

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **241371**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **432119**

(51) Int.Cl.
G01N 21/77 (2006.01)
G01N 21/64 (2006.01)

(22) Data zgłoszenia: **07.12.2019**

(54) **Sposób wyznaczania stałych równowagi reakcji kompleksowania z wykorzystaniem pomiaru zmiany jasności molekularnej fluoroforu**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
14.06.2021 BUP 12/21

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
19.09.2022 WUP 38/22

(73) Uprawniony z patentu:

**INSTYTUT CHEMII FIZYCZNEJ
POLSKIEJ AKADEMII NAUK,
Warszawa, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**KRZYSZTOF BIELEC, Kraków, PL
GRZEGORZ BUBAK, Katowice, PL
TOMASZ KALWARCZYK, Warszawa, PL
ROBERT HOŁYST, Warszawa, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzec. pat. Joanna Dargiewicz

PL 241371 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób umożliwiający wyznaczenie stałych równowagi poprzez rejestrację zmiany liczby emitowanych fotonów w reakcjach tworzenia kompleksu (np. $A + B \rightleftharpoons AB$), gdzie używany jest wyłącznie jeden fluorescencyjny substrat.

Badanie reakcji tworzenia niekowalencyjnych kompleksów jest niezbędne do zrozumienia i kontrolowania procesów biochemicznych w żywych układach. [1–5] Większość znanych farmaceutyków opiera się na reakcjach kompleksowania substancji czynnej ze specyficznymi składnikami, takimi jak $A + B \rightleftharpoons AB$, enzymy czy receptory. [6–9]

Stała równowagi reakcji (K) pozwala przewidzieć ilość, a przez to stabilność kompleksów przy różnych stężeniach substratów. Istnieje wiele metod wyznaczania K , które można podzielić na metody powierzchniowe (wymagające immobilizacji substratu na powierzchni) oraz metody mierzone bezpośrednio w objętości roztworu. [10–15] Metody objętościowe z kolei można podzielić pod względem wymaganej objętości próbki oraz limitu detekcji stężenia badanego składnika.

Jedynie metody oparte na zjawisku fluorescencji są wystarczająco czułe, aby zmierzyć K bezpośrednio w roztworach o stężeniu subnanomolowym oraz objętości poniżej mikrolitra. Tymi technikami są: spektroskopia korelacji fluorescencji (ang. Fluorescence Correlation Spectroscopy, FCS), miareczkowanie fluorescencyjne (Fluorescence Titration, FLT) i transfer energii rezonansu Förstera (Förster Resonance Energy Transfer, FRET). [16–20]

W celu wyznaczenia stałej równowagi z wykorzystaniem FCS fluorescencyjny substrat oraz utworzony kompleks muszą znacznie różnić się współczynnikami dyfuzji. W przypadku FLT tworzenie kompleksów, obserwowane jest na podstawie zmiany widm absorpcji i emisji (tj. przesunięcie maksimum, kształtu, intensywności) przy różnych stosunkach substratów. FRET natomiast stał się ogólną techniką w pomiarach biochemicznych, ponieważ łączy czułość detekcji substratu przy stężeniach pikomolarnych, nanolitrowe objętości próbki oraz krótki czas naboru danych (pojedyncze sekundy) oraz możliwość mierzenia bezpośrednio w żywych komórkach. [21–23] Głównym warunkiem zastosowania metody FRET jest fluorescencyjne oznakowanie obu substratów dwoma różnymi barwnikami (donorem oraz akceptorem energii). Dodatkowo dwa barwniki muszą znajdować się w bliskim sąsiedztwie (poniżej 10 nm) w obrębie struktury kompleksu.

Celem niniejszego wynalazku było opracowanie sposobu wyznaczania stałych równowagi pozbawionego ograniczeń metod znanych ze stanu techniki, który umożliwi dokonanie analizy przy obserwacji zmiany świecenia wyłącznie jednego fluorescencyjnego substratu, który może być wybarwiony, bądź cechować się własną fluorescencją; sposobu, który nie wymaga precyzyjnej manipulacji chemicznej obu substratów, ani nie wymaga obserwowania różnicy we współczynnikach dyfuzji między fluorescencyjnym substratem a kompleksem.

Cel ten został zrealizowany przez sposób wyznaczania stałych równowagi według niniejszego wynalazku.

A zatem, przedmiotem niniejszego wynalazku jest sposób wyznaczania stałych równowagi dla reakcji tworzenia kompleksów $A + B \rightleftharpoons AB$, w których jeden z substratów jest fluorescencyjny jako taki lub przez znakowanie, charakteryzujący się tym, że obejmuje etapy, w których:

- rejestruje się całkowitą ilość emitowanych fotonów N_f przez fluorescencyjny substrat (A) biorący udział w reakcji bez obecności drugiego niefluorescencyjnego substratu (B),
- wyznacza się objętość konfokalną V_0 podczas kalibracji systemu mikroskopii konfokalnej w zadanych warunkach eksperymentalnych,
- wyznacza się jasność α i stężenie początkowe C_A substratu fluorescencyjnego w pojedynczym pomiarze FCS zgodnie z równaniem (1),

$$V_0 \cdot \alpha \cdot C_A = \frac{N_f}{t} = \chi_0 \quad (1)$$

- wyznacza się jasność γ w układzie, w którym substrat B jest w stechiometrycznym nadmiarze do stężenia C_A lub odwrotnie,
- do fluorescencyjnego substratu (A) dodaje się substrat (B) w celu utworzenia kompleksu (AB),
- na podstawie zależności

$$V_0 \cdot (\alpha \cdot C_A^{eq} + \gamma \cdot C_{AB}^{eq}) = \chi_1 \quad (2)$$

$$K = C_{AB}^{eq} / (C_A^{eq} C_B^{eq}),$$

$$C_A = C_A^{eq} + C_{AB}^{eq} \text{ oraz } C_B = C_B^{eq} + C_{AB}^{eq},$$

$$V_0 \cdot \alpha [C_A - C_{AB}^{eq}] \left[1 + \frac{\gamma}{\alpha} \cdot K \cdot (C_B - C_{AB}^{eq}) \right] = \chi_1 \quad (3)$$

wyznacza się stałą równowagi reakcji tworzenia kompleksu AB.

Korzystnie, w roztworach wodnych oraz *in-vivo* obiektów mikroskopu wykorzystuje imersję wodną (zmniejszenie V_0).

Korzystnie, w badanych układach obiektów mikroskopu o powiększeniu powyżej 60x wykorzystuje imersję olejową (zmniejszenie V_0).

Korzystnie, do rejestrowania całkowitej liczby fotonów jako detektora wykorzystuje się detektory lawinowe pojedynczego fotonu (SPAD) wraz z modułem do skorelowanego w czasie zliczania pojedynczych fotonów (TCSPC).

