

dr Agnieszka Więckowska

**Uniwersytet Warszawski,
Wydział Chemii**

Zakład Chemii Nieorganicznej i Analitycznej

Pracownia Teorii i Zastosowań Elektrod

ul. Pasteura 1

02-093 Warszawa

**AUTOREFERAT DO WNIOSKU
O PRZEPROWADZENIE PROCEDURY HABILITACYJNEJ**

Warszawa, grudzień 2015r.

SPIS TREŚCI

I	dane personalne habilitanta	3
II	informacje o posiadanych dyplomach i uzyskanych stopniach naukowych	3
III	informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/artystycznych	3
IV	wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595 ze zm.)	4
A	rodzaj osiągnięcia naukowego	4
B	wykaz publikacji naukowych stanowiących podstawę osiągnięcia naukowego	4
C	omówienie celu naukowego w/w prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania	5
1.	cel naukowy	5
2.	wprowadzenie	6
3.	omówienie prac	7
4.	podsumowanie	31
5.	cytowana literatura	33

I | dane personalne habilitantki

Agnieszka Więckowska

II | informacje o posiadanych dyplomach i uzyskanych stopniach naukowych

- 1. Dyplom doktora nauk chemicznych** – z wyróżnieniem 2003r., Uniwersytet Warszawski, Wydział Chemii na podstawie rozprawy doktorskiej pod tytułem „Elektrochemiczne badania oddziaływań molekularnych wielocentrowych kompleksów wybranych metali przejściowych” wykonanej w pod kierunkiem prof. dr hab. Renaty Bilewicz.
- 2. Dyplom magistra chemii** – 1998r., Uniwersytet Warszawski, Wydział Chemii
Praca magisterska: „Badania tetraazamakrocyclicznych kompleksów Ni(II) i Cu(II) jako potencjalnych donorów w układach donorowo-akceptorowych” wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Renaty Bilewicz.

III | informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/artystycznych

1.10.2015 – obecnie	Wydział Chemii UW, praca na stanowisku wykładowcy
1.10.2003 – 20.09.2015	Wydział Chemii UW, praca na stanowisku adiunkta
18.03.2006 – 1.04.2006	Staż naukowy VTT Technical Research Centre of Finland Tampere, Finland
1.02.2007 – 31.01.2008	Staż naukowy u prof. I. Willnera, Institute of Chemistry The Hebrew University of Jerusalem , Jerozolima, Israel



IV | wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytułach w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595 ze zm.)

A | rodzaj osiągnięcia naukowego:

monotematyczny cykl publikacji zatytułowany:
„Warstwy molekularne samorzutnie organizujące się na nanocząstkach i elektrodach złotych.”

B | wykaz publikacji naukowych stanowiących podstawę osiągnięcia naukowego

[H1] **A. Wieckowska**, M. Wiśniewska, M. Chrzanowski, J. Kowalski, B. Korybut-Daszkiewicz, R. Bilewicz;

„Self-assembly of nickel(II) pseudorotaxane nanostructure on a gold surface”

Pure and Applied Chemistry, 2007, 79, 1077-1085.

[H2] **A. Wieckowska**, A.B. Braunschweig, I. Willner;

„Electrochemical control of surface properties using a quinone-functionalized monolayer: effects of donor–acceptor complexes”

Chem. Commun., 2007, 3918-3920.

[H3] **A. Wieckowska**, D. Li, R. Gill, I. Willner;

„Following Protein Kinase Activity by Electrochemical Means and Contact Angle Measurements”

Chem. Commun., 2008, 2376-2378.

[H4] O.I. Wilner, C. Guidotti, **A. Wieckowska**, R. Gill, I. Willner;

„Probing Kinase Activities by Electrochemistry, Contact Angle and Molecular Force Interactions”

Chem. A Eur. J, 2008, 14, 7774-7781.

[H5] **A. Wieckowska**, E. Jabłonowska, E. Rogalska, R. Bilewicz;

„Structuring of supported hybrid phospholipid bilayers on electrodes with phospholipase A2”

Phys. Chem. Chem. Phys. 2011, 13, 9716-9724.

[H6] E. Jabłonowska, **A. Więckowska**, E. Rogalska, R. Bilewicz;

"Phospholipase A(2) activity on supported thiolipid monolayers monitored by electrochemical and SPR methods"

J. Electroanal. Chem. 2011, 660, 360–366.

[H7] M. Karaskiewicz, D. Majdecka, **A. Więckowska**, J.F. Biernat, J. Rogalski, R. Bilewicz;

"Induced-fit binding of laccase to gold and carbon electrodes for the biological fuel cell applications"

Electrochimica Acta 2014, 126,132-138.

[H8] **A. Więckowska**, M.Dzwonek;

"Ultrasmall Au nanoparticles coated with hexanethiol and anthraquinone/hexanethiol for enzyme-catalyzed oxygen reduction"

Sensors and Actuators B 2016, 224, 514-520.

[H9] D. Li, **A. Więckowska**, I. Willner;

"Optical analysis of Hg²⁺ ions by oligonucleotide-Au nanoparticles hybrids and DNA-based machines"

Angew. Chemie Int. Ed., 2008, 47, 3927-3931.

C | *omówienie celu naukowego w/w prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania*

1. | *cel naukowy*

Zaprojektowanie, opracowanie metod tworzenia oraz zastosowanie warstw unieruchomionych na powierzchni elektrod, bądź na powierzchni nanocząstek złotych w celu wykorzystania proponowanych układów do konkretnych celów badawczych takich jak: zmiana właściwości powierzchni, detekcji substancji czy jonów, oraz badania oddziaływań międzycząsteczkowych lub mechanizmów procesów przebiegających w warstwach monomolekularnych.

2. | wprowadzenie

Nanotechnologia jest aktualnie jedną z najdynamiczniej rozwijających się gałęzi nauki. Nanoukłady są interesujące z powodu innych, w porównaniu z makrostrukturami, właściwości chemicznych, optycznych, mechanicznych czy elektrycznych [1]. Komercyjnie wytwarzane są już związki, których cząsteczki działają jak tranzystory, diody, komórki pamięci, przewody i inne składniki mikroukładów. Jednak miniaturyzacja przeprowadzana metodami mechanicznymi czyli tzw. droga „z góry na dół” osiąga teoretyczny limit 50 nm [2]. Z tego powodu, duże zainteresowanie wzbudzają metody „z dołu do góry”, w których początkiem są pojedyncze atomy i cząsteczki, a z nich buduje się większe układy. Bezpośrednią konsekwencją takiego podejścia jest projektowanie układów zakotwiczonych na powierzchniach stałych oraz badanie ich właściwości.

