuje 3–5 kopii represora lac. Tworzy on kompleks z pojedynczym operatorem na DNA. Tak więc oba reagenty występują w stężeniu nanomolarnym. Wszystkie obserwacje prowadzone z użyciem mikroskopów konfokalnych wykorzystują fluorescencje (świecenie) do obserwacji białek. Zazwyczaj doczepiamy do białka znacznik, który pobudzony światłem laserowym sam zaczyna świecić. Dzięki temu możemy je obserwować pomimo ich małego rozmiaru rzędu nm (miliardowe części metra). Aby uzyskać liczby dotyczące ruchu i oddziaływań tych białek potrzebujemy modeli i metod eksperymentalnych, dzięki którym poprawnie zinterpretujemy dane uzyskane z pomiarów położenia świecących obiektów oraz czasów świecenia. Zazwyczaj obserwuje się obiekt, który przesuwa się przez ognisko mikroskopu, gdzie jest pobudzany do świecenia światłem laserowym. W naszym projekcie zmieniamy metodologię analizy danych. Zamiast śledzić zmiany położenia poruszającego się białka, przewidujemy po jakim czasie pojawi się w wybranym miejscu w przestrzeni oraz po jakim czasie pojawi się następne białko w tym samym miejscu. Nazwalimy naszą metodę Time of Search (ToS - czas szukania). W ramach niniejszego projektu rozwiniemy tę nową metodę badania ruchu cząstek oraz tworzenia przez nie kompleksów przy bardzo niskich stężeniach (do pM) w roztworach i żywych komórkach. ToS pozwoli na wyznaczenie współczynników dyfuzji reagentów oraz ich dokładnych stężeń, jak również stałych równowagi reakcji kompleksowania. ToS, podobnie jak spektroskopia korelacji fluorescencji (FCS), wykorzystuje detekcję pojedynczych fotonów emitowanych przez fluorescencyjne próbki dyfundujące przez ognisko mikroskopu konfokalnego. Techniki te są jednak komplementarne, a nie redundantne, ze względu na różnice w podejściu do analizy danych. W FCS mierzony jest średni czas jaki próbnik spędza wewnątrz ogniska. ToS daje natomiast informacje dotyczące czasu dojścia próbniaka do ogniska (czy też, innymi słowy, czasu poszukiwania ogniska przez próbnik). Analiza danych FCS podczas badania reakcji kompleksowania wymaga rozwiązywania zaawansowanych równań reakcji-dyfuzji. Jest to szczególnie trudne gdy czas przejścia cząstki przez ognisko jest porównywalny z odwrotnością stałej szybkości reakcji, a więc nie jest spełnione założenie dotyczące przypadków granicznych reakcji wolnych/szybkich. Ponadto, FCS nie funkcjonuje przy stężeniach reagentów poniżej ok. 0,5 nM. Dzięki innej drodze analizy danych – wykorzystującej grupowanie fotonów zamiast ich autokorelacji – ToS pozwoli na prowadzenie pomiarów przy stężeniach próbników niższych o rzędy wielkości. W metodzie tej obserwujemy skumulowaną liczbę próbników docierających do ogniska, co poprawia dokładność pomiarów. Następnie stosujemy względnie proste, analityczne równanie Smoluchowskiego, zaadaptowane do przypadku reakcji limitowanej dyfuzyjnie. Uzupełniamy je o tzw. model wycieczek, aby uwzględnić możliwość wielokrotnego powrotu tego samego próbniaka do ogniska w krótkim czasie. Aby wykazać skuteczność ToS w wyznaczaniu stałych równowagi wykorzystamy reakcję hybrydyzacji oligonukleotydów DNA (**A**, **B**) tworzących dwuniciowy kompleks **AB**. Termodynamika tej reakcji jest znana, co zapewnia dogodny punkt odniesienia dla uzyskiwanych wyników eksperymentalnych. Dla porównania precyzji i dokładności ToS, wykonamy analogiczne eksperymenty z wykorzystaniem FCS oraz rezonansowego transferu energii (FRET). Zademstrujemy również działanie ToS *in vivo*, przeprowadzając pomiary współczynników dyfuzji oraz stężeń próbników w cytoplazmie komórek rakowych. W wyniku projektu wprowadzimy w biologii/biochemii nową metodę wyznaczania współczynników dyfuzji, dokładniejszą i prostszą niż FCS. Będzie to użyteczne narzędzie w badaniu tworzenia kompleksów przez biomolekuły. ToS odwraca przyjętą metodologię pomiarów współczynników dyfuzji opartą o fluorescencję. Daje informacje o ruchu próbników w otoczeniu ogniska mikroskopu, a nie wyłącznie w jego wnętrzu. Jest to rozwiązanie nietrywialne.