Korzystnie, fotony rejestrowane są za pomocą matrycy fotodiodowej lub linijki diodowej PDA w celu wykrywania i kodowania danych przestrzennych, lub rejestracji widm emisji fluorescencji, bądź natężenia światła.

Korzystnie, jako źródła światła stosuje się lasery pulsowe z możliwością impulsowego przeplatania (PIE) w celu dokładniejszej filtracji sygnału.

W następstwie zalet i ograniczeń technik fluorescencyjnych Twórcy niniejszego wynalazku opracowali sposób wyznaczania stałych równowagi, który:

- umożliwia dokonanie analizy przy obserwacji zmiany świecenia wyłącznie **jednego fluorescencyjnego substratu**. Substrat może być wybarwiony, bądź cechować się własną fluorescencją;
- nie wymaga precyzyjnej manipulacji chemicznej obu substratów;
- nie wymaga obserwowania różnicy we współczynnikach dyfuzji między fluorescencyjnym substratem, a kompleksem;
- polega wyłącznie na **zarejestrowaniu całkowitej ilości fotonów** emitowanych w trakcie eksperymentu,

oraz cechuje się

- możliwością wyznaczenia stałej K reakcji przy subnanomolowym stężeniu substratów,
- umożliwia analizę, gdy zarówno produkt, jak i każdy z substratów mają zbliżony promień hydrodynamiczny,
- badana próbka jest μl objętości bądź mniejszej,
- krótki czas naboru danych (pomiar zajmujący kilka sekund),
- możliwość zaadoptowania do komercyjnych instrumentów pomiarowych oraz eksperymentów w zakresie mikrofluidyki.

Podstawą sposobu według niniejszego wynalazku jest jasność molekularna (MB), która jest wyznaczana poprzez zmierzenie całkowitej liczby emitowanych fotonów, N_f z ogniskowej, V_0 oraz stężenia fluoroforu, C wyznaczonego z wykorzystaniem FCS, co umożliwia dokładne obliczenie MB z prostego równania $(N_f/V_0C) = MB$. Zmiany lokalnego środowiska mogą słumić lub wzmocnić MB fluoroforu. W literaturze można znaleźć przykłady wykorzystania zmian MB spowodowanych lokalnymi fluktuacjami środowiska fluoroforu do opracowania czujników lepkości czy wskaźników stężenia jonów. [24–26] Twórcy niniejszego wynalazku wykorzystali to zjawisko obserwując zmiany liczby emitowanych fotonów w trakcie reakcji tworzenia kompleksu, stosując wyłącznie jeden fluorescencyjny substrat.

W celu wyznaczenia stałej K reakcji $A + B \rightleftharpoons AB$, najpierw mierzona jest całkowita liczba emitowanych fotonów N_f przez fluorescencyjny substrat (A) biorący udział w reakcji bez obecności drugiego niefluorescencyjnego substratu (B). Wartość N_f jest proporcjonalna do czasu naboru sygnału t oraz stężenia substratu C_A o jasności α wzbudzonego w objętości konfokalnej V_0 . Średnią liczbę fotonów emitowanych w jednostce czasu, X_0 można zapisać jako:

$$V_0 \cdot \alpha \cdot C_A = \frac{N_f}{t} = X_0 \quad (1)$$

Po dodaniu substratu (B), możliwe jest utworzenie kompleksu (AB). W tej reakcji jedynymi składnikami fluorescencyjnymi w roztworze są A i AB . Dlatego równanie (1) przyjmuje postać:

$$V_0 \cdot (\alpha \cdot C_A^{eq} + \gamma \cdot C_{AB}^{eq}) = \chi_1 \quad (2)$$

Po utworzeniu kompleksu AB jasność substratu α zmienia się na γ w wyniku zmiany jego lokalnego środowiska. W równaniu (2) C_A^{eq} oraz C_{AB}^{eq} oznaczają równowagowe stężenia fluorescencyjnych składników w mieszaninie, opisane relacją $K = C_{AB}^{eq} / (C_A^{eq} \cdot C_B^{eq})$. Stężenia początkowe można natomiast zapisać, jako $C_A = C_A^{eq} + C_{AB}^{eq}$ oraz $C_B = C_B^{eq} + C_{AB}^{eq}$.

Po przekształceniu i podstawieniu zmiennych do Równania 2, otrzymano:

$$V_0 \cdot \alpha [C_A - C_{AB}^{eq}] \left[1 + \frac{\gamma}{\alpha} \cdot K \cdot (C_B - C_{AB}^{eq}) \right] = \chi_1 \quad (3)$$

Równanie (3), zależy od parametrów, które można uzyskać eksperymentalnie:

- objętość konfokalna V_0 jest definiowana podczas kalibracji systemu w zadanych warunkach eksperymentalnych,
- zarówno α , jak i stężenie początkowe C_A substratu fluorescencyjnego określa się w pojedynczym pomiarze FCS zgodnie z (1),
- jasność γ wyznaczana jest w eksperymencie, w którym substrat B jest w stechiometrycznym nadmiarze do stężenia C_A lub odwrotnie.

W miarę wzrostu stosunku C_B / C_A funkcja $cr(C_B)$ zaczyna przybierać kształt izotermy Langmuira (dla $\alpha < \gamma$) bądź jej odwrotność ($\alpha > \gamma$), patrz Fig. 1.

Korzystne parametry aparaturowe oraz eksperymentalne

- Korzystnie, sposób może być stosowany w systemach mikroskopii konfokalnych.
- Korzystnie, do pomiarów w roztworach wodnych oraz *in-vivo*, obiektyw mikroskopu powinien wykorzystywać immersję wodną (zmniejszenie V_0).
- Korzystnie, do pomiarów w roztworach o współczynniku załamania światła powyżej 1.34 i dla obiektywów o powiększeniu powyżej 60x powinno wykorzystywać się immersję olejową (zmniejszenie V_0).
- Korzystnie, do rejestrowania całkowitej liczby fotonów jako detektora wykorzystuje się detektory lawinowe pojedynczego fotonu (SPAD) wraz z modułem do skorelowanego w czasie zliczania pojedynczych fotonów (TCSPC).
- Korzystnie, sposób może być stosowany, gdy fotony rejestrowane są za pomocą matrycy fotodiodowej lub liniiki diodowej PDA. Umożliwia to wykrywanie i kodowanie danych przestrzennych, rejestrację widm emisji fluorescencji, a także natężenia światła padającego.
- Jako źródła światła korzystnie, stosuje się lasery pulsowe z możliwością impulsowego przeplatania (PIE) w celu dokładniejszej filtracji sygnału.
- Korzystnie, substancja fluorescencyjna jest czuła na zmiany lokalnego otoczenia umożliwiając zmianę jasności w stopniu co najmniej 5% względem wartości przed utworzeniem kompleksu $0.05 / < \Delta MB = 1 - (\gamma/\alpha)$.
- Korzystny jest krótki czas analizy, dzięki czemu istnieje możliwość badania związków mało-stabilnych chemicznie.