Pokrewną dziedziną jest chemia supramolekularna czyli nauka o związkach, które istnieją dzięki słabym oddziaływaniom międzycząsteczkowym. Niekowalencyjne sposoby wiązania to: oddziaływanie typu gość-gospodarz, wiązania wodorowe, oddziaływania donor-akceptor, oddziaływania $\pi - \pi$, czy też oddziaływania Van der Waalsa. Zatem, gdy brak jest wiązań kowalencyjnych pomiędzy elementami strukturalnymi, mówimy o wiązaniach mechanicznych tak, jak na przykład w katenanach czy rotaksanach [3,4].

Moja aktywność naukowa skupia się na badaniach podstawowych układów unieruchomionych na podłożu stałym. Monowarstwy mogą zmieniać funkcjonalność podłoża, na którym są unieruchomione i z tego powodu mogą być stosowane do pasywowania podłoża, jak i do wprowadzania nowych funkcji na powierzchnię stałą. Zastosowania monowarstw wiążą się między innymi z tworzeniem układów bioczuJNIKOWYCH, powłok odpornych na korozję czy nowych urządzeń elektronicznych. Zrozumienie sił, które odpowiadają za proces samoorganizacji monowarstwy na podłożu, ma znaczenie przy projektowaniu układów posiadających szczególne właściwości powierzchniowe.

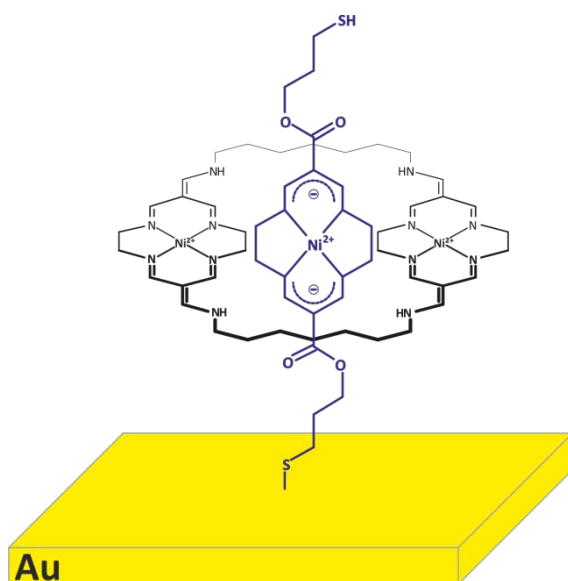
Pierwszą techniką pozwalającą na tworzenie zorganizowanych cienkich warstw (od mikrometrów do pojedynczych Angstromów) była technika Langmuira-Blodgett [6] oparta na tworzeniu monowarstwy związku amfifilowego na granicy faz woda-powietrze. W celu przeniesienia warstwy na stały substrat, wynurza się bądź zanurza ten substrat w głąb subfazy pokrytej monowarstwą, w zależności od charakteru powierzchni stałej [7,8]. W latach 40. ubiegłego wieku odkryto zjawisko samorzutnej organizacji kwasu oleinowego do postaci trwałej monowarstwy na powierzchni platyny [9]. Monowarstwy tworzą się spontanicznie,

poprzez unieruchomienie substratu w roztworze związku posiadającego powinowactwo do substratu. Jednym ze sposobów zakotwiczenia warstw na stałym podłożu (SAM-self assembled monolayers) jest metoda polegająca na utworzeniu wiązania kowalencyjnego pomiędzy złotym podłożem a atomem siarki pochodzącym z grupy wiążącej związków typu RSH lub R-S-S-R [10,11]. Złoto jest najczęściej stosowanym substratem z uwagi na brak przeszkadzających tlenków na powierzchni oraz energię wiązania Au-S [12]. Trwałość monowarstw tiolowych na złotym podłożu wynika z kilku czynników: oddziaływania siarki grupy wiążącej z substratem, oddziaływania szkieletów cząsteczek pomiędzy sobą (w zależności od chemicznej natury mogą to być oddziaływania van der Waalsa, oddziaływania π - π , oddziaływania elektrostatyczne, w tym oddziaływania dipol-dipol) [13], oddziaływania grup końcowych [14]. Cząsteczki tioli na powierzchni złotego substratu wykazują heksagonalne upakowanie, a odległość pomiędzy łańcuchami alkanotioli wynosi około 5 Å. Łańcuchy alkilowe są nachylone w stosunku do powierzchni, a kąt ten jest zależny od natury łańcucha [12]. Zatem, grubość monowarstwy jest mniejsza niż długość cząsteczek tworzących monowarstwę.

Część prac, w których uczestniczyłam w ostatnich latach, która stanowi podstawę wniosku o przeprowadzenie procedury habilitacyjnej, dotyczy projektowania, tworzenia i badania właściwości układów zorganizowanych na powierzchni elektrody, lub nanocząstek złotych a także stosowania otrzymanych układów do celów poznawczych oraz analitycznych.

3. | omówienie prac

Jednym z przykładów wykorzystujących metodę samoorganizacji tiolowych pochodnych na złotej elektrodzie jest praca [H1] dotycząca konstrukcji maszyn molekularnych



Rys. 1. Schemat rotaksanu na powierzchni elektrody [H1].

wykorzystujących poliazamakrocykliczne kompleksy metali przejściowych. Celem pracy było utworzenie rotaksanu wskutek oddziaływań pomiędzy cząsteczką osi, która tworzy wiązanie z podłożem a cząsteczką obręczy oraz obserwacja tego procesu metodami elektrochemicznymi.

Tetraazamakrocykliczne kompleksy niklu i miedzi są związkami o wielu ciekawych właściwościach. Jon centralny może ulegać

odwracalnemu procesowi utlenienia do stopnia +3. W zależności od podstawników w pierścieniu, oraz wielkości pierścienia, czy obecności innych cząsteczek w sąsiedztwie, proces ten może zachodzić przy różnych wartościach potencjału. Dlatego związki takie mogą być stosowane jako składniki katenanów lub rotaksanów, wykazujących zjawisko elektrochemicznie włączanego ruchu wewnątrzcząsteczkowego (rotacji) [15, 16].

