

**Viernes 14 de marzo 9 hs.**

Aula Fernández Prini INQUIMAE-DQIAQF

Ciudad Universitaria Pab. II, 3º Piso

**Cuantificación de constantes de equilibrio a partir de técnicas de nanoscopía de fluorescencia**

**Tesis doctoral**

LUIS FERNANDO MARCANO GARCIA

**Director:** Dr. Pedro Aramendía

**Consejera de Estudios:** Dra. Sara Aldabe

**Jurados:** Dra. María S. Celej - Prof. Tit., UNC - Inv. Indep., CIQUIBIC, CONICET, Dr. Javier Santos - Prof. Adj., DQB, FCEN, UBA - Inv. Princ., IB3, CONICET y Dr. Mario Tagliazucchi - Prof. Adj., DQIAQF, FCEN, UBA - Inv. Indep., INQUIMAE, CONICET

Resumen

La microscopía de localización de molécula única (SMLM) proporciona la localización molecular con una precisión de decenas de nanómetros en el plano perpendicular a la propagación de la luz. Esto permite la posibilidad de contar moléculas y correlacionar sus ubicaciones, proporcionando un mapa de las posiciones reales en una imagen de superresolución. Considerando la correlación de pares moleculares como indicativo de interacción, y como una forma de discernirlos de las moléculas libres, describimos un método para cuantificar constantes termodinámicas de equilibrio ( $K$ ). Mientras que otros métodos experimentales utilizados para estudiar las interacciones en sistemas biológicos y que a menudo operan en solución, que pueden no reflejar con precisión las condiciones celulares, SMLM ofrece la ventaja de que el parámetro de interacción podría potencialmente determinarse en el entorno fisiológico apropiado, como la membrana, el citoplasma celular o las organelas. La primera validación fue obtener el mismo valor de constante de asociación en un sistema de oligonucleótidos complementarios por métodos de ensamble y de STORM. Luego experimentamos en células fijadas. Para calcular  $K$  en concentraciones, evaluamos área y volumen por métodos de teselaciones de Delaunay y Voronoi, así como una función de densidad superficial de kernel ( $k_s$ -density). Aplicando esta técnica a proteínas señalizadoras de linfocitos T, mediante Microscopía de Acumulación de Puntos de ADN para Imagen en Topografía a Nanoescala (DNA-PAINT), determinamos la constante de asociación entre ITAMs fosforiladas en el complejo TCR-CD3 en la membrana de células en reposo y la constante de disociación pseudo-3D de las moléculas pZAP70 en el complejo TCR-CD3 en la membrana de células T. Además, abordamos desafíos como el efecto del multiblinking, la detección múltiple, la eficiencia de etiquetado-detección molecular y la determinación de la distancia crítica para la asociación.