Korzystne przykłady realizacji wynalazku

Przykład 1

Sposób wyznaczania stałych równowagi został sprawdzony na modelowej parze komplementarnych krótkich nici DNA, wyznakowanych z wykorzystaniem komercyjnie dostępnych barwników ATTO488 lub ATTO647N. Eksperymenty zostały zaplanowane tak, aby kompleks badanej reakcji był wybarwiony wyłącznie jednym barwnikiem. Dodatkowo zwalidowano niniejszy sposób z wykorzystaniem znanej metody analizy stałej równowagi FRET. W tym celu przygotowano pomiary, w których kompleks zawierał dwie wybarwione pary oligonukleotydów, zarówno barwnikiem ATTO488, jak i ATTO647N. Zaprojektowane pary DNA przedstawiono na Fig. 2.

Oligonukleotydy zostały przygotowane w roztworze buforu fosforanowego (PB) o stężeniu 20 mM, pH = 7,4 bez dodatku chlorku sodu. Ażeby zapobiec akumulacji oligonukleotydów na granicy faz próbki, do buforu reakcyjnego dodano surfaktant (Tween20) o stężeniu wypadkowym w roztworze 0,002%. Po zmieszaniu próbki inkubowano w temperaturze 25°C. Pomiary wykonano na odwróconym

mikroskopie konfokalnym wyposażonym w pulsowy system kontroli laserów wraz z detektorem lawinowym pojedynczego fotonu. Mikroskop konfokalny wyposażony w obiektyw immersyjny o 60-krotnym powiększeniu umożliwia zlokalizowanie ogniska konfokalnego wewnątrz próbki. Wykonując pomiar FCS dla barwnika o znanym współczynniku dyfuzji (np. Rodamina 110) wyznacza się objętość konfokalną (detekcji) V_0 . Po wzbudzeniu próbki z wykorzystaniem lasera o odpowiedniej długości fali (485 nm oraz 635 nm), wyemitowane fotony trafiają tą samą drogą do układu detekcji po uprzednim wycięciu długości fali światła wzbudzanego. Każdy foton, który trafił do detektora ma przypisany rzeczywisty czas rejestracji od początku trwania eksperymentu. Na tej podstawie można wyliczyć ile średnio w danej jednostce czasu trafia fotonów do detektora χ . Dodatkowo istnieje możliwość rejestracji fotonów za pomocą matrycy fotodiodowej lub linijki diodowej PDA. Takie rozwiązanie pozwala na wykrywanie i kodowanie danych przestrzennych, a także energii i natężenia światła padającego. Detektor matrycowy umożliwia jednoczesną rejestrację natężenia promieniowania odpowiadającego różnym długościom fali. W związku z tą cechą wynikiem pomiaru mogą być rozkłady widm. Detektor ten ma taki sam czas reakcji jak indywidualny detektor fotodiodowy, ale pozwala na zebranie znacznie większej ilości informacji. Rozwiązanie to jednak może wiązać się ze stratami pod kątem rozdzielczości rejestracji fotonów. Dlatego do eksperymentów dla reakcji w stężeniach nanomolarnych wykorzystano detektory lawinowe pojedynczego fotonu (SPAD) wraz z modułem do skorelowanego w czasie zliczania pojedynczych fotonów (TCSPC).

W eksperymentach kalibracyjnych V_0 dla niebieskiego oraz czerwonego lasera wynosiły odpowiednio 0,280 oraz 0,440 femtolitra. Niezależnie dla każdej z wybarwionych nici przeprowadzono pomiar FCS w celu wyznaczenia jasności α . Wartości te wynosiły 13000 i 3600 zliczeń fotonów na sekundę na molekułę, odpowiednio dla nici wybarwionych ATTO488 oraz ATTO647N. Jasności kompleksów γ wyznaczone są przy dużym nadmiarze niewybarwionych komplementarnych nici oligonukleotydów. Dla kompleksu par 3'488/NN zaobserwowano 22% wzrost (16000) natomiast dla NN/647N nastąpił 5% spadek (3300) jasności molekularnej wyrażonej w jednostce [liczba zliczeń/sekunda/molekuła], patrz Fig. 2. W celu wyznaczenia stałych równowagi, przeprowadzono eksperymenty miareczkowania z zachowaniem stałego stężenia wybarwionych nici w zakresie od 10 pM do 30 nM. Wraz ze zwiększeniem stężenia niewybarwionej nici w mieszaninie następuje wzrost liczby tworzonych kompleksów, co można zaobserwować na podstawie zmiany całkowitej liczby zliczanych fotonów przez detektor (Fig. 3). W przypadku pary 3'488/NN możliwe było wyznaczenie stałych równowagi nawet przy stężeniu 80 pM wybarwionej nici.

W celu walidacji metody wykonano analizę metodą FRET dla podwójnie wybarwionej pary (488/647N), lewa część Fig. 2. Analiza FRET polega na obserwacji zmiany wydajności transferu energii liczonego z wykorzystaniem:

$$FRET_{eff} = \frac{I_{acc}}{I_{acc} + \eta \cdot I_{don}} \quad (4)$$

gdzie, I_{acc} i I_{don} to intensywności emitowanych fotonów po pulsie lasera wzbudzającego barwnik donora (ATTO488), osobno zarejestrowane dla rejestrujących fotony z donora oraz z akceptora energii (ATTO647N). Czynniki η natomiast jest wartością korekcyjną zależną od układu optycznego oraz warunków eksperymentalnych. W naszym systemie η wynosi 1.38. Stałą równowagi z wykorzystaniem FRET wyznacza się z równania:

$$FRET_{eff} = \frac{C_{AB}^{eq} \cdot FRET_{MAX}}{C_A} \quad (5)$$

gdzie, $FRET_{MAX}$ to maksymalna wydajność transferu energii dla danego kompleksu (dla pary 488/647N, $FRET_{MAX} = 0.34$). Uzyskanie K następuje przez rozwiązanie równania kwadratowego, w którym niewiadomą jest C^{eq} .

Przykładowe wyniki analizy zmiany jasności dla pojedynczo znakowanych par oligonukleotydów przedstawiono na Fig. 3, gdzie:

- Kompleks utworzony przez reakcje nici wybarwionej ATTO488 z nieznakowaną komplementarną nicią zwiększa o 22% jasność molekularną względem inicjującej nici substratu.
- W przypadku nici wybarwionej ATTO647N tworzącej kompleks z nieznakowaną komplementarną nicią obserwowany jest 5% spadek jasności kompleksu w stosunku do nici inicjującej.

Podsumowanie wyników uzyskanych z wykorzystaniem metody analizy jasności dla pojedynczo znakowanych par przedstawiono na Fig. 4. Czerwona linia na wykresie reprezentuje uśrednioną wartość stałej równowagi wyznaczonej z wykorzystaniem metody FRET dla podwójnie wybarwionej pary 488/647N.

