

## Streszczenie

Reakcje tworzenia niekowalencyjnych kompleksów stanowią większość procesów biochemicznych w organizmach żywych. Siła oddziaływania w utworzonym kompleksie – a przez to, jego stabilność - wyznacza się za pomocą stałej równowagi ( $K$ ). Szereg technik analitycznych umożliwia ilościowe określenie  $K$ . Jednak wyłącznie metody oparte na fluorescencji są wystarczająco czułe, aby zmierzyć  $K$  w roztworach o wyjątkowo niskich stężeniach ( $<1$  nM), w małych objętościach ( $<1$   $\mu$ L) i bez potrzeby immobilizacji jednego z reagentów na powierzchni (tak jak w np. przy zastosowaniu technik z użyciem mikrowagi czy powierzchniowego rezonansu plazmonowego).

Ta rozprawa doktorska pokazuje odkrycie i rozwój nowej metody fluorescencyjnej do określania  $K$ . Metoda ta opiera się na obserwacji jasności molekularnej pod wpływem zmian lokalnego środowiska, zwana dalej „metodą analizy jasności”. Spektroskopia korelacji fluorescencyjnej (FCS) określa jasność molekularną jako liczbę fotonów wyświetlanych przez cząsteczki w czasie przed i po utworzeniu kompleksu. Monitorowanie zmiany liczby fotonów umożliwia określenie stężenia tworzonych kompleksów w układzie, a co za tym idzie,  $K$ . Uzyskane wyniki zweryfikowano metodą przenoszenia energii rezonansu fluorescencji (FRET).

Analiza jasności upraszcza podejście analizy FRET wykorzystując wyłącznie **tylko jeden fluorescencyjny (lub znakowany) substrat** bez utraty zalet pomiarowych techniki FRET. Jako modelową reakcję tworzenia kompleksu wybrałem hybrydyzację komplementarnych oligonukleotydów DNA. Czułość metody pozwoliła określić  $K$  dla przy stężeniu próbek równym 80 pM. W takich próbkach zmiana zaledwie 100 wyemitowanych fotonów (w porównaniu z próbką kontrolną) pozwoliła na ilościową analizę wyniku. To ulepszenie nie tylko pozwala na **szybkie wstępne testy do określania interakcji ligandów z lekami lub biomolekułami**, ale także otwiera drogę do ilościowego badania złożonego formowania się w żywych systemach.

Ramy eksperymentalne można podzielić na trzy części. Część wstępna bada kinetykę i stałe równowagi hybrydyzacji par oligonukleotydów metodą

M. O. 21  
K. Bielec