

## **Kompleksowa ocena analitycznego potencjału elektroforezy kapilarnej sprzężonej z mikroskalową termoforezą (CE-MST)**

Tworzenie i rozwój nowoczesnych metod charakteryzowania związków ważnych biologicznie oraz badanie ich oddziaływań kowalencyjnych i niekowalencyjnych są podstawowymi celami nowoczesnej chemii analitycznej i bioanalitycznej. Ten projekt będzie poświęcony opracowaniu i ocenie nowych potencjalnych narzędzi, które mogłyby zaoferować nieznane dotąd możliwości w badaniach biomolekularnych. Kluczowa koncepcja będzie oparta na wykorzystaniu mikroskalowej termoforezy (MST) - stosunkowo nowej techniki badania oddziaływań biomolekularnych rozwijającej się szybko od kilku lat, w całkowicie nowym formacie. Zasadniczo analizę termoforetyczną przeprowadza się mierząc, jak zmienia się stężenie cząsteczki lub kompleksu molekularnego po utworzeniu gradientu temperatury w mikroskali. Proces ten zależy od takich czynników, jak wielkość cząsteczki, ładunek, konformacja i solwatacja, a zatem zawiera ważne i użyteczne informacje. W ramach projektu standardowy instrument MST zostanie dostosowany do zminiaturyzowanego i zautomatyzowanego formatu przepływowego, i następnie połączony z innymi instrumentami, takimi jak elektroforeza kapilarna (CE) i spektrometria masowa (MS), w ramach jednej jednostki sprzężonej (CE-MST, CE-MST-MS).

Takie kombinacje różnych technik i niekonwencjonalny format analizy termoforetycznej stwórzają całkowicie nowe narzędzia, które mogą oferować wiele ważnych korzyści. Na przykład sprzężenie między elektroforezą kapilarną a termoforezą w mikroskali (CE-MST) zapewni następujące wartości dodane: (i) ten sam proces molekularny (np. oddziaływanie między białkiem i jego receptorem lub między kandydatem na lek a celem/targetem) badany będzie jednocześnie dwiema niezależnymi (ortogonalnymi) technikami badawczymi praktycznie bez straty próbki; (ii) pomiar termoforetyczny odbywał się będzie bezpośrednio po uprzednim procesie rozdzielania, dzięki czemu możliwa będzie analiza próbek złożonych i zanieczyszczonych, w tym zawierających cząsteczki o podobnej strukturze, np. izomery; (iii) zużycie odczynników zostanie zminimalizowane (2-3 rzędy wielkości) w porównaniu z klasyczną termoforezą; (iv) wprowadzanie próbki do kapilary następować będzie automatycznie (nie ręcznie, jak w tradycyjnej termoforezie) i będzie programowalne za pomocą komputera. Ponadto, w porównaniu do klasycznej elektroforezy, pomiar termoforetyczny zapewni dodatkowe informacje analityczne na temat danego procesu w tym samym czasie, dotyczące np. stabilność kompleksu molekularnego, jego agregacji, zmian konformacyjnych, itp. Sygnał termoforetyczny może również służyć jako dodatkowe kryterium identyfikacji nieznanymi cząsteczek. Dalsza integracja ze spektrometrią mas, zapewni z kolei dodatkowe informacje na temat masy cząsteczkowej, składu izotopowego i struktury, szczególnie przydatne w potencjalnym badaniu produktów naturalnych i nowo zsyntetyzowanych cząsteczek, takich jak kandydaci na leki.

Aby umożliwić wydajne sprzężenie, instrument MST zostanie połączony z elektroforezą kapilarną (CE) za pomocą pojedynczej kapilary krzemionkowej, bez żadnej poważniejszej modyfikacji instrumentu. Ta nowa technika zostanie przetestowana w wybranych układach modelowych z wybranymi cząsteczkami poprzez zbadanie ich właściwości termoforetycznych wykorzystanych w badaniach powinowactwa (określenie stałej wiązania) oraz poprzez analizę modelowych reakcji enzymatycznych/chemicznych. Szczególna uwaga zostanie poświęcona krytycznej ocenie zarówno zalet, jak i wad proponowanego podejścia. Zostanie to dokonane przy użyciu addytywnego modelu kolorów RGB - specjalnego, oryginalnego algorytmu zaprojektowanego i opracowanego przez wnioskodawcę w tym celu.

Wykonalność i funkcjonalność planowanego interfejsu CE-MST została już potwierdzona eksperymentalnie przez wnioskodawcę w specjalnym wstępnym teście (ostatnio opublikowane wyniki uzyskane dla prototypowej kombinacji CE-MST). Dlatego projekt ma duże szanse na pomyślną realizację, nawet biorąc pod uwagę jego wysoką eksperymentalną nowość i złożoność.