Sposób analizy zmiany jasności umożliwia wyznaczenie stałych równowagi z tą samą dokładnością co sposób FRET, wykorzystując przy tym wyłącznie jeden wybarwiony substrat. Ta właściwość sposobu według niniejszego wynalazku ułatwia w sposób znaczący projektowanie eksperymentów oraz redukuje problemy związane z doбором barwników i barwieniem obydwu substratów reakcji

Przykład 2

Sposób może być zastosowany również dla par, w których oba substraty są niezależnie znakowane różnymi barwnikami np. tak jak dla analizy FRET. W takich przypadkach zmiana *MB* może być obserwowana osobno dla każdego barwnika. Do tego eksperymentu wykorzystano wcześniej użytą parę oligonukleotydów, w których kompleks posiada barwniki na przeciwnych końcach (488/647N), bądź na tym samym końcu łańcucha (3'488/647N), patrz Fig. 2. W wyniku zmniejszenia odległości między fluoroforami, kompleks 3'488/647N posiada zwiększoną wydajność transferu energii (FRET) równą 0,88.

Eksperymenty dla par 3'488/647N oraz 488/647N przeprowadzono przy tych samych warunkach pomiarowych, co dla pojedynczo znakowanych kompleksów. Dla obu par oligonukleotydów eksperymenty były prowadzone przy stałym stężeniu nici znakowanej ATTO488 (C_A), natomiast nić komplementarna (z ATTO647N) była dodawana w coraz wyższym stężeniu (C_B). Liczba fotonów emitowanych w czasie (skorygowana o tło) była analizowana niezależnie dla kanału donora („niebieski” barwnik, ATTO488) oraz dla kanału akceptora („czerwony” barwnik, ATTO647N).

W kanale niebieskim, oligonukleotyd znakowany ATTO488 posiada *MB* proporcjonalną do początkowego stężenia oligonukleotydów. Po dodaniu nici z akceptorem następuje równowagowe tworzenie kompleksu, którego *MB* w wyniku transferu energii maleje. W analizie kanału czerwonego, ze względu na właściwości spektralne donora, *MB* jest zbliżona do sygnału tła. Po dodaniu komplementarnej nici w wyniku hybrydyzacji, energia jest transferowana z donora do akceptora i emitowana jako fotony przez cząsteczkę akceptora, zwiększając przy tym *MB*. Na Fig. 5 przedstawiono wyniki zmiany ilości wyemitowanych fotonów w funkcji stężenia akceptora, dla obu kanałów.

Uśrednione wartości *K* dla metody FRET oraz analizy zmiany jasności niezależnie od koloru kanału przedstawiono w Tabeli 1. Z kolei, średnie stałe równowagi ze wszystkich serii eksperymentalnych uzyskanych z wykorzystaniem metody analizy jasności dla par 3'488/647N i 488/647N to $(3,4 \pm 1,1) \cdot 10^9$ i $(1,2 \pm 0,8) \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$. Dla każdego przypadku barwienia uzyskane wyniki z wykorzystaniem analizy jasności dają równoznaczne wyniki z wartościami uzyskanymi z wykorzystaniem FRET.

Natomiast różnica *K* między podwójnie wybarwionymi parami sugeruje, że para z barwnikami na tym samym końcu kompleksu (3'488/647N) ma dodatkowe oddziaływanie w porównaniu z parą z jednym barwnikiem. Ta stabilizacja kompleksu, wynika prawdopodobnie z oddziaływań Van der Waalsa między barwnikami o poliaromatycznej budowie.

T a b e l a 1: Stałe równowagi, (*K*) wyznaczone z wykorzystaniem metody FRET oraz metody zmiany jasności dla podwójnie znakowanych nici DNA.

	$K \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$		
	FRET	Metoda jasności	
		Kanał niebieski	Kanał czerwony
3'488/647N	3.5 ± 1.9	2.9 ± 0.9	3.9 ± 1.1
488/647N	1.1 ± 0.5	0.9 ± 0.7	1.4 ± 0.9

Przykład 3

Kolejnym przykładem jest zastosowanie opisanego sposobu do wyznaczenia stałej równowagi tworzenia kompleksu dla doksorubicyny (DOX) – leku przeciwnowotworowego z grupy antracyklin. Cytotoksyczne właściwości DOX, głównie związane są z tworzeniem kompleksu między lekiem a DNA komórki. Obecność doksorubicyny w komórkach eukariotycznych destabilizuje szlaki metaboliczne, a w szczególności prawidłową replikację oraz transkrypcję prowadząc do apoptozy. W literaturze stała równowagi (*K*) dla reakcji DOX + DNA w zależności od metody pomiarowej waha się w przedziale od 10_5 nawet do 10_8 M^{-1} w eksperymentach *in-vitro* oraz *in-vivo* włącznie. [16, 20] Powyższe dane wskazują

że pomimo zastosowania doksorubicyny jako chemioterapeutyku od 1974 roku, nadal nie poznano poprawnego opisu ilościowego reakcji.

Zakłada się, że oddziaływanie cząsteczki DOXA z DNA spowodowane jest interakcją z kilkoma parami zasad (BP) budującymi łańcuch DNA (wartości literaturowe to od 2 do 4 par zasad). Pary te nazywa się miejscem wiążącym (ang. binding site). Do 2014 roku tylko jedna praca pokazała, że wiązanie doksorubicyny do DNA przebiega dwuetapowo. [27] W tej pracy, pierwszy etap reakcji występuje w przypadku małych ilości leku względem dostępnych miejsc wiązania. W tym etapie pojedyncza cząsteczka leku wiąże się do miejsca wiązania, tak jak zakładano wcześniej. Natomiast drugi etap reakcji występuje w sytuacji, gdy liczba cząsteczek doksorubicyny zaczyna się zbliżać do ilości miejsc aktywnych w badanym układzie. Wtedy następuje wiązanie się drugiej cząsteczki leku do uprzednio zajętego miejsca.

Na Fig. 6 przedstawiono wyniki prezentujące a) ilość wyemitowanych fotonów przez DOX i kompleks DOX-DNA oraz b) różnicę między tymi liczbami w funkcji rosnącego stężenia DOX względem DNA.

Biorąc pod uwagę powyższe problemy, zastosowano sposób analizy zmiany jasności będący przedmiotem tego zgłoszenia patentowego do zbadania reakcji tworzenia kompleksu cząsteczki DOX z DNA. W eksperymentach wykorzystano modelowe DNA o długości 69 BP. Jako liczbę par zasad przypadających na jedno miejsce wiążące wybrano uśrednioną wartość literaturową równą 3. W celu wzbudzenia cząsteczki leku zastosowano światło lasera o długości fali 485 nm. Pierwszym krokiem w celu zbadania reakcji było zaobserwowanie zmiany świecenia kompleksu w stałym stężeniu DNA (100 nM BP), względem zmiennego stężenia DOX (od 0 do 200 nM). Na Fig. 6 przedstawiono zmianę ilości zliczeń fotonów względem stosunku C_{DOX}/C_{BP} .