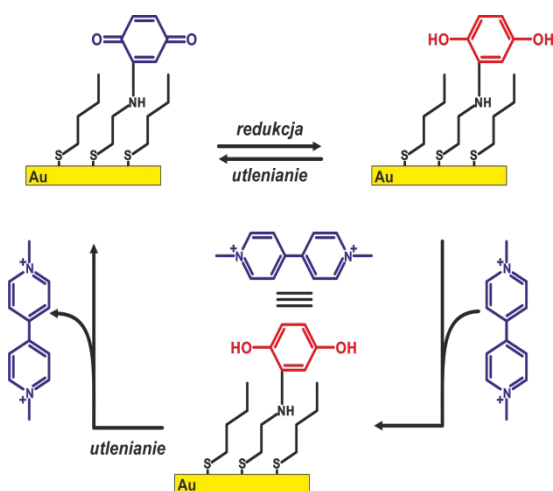
Monomeryczny kompleks niklu został zmodyfikowany w ten sposób, by zawierał dwie wolne grupy –SH, umożliwiające zakotwiczenie na powierzchni złota. Taka molekula może przyjmować dwie orientacje na powierzchni elektrody: gdy tylko jedna grupa –SH jest przyłączona do powierzchni i związek przyjmuje orientację równoległą do normalnej, lub dwie grupy –SH ulegają reakcji z powierzchnią złota i molekula jest ułożona płasko na elektrodzie. Tylko pierwsza orientacja umożliwia tworzenie rotaksanu poprzez przewleczenie cząsteczki obręczy. Powierzchnia zajmowana przez jedną cząsteczkę wynosi $43 \pm 1.5 \text{ \AA}^2$, co w porównaniu do wartości obserwowanej dla warstw alkanotioli ($\approx 20 \text{ \AA}^2$) nasuwa wniosek o oddziaływaniach elektrostatycznych pomiędzy naładowanymi centrami nikłowymi, które w większości mają tę samą orientację względem powierzchni substratu. Po optymalizacji warunków procesu adsorpcji, oraz ustaleniu rodzaju i stosunku tiolu rozcieńczającego, otrzymaną warstwę przebadano metodą skaningowej mikroskopii tunelowej stosując nanocząstki złota jako markery wolnych grup tiolowych. Proces utleniania centrum Ni(II) do Ni(III) zachodzi przy potencjale 0.85 V względem Ag/AgCl. Tworzenie rotaksanu na powierzchni elektrody polega na użyciu bismakrocyclicznego kompleksu niklu – akceptora, jako obręczy, który również jest elektroaktywny, jednak ze względu na inny charakter teteraazamakrocyclicznych pierścieni, kompleksujących centra metaliczne, utlenianie centrów zachodzi przy potencjale +1.4 V względem Ag/AgCl. Proces ten jest zbyt dodatnio położony by można było obserwować zmiany zachodzące podczas tworzenia rotaksanu bez zniszczenia warstwy. Dlatego tworzenie rotaksanu obserwowałam na podstawie zmian zachowania elektrochemicznego cząsteczek „osi” unieruchomionych na powierzchni elektrody. Przesunięcie potencjału utleniania $\text{Ni}^{2+} / \text{Ni}^{3+}$ w kierunku wartości bardziej dodatnich, w trakcie tworzenia struktury splecionej, świadczy o zmianach w otoczeniu centrum redoks. Rotaksan ma ładunek dodatni, podczas gdy wypadkowy ładunek samej cząsteczki „osi” jest równy zeru, dlatego też tworzenie rotaksanu utrudnia proces utleniania cząsteczki „osi” (bardziej dodatnie wartości potencjałów). Tworzenie takiej struktury jest procesem kinetycznie stosunkowo wolnym, ale może być wymuszane przez przyłożenie potencjału odpowiadającego formie Ni^{2+} kompleksu będącego „osią” rotaksanu.

Zastosowanie metod elektrochemicznych do badania procesów tworzenia układów splecionych jest możliwe tylko w przypadku gdy komponenty są elektroaktywne, ale interpretacja otrzymanych rezultatów bywa skomplikowana. Najważniejszym moim sukcesem w pracy [H1] jest opracowanie skutecznej metody adsorpcji cząsteczek osi, oraz elektrochemiczna obserwacja procesu tworzenia nowego indywiduum na powierzchni elektrody. W odróżnieniu od prac Stoddarta [17, 18], w których używano związków bez jonów metali czy Sauvage'a [19, 20], gdzie proces tworzenia struktury splecionej wymagał efektu templatowania wokół jonu metalu, rotaksan otrzymany przeze mnie zawiera centra metaliczne, których stan utlenienia umożliwia tworzenie struktury splecionej, a obserwacja elektrochemiczna samego procesu oparta jest na procesach redoks centrów metalicznych.

Oddziaływania donorowo-akceptorowe mogą stanowić podstawę tworzenia powierzchni o kontrolowanej zwilżalności. Powierzchnie, których właściwości hydrofobowo-hydrofilowe ulegają zmianie pod wpływem bodźców zewnętrznych budzą zainteresowanie ze względu na możliwość zastosowania ich jako powierzchni samoczyszczących [21]. Kontrolę zwilżalności powierzchni można osiągnąć między innymi za pomocą samoorganizacji długołańcuchowych alkanów z naładowanymi grupami końcowymi [22], czy przy użyciu elektroaktywnych tiolowanych pochodnych, których reakcja na zmiany przyłożonego potencjału zmienia stopień zwilżalności powierzchni [23]. Praca [H2] dotyczy zaprojektowania powierzchni o kontrolowanych właściwościach hydrofilowo-hydrofobowych dzięki wykorzystaniu modyfikowanych pochodnych tiolowych. Czynniki wpływające na kontrolę właściwości powierzchni mogą być natury chemicznej oraz elektrochemicznej.

W celu przygotowania warstwy o zmiennej zwilżalności, monowarstwa cysteaminy została unieruchomiona na elektrodzie złotej, a następnie poddana reakcji, w której dołączono podstawniki 1,4-benzochinonowe. Na podstawie pomiarów elektrochemicznych wyznaczyłam stężenie powierzchniowe pochodnych chinonu na poziomie $1.1 \cdot 10^{-11}$ mol cm^{-2} . Taka wartość stężenia powierzchniowego elektroaktywnych cząsteczek wskazuje na niepełne pokrycie powierzchni elektrody. Po uszczelnieniu warstwy dodatkowymi cząsteczkami butanotiolu stężenie powierzchniowe pochodnych chinonu spadło do wartości $7.9 \cdot 10^{-12}$ mol cm^{-2} , co sugeruje częściowe zastępowanie cząsteczek elektroaktywnych przez cząsteczki butanotiolu podczas tworzenia warstwy mieszanej. Formę chinonową warstwy można w sposób odwracalny zredukować do formy hydrochinonowej po przyłożeniu odpowiedniego potencjału. Powierzchnia elektrody zmodyfikowana warstwą mieszaną zawierającą w zewnętrznej płaszczyźnie grupy chinonowe została poddana reakcji z π -akceptorem jakim jest

metylowiologen. Tworzenie kompleksu donorowo-akceptorowego możliwe jest dopiero po zredukowaniu chinonu do hydrochinonu, który wykazuje dobre właściwości π -donorowe.



Rys. 2. Schemat układu [H2].