Fig. 6, b) wskazuje trzy obszary stężeń (rozdzielone liniami przerywanymi), w których zmienia się ilość wyemitowanych fotonów. Obszary te można przyporządkować trzem frakcjom składników o różnej jasności: 1) pierwszy przedział opisuje sytuację, w której cząsteczki DOX zajmują kolejne miejsca wiążące ($C_{DOX}/C_{BP} < 0,4$); molekule leku w tym etapie zmniejsza jasność o około 10 razy, 2) zajęte miejsca wiążące umożliwiają podczepienie kolejnej cząsteczki leku ($0,4 < C_{DOX}/C_{BP} < 0,7$); druga cząsteczka DOX ze względu na częściowe wysycenie oddziaływań w trakcie utworzenia pierwszego kompleksu, zmniejsza swoją jasność średnio 2,5 razy w trakcie interkalacji, 3) ostatni przedział wskazuje na wysycenie wszystkich możliwych miejsc wiążących; obserwowany wzrost zliczeń jest spowodowany zwiększeniem ilości nieoddziałujących cząsteczek leku w mieszaninie.

Na Fig. 7 przedstawiono analizę kompleksu DOX-DNA z wykorzystaniem metody zmiany jasności, a) Schemat jednoetapowej reakcji, b) Wyniki zmiany liczby emitowanych fotonów wraz z dopasowaną funkcją dla jednoetapowej reakcji, c) Schemat dwuetapowej reakcji wraz z zaznaczonymi przedziałami stężeń, w których spodziewane są poszczególne procesy w mieszaninie, d) Wyznaczenie stałej równowagi dla pierwszego etapu reakcji, e) Dopasowanie funkcji w całym zakresie stężeń dla dwuetapowej reakcji.

W eksperymentach porównano zastosowanie metody zmiany jasności zarówno do reakcji jedno-, jak i dwuetapowej. Wyniki dla analizy reakcji przedstawiono na Fig. 7. Uzyskane wyniki wskazują, że stała równowagi w pierwszym etapie reakcji ($7,8 \pm 0,3$) 10^7 M^{-1} jest ponad 40-krotnie większa od drugiego etapu reakcji ($1,9 \pm 0,3$) 10^6 M^{-1} . Przeprowadzona analiza pokazuje, że, sposób według niniejszego wynalazku jest czuły nawet na drobne zmiany jasności składników mieszaniny. Opracowana metodologia umożliwia analizę oddziaływań poprzez wyznaczenie stałej równowagi oraz poznanie czy też potwierdzenie schematu reakcji.

Cytowana literatura

- [1] Chang-Deng Hu, Yurii Chinenov, and Tom K Kerppola. Visualization of interactions among bzip and rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Molecular cell*, 9(4):789–798, 2002.
- [2] Krzysztof Bielec, Krzysztof Sozanski, Marco Seynen, Zofia Dziekan, Pieter Rein ten Wolde, and Robert Holyst. Kinetics and equilibrium constants of oligonucleotides at low concentrations, hybridization and melting study. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 21(20):10798–10807, 2019.
- [3] JJ van Van Rood, A Van Leeuwen, and JS Ploem. Simultaneous detection of two cell populations by two-colour fluorescence and application to the recognition of b-cell determinants. *Nature*, 262(5571):795, 1976.

- [4] Karina Kwapiszewska, Tomasz Kalwarczyk, Bernadeta Michalska, Krzysztof Szczepański, Jędrzej Szymański, Paulina Patalas-Krawczyk, Tomasz Andryszewski, Michalina Iwan, Jerzy Duszyński, and Robert Holyst. Determination of oligomerization state of drpl protein in living cells at nanomolar concentrations. *Scientific reports*, 9(1):5906, 2019.
- [5] Nikoleta G Tsvetanova, Roshanak Irannejad, and Mark von Zastrow. G protein- coupled receptor (gpcr) signaling via heterotrimeric g proteins from endosomes. *Journal of Biological Chemistry*, 290(11):6689–6696, 2015.
- [6] Paola Gilli, Valeria Ferretti, Gastone Gilli, and Pier Andrea Borea. Enthalpy-entropy compensation in drug-receptor binding. *The Journal of Physical Chemistry*, 98(5):1515–1518, 1994.
- [7] Andre De Lean, JMand Stadel, and RJ Lefkowitz. A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of the adenylate cyclase-coupled beta-adrenergic receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 255(15):7108–7117, 1980.
- [8] Hao Lu and Peter J Tonge. Drug-target residence time: critical information for lead optimization. *Current opinion in chemical biology*, 14(4):467–474, 2010.
- [9] Sayeed Ur Rehman, Tarique Sarwar, Mohammed Amir Husain, Hassan Mubarak Ishqi, and Mohammad Tabish. Studying non-covalent drug-dna interactions. *Archives of biochemistry and biophysics*, 576:49–60, 2015.
- [10] Andreea Olaru, Cameia Bala, Nicole Jaffrezic-Renault, and Hassan Y Aboul-Enein. Surface plasmon resonance (spr) biosensors in pharmaceutical analysis. *Critical reviews in analytical chemistry*, 45(2):97–105, 2015.
- [11] Yang Liu, Xiao Yu, Rui Zhao, Di-Hua Shangguan, Zuyi Bo, and Guoquan Liu. Real time kinetic analysis of the interaction between immunoglobulin g and histidine using quartz crystal microbalance biosensor in solution. *Biosensors and Bioelectronics*, 18(11):1419–1427, 2003.
- [12] BD Rao, DH Buttlair, and M Cohn. 31p nmr studies of the arginine kinase reaction, equilibrium constants and exchange rates at stoichiometric enzyme concentration. *Journal of Biological Chemistry*, 251(22):6981–6986, 1976.
- [13] Lee Fielding. Nmr methods for the determination of protein-ligand dissociation constants. *Current topics in medicinal chemistry*, 3(1):39–53, 2003.
- [14] Nichola C Garbett, Patricia A Ragazzon, and Jonathan B Chaires. Circular dichroism to determine binding mode and affinity of ligand-dna interactions. *Nature Protocols*, 2(12):3166, 2007.
- [15] Ilian Jelesarov and Hans Rudolf Bosshard. Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition. *Journal of molecular recognition*, 12(1):3–18, 1999.
- [16] Xuzhu Zhang, Andrzej Poniewierski, Krzysztof Sozański, Ying Zhou, Anna Brzozowska-Elliott, and Robert Holyst. Fluorescence correlation spectroscopy for multiple-site equilibrium binding: a case of doxorubicin-dna interaction. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 21(3):1572–1577, 2019.
- [17] Nina A Moor, Inna A Vasil'eva, Rashid O Anarbaev, Alfred A Antson, and Olga I Lavrik. Quantitative characterization of protein-protein complexes involved in base excision dna repair. *Nucleic acids research*, 43(12):6009–6022, 2015.
- [18] Craig A Gelfand, G Eric Plum, Sławomir Mielewczyk, David P Remeta, and Kenneth J Breslauer. A quantitative method for evaluating the stabilities of nucleic acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(11) :6113–6118, 1999.
- [19] Iseult Lynch and Kenneth A Dawson. Protein-nanoparticle interactions. *Nano today*, 3(1–2):40–47, 2008.
- [20] Marta Airoidi, Giampaolo Barone, Giuseppe Gennaro, Anna Maria Giuliani, and Mauro Giustini. Interaction of doxorubicin with polynucleotides, a spectroscopic study. *Biochemistry*, 53(13):2197–2207, 2014.
- [21] Lili Cao, Liwei Cheng, Zhengyong Zhang, Yi Wang, Xianxia Zhang, Hui Chen, Baohong Liu, Song Zhang, and Jilie Kong. Visual and high-throughput detection of cancer cells using a graphene oxide-based fret aptasensing microfluidic chip. *Lab on a Chip*, 12(22):4864–4869, 2012.