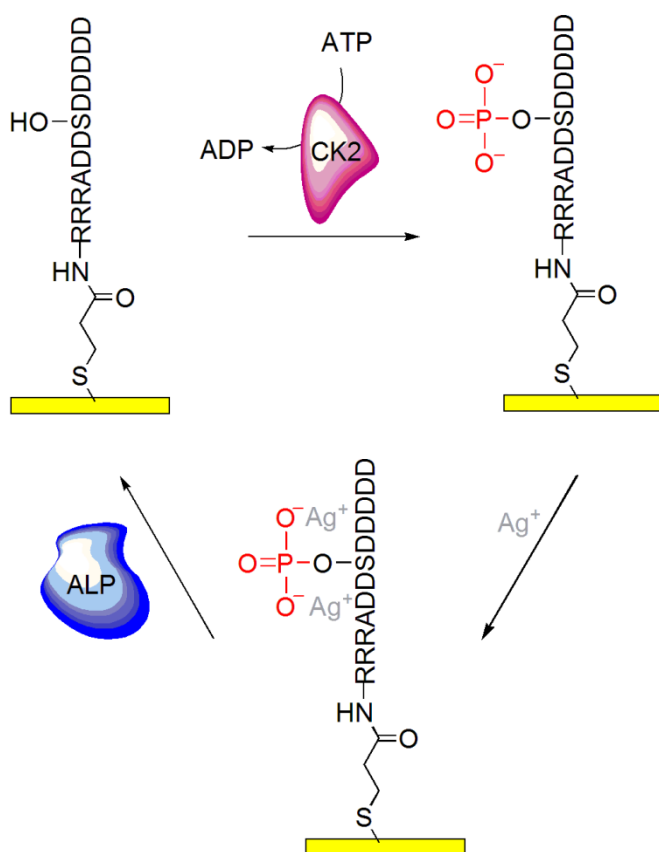
Zmiany właściwości hydrofobowo-hydrofilowych takiej powierzchni modyfikowanej kompleksem typu donor-akceptor indukowane są przez zewnętrzne czynniki, takie jak przykładany potencjał, bądź obecność reduktora na powierzchni i badane dzięki zmianom kąta zwilżania, czy przy użyciu spektroskopii sił atomowych (AFM). Ostrze AFM zmodyfikowane tiolową pochodną wiologenu oddziałuje z powierzchnią substratu pokrytego warstwą hydrochinonu,

lecz po chemicznym, bądź elektrochemicznym utlenieniu powierzchni zmodyfikowanej warstwy do chinonu, oddziaływania te zanikają. Podobnie, zmiany kąta zwilżania sugerują, że redukcja warstwy modyfikującej powierzchnię złota powoduje zwiększenie właściwości hydrofilowych warstwy. Następuje zmiana kąta zwilżania z $66^\circ \pm 3^\circ$ na $48^\circ \pm 6^\circ$ po zastosowaniu potencjału -0.55 V względem drutu srebrnego. Jednak po powrocie do potencjału 0 V względem Ag, wartość kąta zwilżania uległa zwiększeniu się do $54^\circ \pm 4^\circ$. Tworzenie kompleksu donorowo-akceptorowego pomiędzy zredukowaną formą chinonu na powierzchni, a wiologenem w roztworze, jeszcze bardziej obniża kąt zwilżania do $36^\circ \pm 4^\circ$. Takie zachowanie odzwierciedla tworzenie kompleksu donorowo-akceptorowego między π -akceptorem, wiologenem, a bogatym w elektrony hydrochinonem, który jest zakotwiczony na powierzchni elektrody. Tego typu badania mogą w przyszłości znaleźć zastosowania w mikrohydrodynamicie, tworzeniu samoczyszczących powierzchni czy detekcji materiałów biologicznych. Metody elektrochemiczne oraz mikroskopowe uzupełniają się nawzajem przy opisie powierzchni o kontrolowalnej zwilżalności.

Innym przypadkiem badań z wykorzystaniem zakotwiczonego substratu na powierzchni jest badanie aktywności enzymów. Zmiany aktywności enzymów mają znaczenie diagnostyczne i mogą odzwierciedlać zmiany chorobowe w narządach. Niewłaściwe funkcjonowanie narządów związane jest ze zmianami przepuszczalności błon komórkowych narządów lub uszkodzeniem ich struktur, co powoduje wypływ enzymów i zmiany ich aktywności w płynach ciała.

Przykładem może być kinaza kazeinowa, która jest enzymem odpowiedzialnym za fosforylację protein, co ma olbrzymie znaczenie w pracy komórek, ich cyklu życiowym i podziale [24]. Monitorowanie aktywności tego enzymu jest szczególnie ważne w diagnostyce wielu chorób neurodegeneracyjnych czy nowotworów.

Do oznaczania aktywności kinazy najczęściej stosowane są metody wykorzystujące fluorescencyjnie bądź izotopowo znakowane przeciwciała [25, 29], spektroskopię rezonansu plazmonów powierzchniowych [26], układy oparte na FRET (przenoszeniu energii między dwoma fluoroforami) [27], a także popularne ostatnio nanocząstki złota. Metody oparte na oddziaływaniach z nanocząstkami złota również wymagają znakowania, na przykład stosowania ATP modyfikowanego biotyną, by po reakcji fosforylacji peptyd zawierał grupę biotynylową zdolną do reakcji z nanocząstkami pokrytymi awidyną [28, 30]. Nanocząstki złota mogą być oznaczane elektrochemicznie, bądź są pokrywane srebrem w celu wzmocnienia sygnału rezonansowego rozpraszania światła (RLS).



Rys. 3 Schemat układu do oznaczania aktywności kinazy [H3].

Gdzie: R - arginina, A - alanina, D - kwas asparaginowy, S - seryna

białka unieruchomionego na podłożu elektrody złotej [H3]. Proces ten był monitorowany elektrochemicznie oraz przy użyciu mikroskopii kąta zwilżania. W celu zakotwiczenia substratu

Oznaczanie aktywności kinazy kazeinowej jest celem badań opisanych w pracy [H3] i prowadziłam je stosując metody elektrochemiczne, przy wykorzystaniu zakotwiczonego na powierzchni elektrody odpowiedniego białka. W porównaniu do innych prac, zastosowany pomysł jest prosty a znakowanie produktu nie wymaga dużych nakładów finansowych.

Oznaczanie aktywności kinazy kazeinowej opiera się na elektrochemicznej redukcji jonów srebra związanych z fosforylowanymi centrami

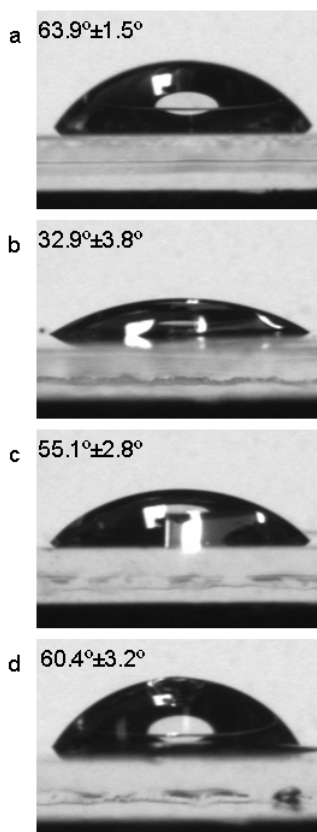
(białka) reakcji enzymatycznej na elektrodzie złotej najpierw zaadsorbowano tiolowaną pochodną aktywnego estru N-hydroksysukcynimidowego a następnie przeprowadzono reakcję sprzężania peptydu z powierzchnią elektrody. Tak przygotowaną elektrodę poddawano działaniu enzymu o stałej aktywności w obecności cząsteczek ATP, czego efektem był proces fosforylacji seryny w peptydzie. Stopień fosforylacji zmieniano dzięki wydłużaniu czasu działania enzymu, aż do osiągnięcia stanu wysycenia (20 minut). Następnie elektrodę umieszczano w roztworze jonów srebra, które wiązane były przez grupy fosforanowe generowane dzięki obecności enzymu. Elektrochemiczne badanie redukcji jonów Ag^+ dostarcza wiadomości na temat liczby generowanych grup fosforanowych, czyli o aktywności kinazy kazeinowej.

Analogiczne pomiary prowadzono po zastosowaniu roztworów kinazy o różnej aktywności, na podstawie których można wykreślić zależność sygnału redukcji jonów srebrnych od aktywności enzymu. W celu potwierdzenia specyficzności tej reakcji,

zastosowałam także elektrody z unieruchomionym obcym peptydem, niebędącym substratem reakcji enzymatycznej, otrzymując bardzo niską odpowiedź.

Powierzchnia elektrody może być regenerowana dzięki stosowaniu fosfatazy alkalicznej, która powoduje usuwanie grup fosforanowych z substratu unieruchomionego na powierzchni. Stężenie powierzchniowe unieruchomionego peptydu wyznaczone przy użyciu mikrowagi kwarcowej QCM wyniosło: $3 \cdot 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$.

Poza technikami elektrochemicznymi zastosowałam mikroskopię kąta zwilżania, do oznaczania zmiany właściwości hydrofilowo-hydrofobowych monowarstwy peptydu w trakcie reakcji z enzymami. Fosforylacja substratu, unieruchomionego w postaci monowarstwy na powierzchni elektrody powoduje znaczne zwiększenie hydrofilowości warstwy, ale utworzenie kompleksu pomiędzy grupami fosforanowymi a jonami srebra zmienia naturę warstwy na bardziej hydrofobową. Zastosowanie fosfatazy alkalicznej całkowicie usuwa grupy fosforanowe z substratu i odnawia hydrofobową warstwę nieufosforylowanego białka. Dla potwierdzenia tych rezultatów zastosowałam także spektroskopię fotoelektronów (XPS) i potwierdziłam tworzenie



Rys. 4. Zdjęcia kropli buforu HEPES (20 μl) na powierzchni elektrody modyfikowanej peptydem (a), po procesie fosforylacji (b), po procesie adsorpcji jonów Ag^+ (c), po odtworzeniu powierzchni przy użyciu fosfatazy alkalicznej (d).

kompleksu, pomiędzy powstałymi dzięki obecności kinazy, grupami fosforanowymi w białku a jonami srebra.

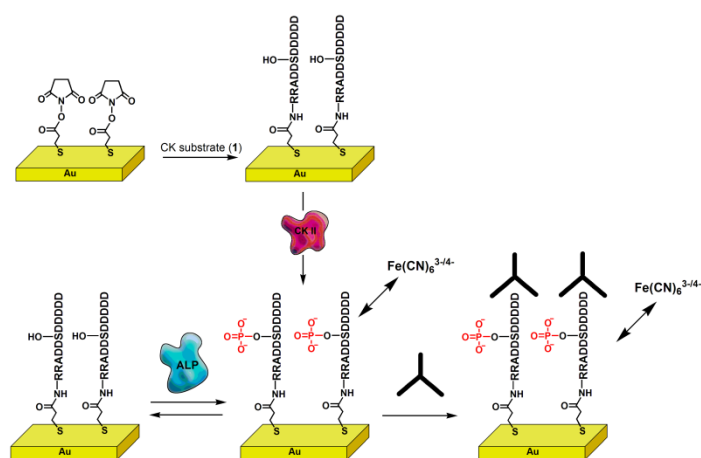
Podsumowując, w pracy [H3] opracowałam elektrochemiczny czujnik aktywności kinazy oparty na redukcji jonów Ag^+ , związanych z enzymatycznie wygenerowanymi grupami fosforanowymi. Zarówno wyniki badań XPS jak i zmiany kąta zwilżania, będące skutkiem zmian właściwości hydrofobowo/hydrofilowych, jako efektu działania enzymu, uzupełniają pomiary prowadzone metodą woltamperometrii fali prostokątnej, w celu charakteryzowania procesu fosforylacji i defosforylacji substratu reakcji enzymatycznej, unieruchomionego na powierzchni elektrody.

Kolejne podejście do oznaczania aktywności kinazy kazeinowej opiera się na oddziaływaniu fosforylowanego substratu kinazy kazeinowej z odpowiednim przeciwciałem i zastosowaniu spektroskopii impedancyjnej, pomiaru kąta zwilżania oraz mikroskopii sił atomowych [H4]. Spektroskopia impedancyjna jest techniką polegającą na przyłożeniu do układu zmiennoprądowego sygnału napięciowego o małej amplitudzie i analizie odpowiedzi zmiennoprądowej. Zaletą tej techniki jest możliwość rozdzielenia procesów o różnych stałych czasowych, czyli dyfuzji, reakcji przeniesienia ładunku, oporu elektrolitu, oporu warstwy unieruchomionej na elektrodzie, pojemności warstwy podwójnej. Rozdzielenie takich procesów jest możliwe, ponieważ odpowiedź układu zależy od częstotliwości sygnału [31, 32]. Najważniejszym założeniem pomiarów impedancyjnych jest liniowość układu, czyli układ nie może ulegać zmianie w czasie pomiaru. Procesy elektrochemiczne czy fizyczne interpretuje się jako elementy elektryczne obwodów zastępczych o odpowiednich stałych czasowych. Szczególnie przydatnym modelem do interpretacji zjawisk zachodzących na elektrodach modyfikowanych jest model Randlesa – Ershlera $R_s(R_{ct}(C_{dl}W))$ w którym R_s jest oporem roztworu elektrolitu, R_{ct} jest oporem przeniesienia ładunku, C_{dl} odpowiada pojemności warstwy podwójnej, natomiast W stanowi impedancję Warburga wynikającą z dyfuzji jonów do powierzchni elektrody. W pracy [H4] oznaczanie aktywności kinazy prowadziłam na podstawie oddziaływania substratu z odpowiednim przeciwciałem, które również jest białkiem. Białka charakteryzują się słabym przewodnictwem oraz utrudniają przeniesienie elektronu, blokując powierzchnię elektrody. Wzrost grubości warstwy na elektrodzie pracującej, oraz zmiana właściwości blokujących warstwy na elektrodzie były obserwowane przy użyciu impedancji faradajowskiej.