- [22] Chun-yang Zhang and Lawrence W Johnson. Microfluidic control of fluorescence resonance energy transfer: breaking the fret limit. *Angewandte Chemie International Edition*, 46(19):3482–3485, 2007.
- [23] Yael Phillip, Vladimir Kiss, and Gideon Schreiber. Protein-binding dynamics imaged in a living cell. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(5):1461–1466, 2012.
- [24] Edward L Rachofsky, Roman Osman, and JB Alexander Ross. Probing structure and dynamics of dna with 2-aminopurine: effects of local environment on fluorescence. *Biochemistry*, 40(4):946–956, 2001.
- [25] Cristobal G Dos Remedios and Pierre DJ Moens. Fluorescence resonance energy transfer spectroscopy is a reliable "ruler" for measuring structural changes in proteins: Dispelling the problem of the unknown orientation factor. *Journal of structural biology*, 115(2):175–185, 1995.
- [26] Salvatore AE Marras, Fred Russell Kramer, and Sanjay Tyagi. Efficiencies of fluorescence resonance energy transfer and contact-mediated quenching in oligonucleotide probes. *Nucleic acids research*, 30(21):e122–e122, 2002.
- [27] Cristina Perez-Arnaiz, Natalia Busto, Jose M Leal, and Begona Garcia. New insights into the mechanism of the dna/doxorubicin interaction. *The Journal of Physical Chemistry B*, 118(5) :1288–1295, 2014.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wyznaczania stałych równowagi dla reakcji tworzenia kompleksów $A + B \rightleftharpoons AB$, w których jeden z substratów jest fluorescencyjny jako taki lub przez znakowanie, **znamienny tym**, że obejmuje etapy, w których:
 - rejestruje się całkowitą ilość emitowanych fotonów N_f przez fluorescencyjny substrat (A) biorący udział w reakcji bez obecności drugiego niefluorescencyjnego substratu (B),
 - wyznacza się objętość konfokalną V_0 podczas kalibracji systemu mikroskopii konfokalnej w zadanych warunkach eksperymentalnych,
 - wyznacza się jasność α i stężenie początkowe C_A substratu fluorescencyjnego w pojedynczym pomiarze FCS zgodnie z równaniem (1),

$$V_0 \cdot \alpha \cdot C_A = \frac{N_f}{t} = \chi_0 \quad (1)$$

- wyznacza się jasność γ w układzie, w którym substrat B jest w stechiometrycznym nadmiarze do stężenia C_A lub odwrotnie,
- do fluorescencyjnego substratu (A) dodaje się substrat (B) w celu utworzenia kompleksu (AB),
- na podstawie zależności

$$V_0 \cdot (\alpha \cdot C_A^{eq} + \gamma \cdot C_{AB}^{eq}) = \chi_1 \quad (2)$$

$$K = C_{AB}^{eq} / (C_A^{eq} C_B^{eq}),$$

$$C_A = C_A^{eq} + C_{AB}^{eq} \text{ oraz } C_B = C_B^{eq} + C_{AB}^{eq},$$

$$V_0 \cdot \alpha [C_A - C_{AB}^{eq}] \left[1 + \frac{\gamma}{\alpha} \cdot K \cdot (C_B - C_{AB}^{eq}) \right] = \chi_1 \quad (3)$$

wyznacza się stałą równowagi reakcji tworzenia kompleksu AB .

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że w roztworach wodnych oraz *in-vivo* obiektów mikroskopu wykorzystuje immersję wodną (zmniejszenie V_0).
3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że w badanych układach obiektów mikroskopu o powiększeniu powyżej 60x wykorzystuje immersję olejową (zmniejszenie V_0).
4. Sposób według któregośkolwiek z zastrz. 1–3, **znamienny tym**, że do rejestrowania całkowitej liczby fotonów jako detektora wykorzystuje się detektory lawinowe pojedynczego fotonu

(SPAD) wraz z modulem do skorelowanego w czasie zliczania pojedynczych fotonów (TCSPC).

5. Sposób według któregośkolwiek z zastrz. 1–3, **znamienny tym**, że fotony rejestrowane są za pomocą matrycy fotodiodowej lub linijki diodowej PDA w celu wykrywania i kodowania danych przestrzennych, lub rejestracji widm emisji fluorescencji, bądź natężenia światła.
6. Sposób według któregośkolwiek z zastrz. 1–5, **znamienny tym**, że jako źródła światła stosuje się lasery pulsowe z możliwością impulsowego przeplatania (PIE) w celu dokładniejszej filtracji sygnału.

Rysunki

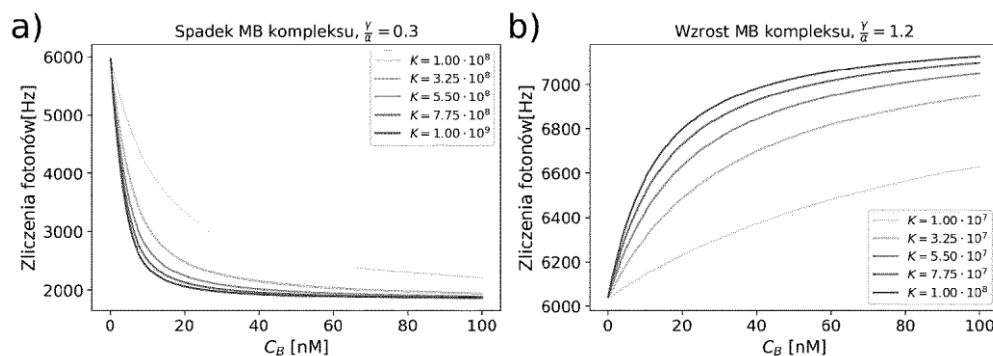


Fig. 1: Przykładowe przedstawienie funkcji opisanej równaniem 3 dla reakcji gdzie jasność molekularna kompleksu a) spada, bądź b) wzrasta względem znakowanego substratu.