Elektroda zmodyfikowana białkiem, będącym substratem kinazy kazeinowej została poddana działaniu tego enzymu w obecności ATP, co powoduje fosforylację seryny zawartej

w substracie i pojawienie się ładunku ujemnego, który odpycha ujemny próbnik redoks $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ obecny w roztworze, co na widmie impedancji przejawia się jako utrudnienie przeniesienia elektronu przez warstwę, czyli zwiększenie oporu przeniesienia elektronu R_{ct} . Jony $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ nie mogą się przedostawać do powierzchni elektrody poprzez warstwę o właściwościach blokujących, zatem elektron powinien tunelować od próbniaka przez warstwę, aż do powierzchni. Bezpośredni transport próbniaka może zachodzić w sytuacji, gdy na powierzchni elektrody znajdują się defekty w warstwie.

Przy użyciu mikrowagi kwarcowej wyznaczyłam stężenie powierzchniowe substratu reakcji jako równe: $3.3 \cdot 10^{-11} \text{ mol cm}^{-2}$.



Rys. 5 Schemat układu stosowanego do oznaczania aktywności kinazy [H4].

Eksperymenty kontrolne prowadzone w obecności tylko enzymu, lub tylko cząsteczek ATP nie wykazały wzrostu wartości R_{ct} . Ekspozycja fosforylowanej powierzchni na roztwór fosfatazy alkalicznej prowadzi do odtworzenia warstwy substratu, co jest obserwowane jako odtworzenie początkowych wartości elementów układu zastępczego sprzed reakcji z kinazą kazeinową. Potwierdzenie działania układu przeprowadziłam w warunkach wzrastającej aktywności kinazy kazeinowej. Stopień fosforylacji peptydowego substratu jest kontrolowany przez stężenie kinazy kazeinowej CK2, dlatego wzrost wartości oporu przeniesienia ładunku wynika ze wzrostu stężenia (aktywności) enzymu – kinazy. Zmiany te odbiegają od liniowości w przypadku niższych stężeń enzymu, dlatego w celu wzmocnienia efektu, zastosowałam przeciwciała specyficzne dla fosforylowanego substratu, które łącząc się z cząsteczkami w warstwie jeszcze bardziej blokują proces przeniesienia elektronu pomiędzy próbniakiem redoks a powierzchnią elektrody. Przeciwciała AB są cząsteczkami białek, dlatego przyłączanie ich do powierzchni elektrody znacznie zwiększa blokowanie powierzchni dla próbniaka redoks. Odpowiedzi impedancyjne, czyli wartości oporu przeniesienia ładunku, rosną liniowo wraz ze

Wraz z wydłużeniem czasu trwania reakcji enzymatycznej wzrasta opór przeniesienia ładunku, osiągając plateau po około 20 minutach, co sugeruje całkowitą fosforylację warstwy, bądź odpychanie cząsteczek ATP od coraz bardziej ujemnie naładowanej warstwy.

wzrostem aktywności enzymu, co pozwala na ilościowe jej oznaczenie, nawet w przypadku aktywności enzymu rzędu 10 U. Eksperymenty kontrolne przeprowadziłam przy zastosowaniu obcego enzymu – kinazy tyrozynowej oraz obcego przeciwciała anty-BSA Ab. Odpowiedzi układu były niewielkie, podobnie jak w sytuacji gdy badałam specyficzność kinazy kazeinowej i poddałam jej działaniu elektrodę, na której unieruchomiony był obcy substrat (substrat specyficzny dla kinazy tyrozynowej). Wyniki eksperymentów potwierdziłam pomiarami kąta zwilżania. Podobne rezultaty otrzymałam przy użyciu techniki AFM. Powierzchnię elektrody złotej pokryto substratem reakcji enzymatycznej natomiast ostrze AFM zostało zmodyfikowane przeciwciałem przeciw ufosforylowanemu białku. Gdy powierzchnia zmodyfikowanej elektrody złotej została poddana reakcji z kinazą kazeinową w obecności ATP, to dzięki mikroskopii sił atomowych AFM obserwowałam oddziaływania między powierzchnią a ostrzem, natomiastuuuuu po zastosowaniu fosfatazy alkalicznej usuwającej grupy fosforanowe, lub po zastosowaniu obcego enzymu, bądź substratu nie specyficznego dla kinazy, takich oddziaływań nie obserwowano.

Zastosowanie specyficznego substratu reakcji enzymatycznej, specyficznego przeciwciała oraz spektroskopii impedancyjnej pozwoliło na wzmocnienie odpowiedzi charakterystycznej dla enzymu i oznaczanie jego aktywności.

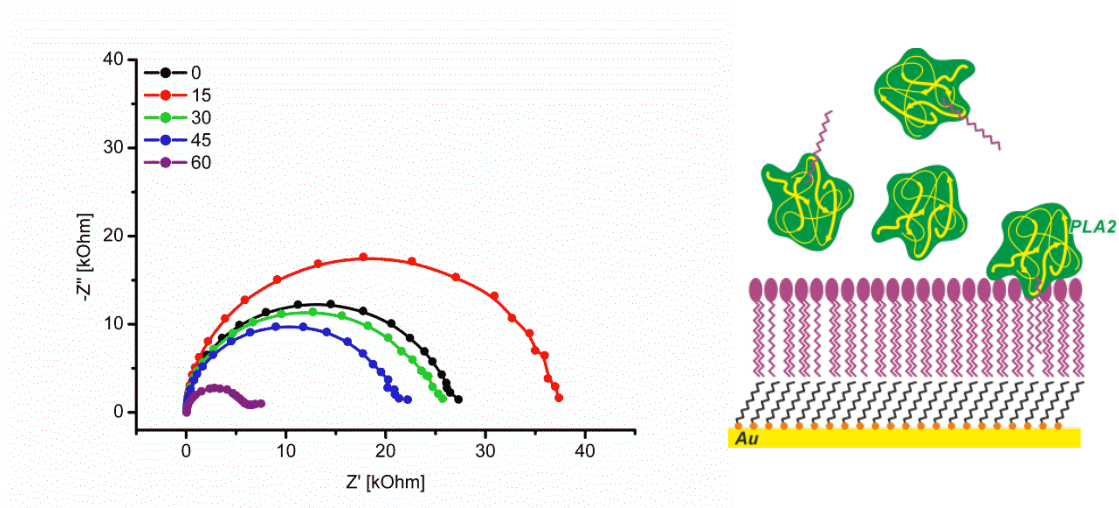
Enzymy można wykorzystać jako narzędzia w inżynierii nanostrukturalnych powierzchni do zastosowań bioelektronicznych i sensorowych. Enzymy z grupy lipaz czy fosfolipaz mogą być wykorzystane jako czynnik modyfikujący architekturę powierzchni pokrytej lipidami. Dwuwarstwy lipidowe stosowane są nie tylko jako modele błon biologicznych, lecz także jako matryce w czujnikach. Przepuszczalność membran lipidowych dla małych jonów jest niewielka [33], dlatego istnieje wiele substancji, które umożliwiają jonom przejście przez błony. Do pierwszej grupy zaliczamy nonaktywnę, monenzynę, czy walinę, które tworzą kompleksy z jonami i mogą dyfundować przez hydrofobowe środowisko membrany [34]. Druga grupa związków działa według innego mechanizmu, a mianowicie tworzy w membranie kanały jonowe umożliwiające transport przez membranę. Przykładem może być gramicydyna A [35].

Lipazy i fosfolipazy są enzymami lipolitycznymi katalizującymi hydrolizę wiązań estrowych odpowiednio w glicerydach i fosfoglicerydach [36]. Katalizowane przez te enzymy reakcje hydrolizy lub estryfikacji (fosfo)lipidów zostały zastosowane jako nowa metoda kontrolowanego tworzenia kanałów w membranach lipidowych [H5]. Selektywność dyfuzji poprzez pory do podłoża elektrodowego, na którym osadzona jest membrana, badano metodami elektrochemicznymi przy użyciu elektroaktywnych próbników takich jak

doksorubicyna czy jony żelazocyjankowe. Opracowanie otrzymywania nanostrukturalnych membran lipidowych o selektywnej przepuszczalności, przeznaczonych do konstrukcji powierzchni przewodzących o zaplanowanej architekturze i funkcjonalności było celem pracy w której używałam enzymu – fosfolipazy A₂.

Zastosowany model membrany to dwuwarstwa lipidowa, jednak w celu unieruchomienia warstwy na powierzchni elektrody zastosowano pochodną tiolową. Hybrydowe warstwy lipidowe były przygotowywane poprzez adsorpcję pochodnej tiolowej na powierzchni elektrody złotej, a następnie drugą warstwę - lipidową przekładano metodą Langmuira–Schaefera, bądź poprzez rozkładanie wcześniej przygotowanych liposomów.

W celu zbadania właściwości wytworzonych warstw hybrydowych zastosowałam spektroskopię impedancyjną w obecności próbnika redoks: $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/^{4-}$.



Rys. 6. Wykresy Nyquista dla hybrydowej dwuwarstwy dodekanotiol–DPPC + cholesterol (7 : 3) unieruchomionej na złotej elektrodzie po inkubacji w roztworze fosfolipazy A₂ (0.01 U ml⁻¹) w roztworze zawierającym K₃[Fe(CN)₆] (5mM), K₄[Fe(CN)₆] (5 mM) oraz elektrolit: TRIS (10 mM), NaCl (150 mM), CaCl₂ (5 mM), pH=8.9, E= 0.26 V, Amp.: 4 mV. Zakres: 100 mHz–10 kHz. [H5]

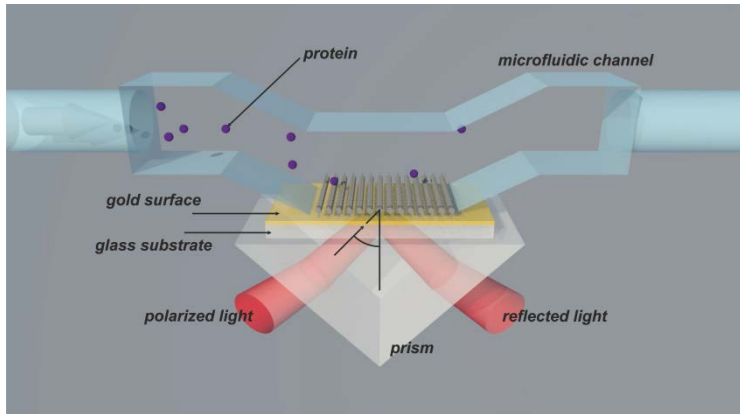
Również obserwację samego procesu katalizowanego przez fosfolipazę A₂ prowadziłam w takim układzie, stosując impedancję faradajowską. Podczas działania fosfolipazy na hybrydowe warstwy lipidowe obserwowałam dwa różne efekty. Pierwszym z nich jest adsorpcja enzymu na hybrydowej dwuwarstwie, co powoduje wzrost grubości warstwy na elektrodzie a tym samym utrudnia przeniesienie elektronu pomiędzy próbnikiem redoks w roztworze a elektrodą. Drugi efekt zaczyna być widoczny po pewnym czasie i jest związany z reakcją enzymatyczną, a więc hydrolizą wiązania estrowego sn-2 w cząsteczkach fosfolipidów i uwalniania jako produktu cząsteczek wolnych kwasów tłuszczowych. Uwalnianie z warstwy cząsteczek kwasów powoduje powstawanie defektów w warstwie i ułatwia transport elektronu

pomiędzy próbnikiem redoks a powierzchnią elektrody. Pierwszy etap czyli adsorpcja enzymu przejawia się na widmie impedancyjnym jako spadek pojemności warstwy podwójnej C_{dl} oraz wzrost oporu przeniesienia ładunku R_{ct} . Etap ten nazywany jest fazą opóźnienia („lag phase”) i trwa od momentu wstrzyknięcia enzymu do momentu pojawienia się impulsu aktywności enzymu [37]. Im większy wzrost właściwości blokujących po dodaniu enzymu tym dłuższa będzie faza opóźnienia. W przypadku hybrydowego układu dodekanotiolu-DPPC (dipalmitoilofosfatydylocholina) faza ta nie była w ogóle obserwowana, co może świadczyć o dużej ilości defektów powstałych w czasie przenoszenia drugiej warstwy-lipidowej metodą Langmuira-Blodgett. Natomiast w przypadku sztywnej i zwartej warstwy zawierającej oprócz DPPC jeszcze cholesterol, faza opóźnienia trwała ok. 30 minut. Z kolei, gdy druga warstwa była tworzona poprzez rozkładanie liposomów, to na powierzchni tworzą się domeny o większej liczbie warstw niż zakładano i czas opóźnienia w tym przypadku był nawet dłuższy (ok. 40 minut), ze względu na większą grubość warstw. Natomiast efekt działania enzymu i tworzenia kanałów w dwuwarstwie można obserwować na widmie impedancyjnym jako zmniejszanie wartości R_{ct} wraz z wydłużeniem czasu reakcji enzymatycznej, a także finalnie pojawienie się impedancji Warburga W , świadczącej o dyfuzyjnym charakterze transportu próbnika redoks, po 60 minutach dla warstwy dodekanotiol – DPPC + cholesterol. Eksperymenty kontrolne wykonałam z kwasem merkaptoundekanowym jako drugą warstwą hybrydowej dwuwarstwy i nie obserwowałam efektów działania enzymu PLA_2 .

Przebieg reakcji enzymatycznej można również obserwować badając właściwości hydrofilowo-hydrofobowe powierzchni. Hybrydowa dwuwarstwa ma charakter hydrofilowy, wynikający z obecności polarnych głów lipidów w zewnętrznej płaszczyźnie dwuwarstwy na elektrodzie. Pod wpływem działania lipazy usunięte zostają częściowo łańcuchy kwasów tłuszczowych, dzięki czemu hydrofobowa część dwuwarstwy zostaje wyeksponowana na zewnątrz, co powoduje wzrost kąta zwilżania do wartości ponad 100° , charakterystycznej dla układów hydrofobowych.