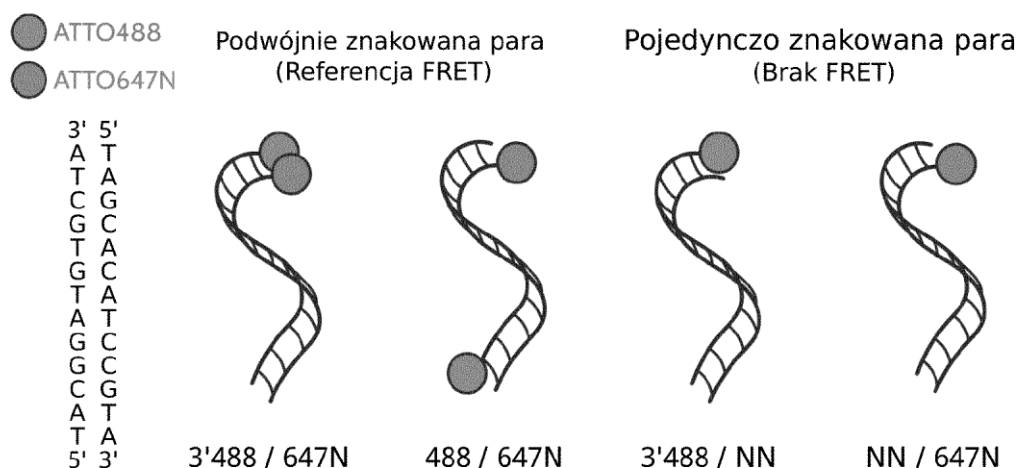


Fig. 2: Schematyczne przedstawienie użytych w eksperymentach par oligonukleotydów.

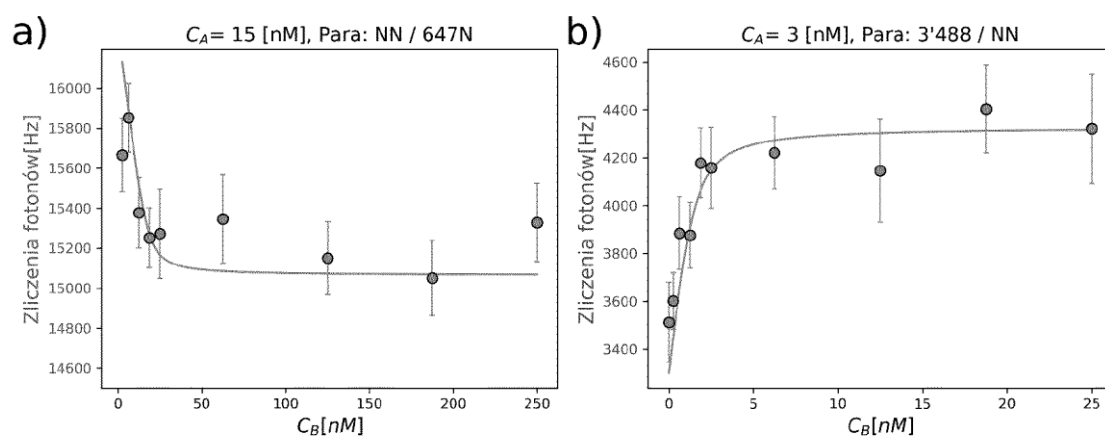


Fig. 3: Przykładowe wyniki analizy zmiany jasności dla pojedynczo znakowanych par oligonukleotydów. a) Komplex utworzony przez reakcję nici wybarwionej ATTO488 z nieznakowaną komplementarną parą zwiększa o 22% jasność molekularną względem inicjującej nici substratu. b) W przypadku nici wybarwionej ATTO647N tworzącej kompleks z nieznakowaną komplementarną nicią obserwowany jest 5% spadek jasności kompleksu w stosunku do nici inicjującej

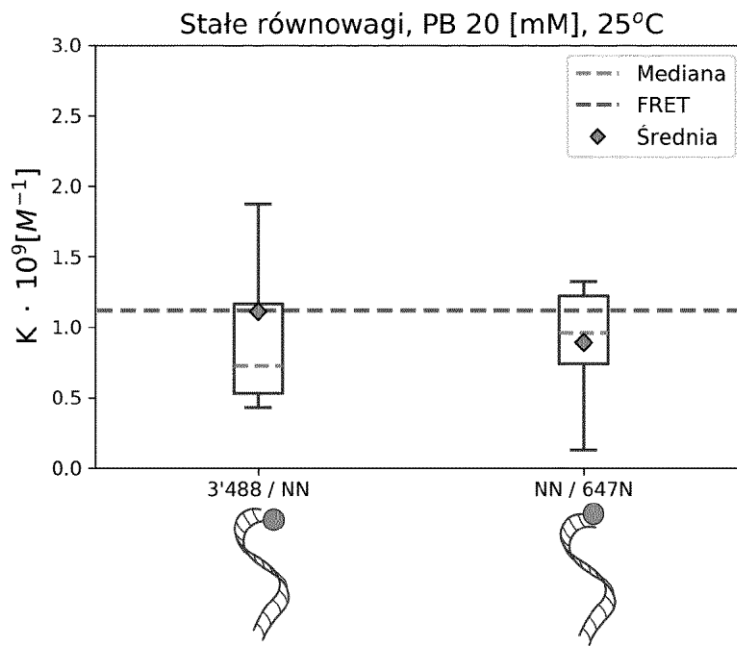


Fig. 4: Podsumowanie wyników uzyskanych z wykorzystaniem metody analizy jasności dla pojedynczo znakowanych par. Czerwona linia na wykresie reprezentuje uśrednioną wartość stałej równowagi wyznaczonej z wykorzystaniem metody FRET dla podwójnie wybarwionej pary 488/647N.

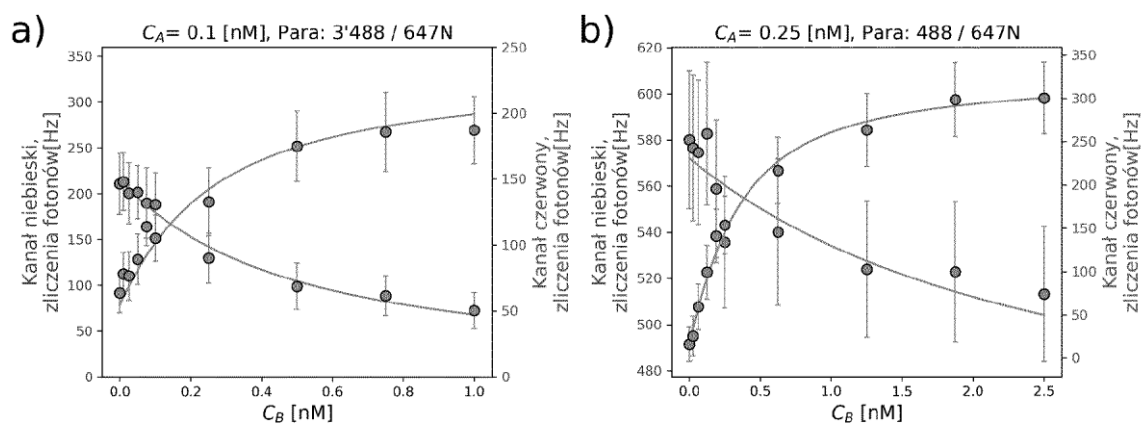


Fig. 5: Przykładowe wyniki analizy zmiany jasności dla podwójnie znakowanych par oligonukleotydów a) 3'488/647N oraz b) 488/647N.

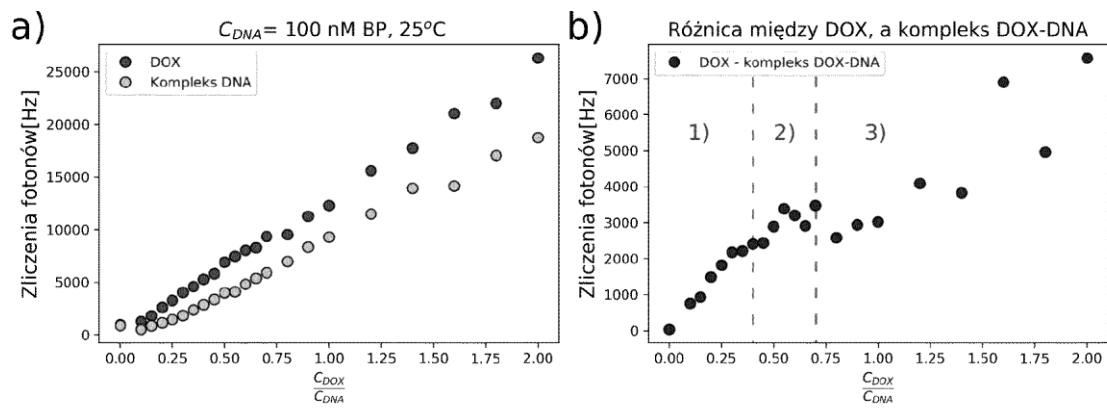


Fig. 6: Wyniki prezentujące a) ilość wyemitowanych fotonów przez DOX oraz kompleks DOX- DNA oraz b) różnicę między tymi liczbami w funkcji rosnącego stężenia DOX względem DNA.

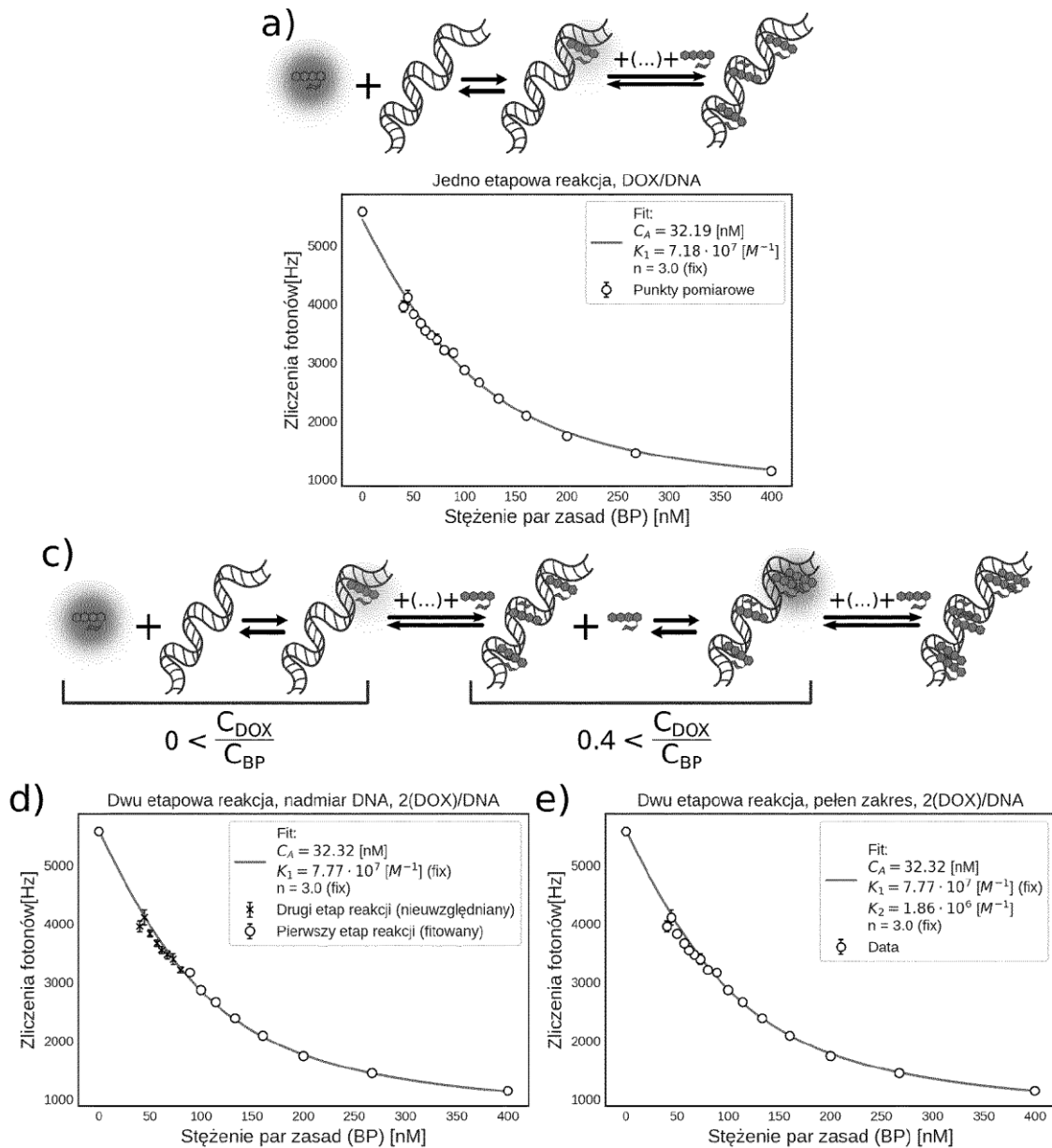


Fig. 7: Analiza kompleksu DOX-DNA z wykorzystaniem metody zmiany jasności. a) Schemat jednoetapowej reakcji. b) Wyniki zmiany liczby emitowanych fotonów wraz z dopasowaną funkcją dla jednoetapowej reakcji. c) Schemat dwuetapowej reakcji wraz z zaznaczonymi przedziałami stężeń, w których spodziewane są poszczególne procesy w mieszaninie. d) Wyznaczenie stałej równowagi dla pierwszego etapu reakcji. e) Dopasowanie funkcji w całym zakresie stężeń dla dwuetapowej reakcji.