Aby dogłębnie wyjaśnić mechanizm działania lipazy A_2 na hybrydowe warstwy lipidowe unieruchomione na złotym substracie zastosowałam technikę rezonansu plazmonów powierzchniowych (SPR). Zjawisko rezonansu plazmonów powierzchniowych zachodzi gdy światło jest odbijane od cienkiej warstwy metalu (złota). Dzięki zastosowaniu tej techniki możliwa jest obserwacja oddziaływania pomiędzy warstwą unieruchomioną na sensorze, a drugim indywiduum znajdującym się w roztworze, w układzie przepływowym. Gdy światło przechodząc przez ośrodek o wyższym współczynniku załamania światła napotyka granicę faz z

ośrodkiem o niższym współczynniku załamania światła, pod kątem wyższym niż kąt graniczny, ulega całkowitemu wewnętrznemu odbiciu na granicy faz i wraca do ośrodka o wyższym współczynniku załamania światła [38].



Rys. 7. Schemat ilustrujący założenia rezonansu plazmonów powierzchniowych.

Jednak w czasie całkowitego wewnętrznego odbicia bardzo mała część energii tego promienia przenika do ośrodka o niższym współczynniku załamania światła jako fala zanikająca (evanescent field wave).

Amplituda tej fali maleje

wykładniczo wraz z odległością od granicy faz, zanikając w odległości równej długości fali od powierzchni. Jeśli w warunkach całkowitego wewnętrznego odbicia na granicę faz nałożona zostanie cienka (nanometrowa) warstwa metalu fala zanikająca może penetrować warstwę metalu i wzbudzać falę plazmonów powierzchniowych rozchodzącą się po powierzchni będącej w kontakcie z ośrodkiem o niższym współczynniku załamania światła. W przypadku metali, takich jak złoto, fala plazmonów również będzie generować wzmocnioną falę zanikającą. Jedną ze składowych pól elektrycznego tej fali jest skierowana do wnętrza ośrodka o niższym współczynniku załamania światła. Z tego powodu warunki SPR są bardzo czułe na zmiany współczynnika załamania światła na powierzchni złota. Podczas wzbudzania plazmonów przez fotony musi być zachowana energia oraz moment pędu. Ten wymóg jest spełniony gdy wektory falowe fotonu i plazmonu są równe co do wielkości i kierunku dla tej samej częstotliwości. Wektor falowy dla fali plazmonu zależy od współczynnika załamania światła złota oraz ośrodka o niższym współczynniku załamania [39]. Dopasowanie wektora falowego i energii umożliwia wzbudzenie plazmonowe (SPR), powodując charakterystyczny spadek natężenia światła odbitego. Dla danej długości fali padającego światła, SPR jest postrzegane jako spadek (dip) w intensywności światła odbitego pod określonym kątem padania. Ośrodek o niskim współczynniku załamania światła to warstwa pokrywająca powierzchnię sensora (dysku) i otaczający roztwór próbki. Oddziaływania na powierzchni zmieniają stężenie substancji w roztworze i tym samym współczynnik załamania światła w obszarze działania fali zanikającej. Dlatego kąt padania, wymagany do wystąpienia zjawiska SPR, zmienia się i ta zmiana jest

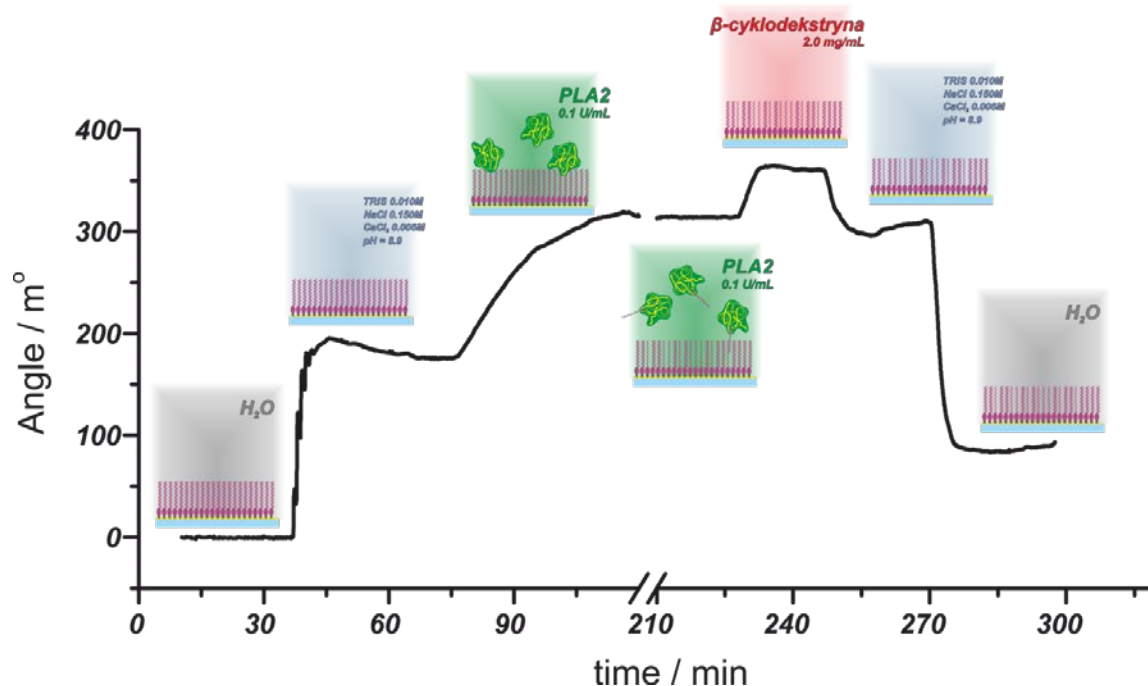
mierzona jako sygnał odpowiedzi. Sensogram jest to krzywa zmian kąta SPR w funkcji czasu, na której można obserwować kinetyczne zdarzenia na powierzchni sensora.

W pracy [H5] użyłam techniki rezonansu plazmonów powierzchniowych SPR do obserwacji procesu rozkładania liposomów jako drugiej warstwy hybrydowej membrany oraz zbadania wpływu lipazy A₂ na tak utworzoną membranę. Podczas prowadzenia eksperymentu SPR otrzymałam *in situ* drugą warstwę (lipidową) na powierzchni złota wcześniej zmodyfikowanej pochodną tiolową. Na podstawie sensogramów otrzymanych podczas rozkładania liposomów zbudowanych z DPPC wyznaczyłam stężenie powierzchniowe DPPC i wynosi ono $1.02 \pm 0.07 \cdot 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{cm}^{-2}$. Następnie na tak przygotowanej powierzchni sensora z zakotwiczoną warstwą tiolową oraz drugą warstwą lipidową prowadziłam reakcję hydrolizy przy użyciu fosfolipazy, obserwując ją w czasie rzeczywistym dzięki technice SPR. Produktem reakcji jest wolny kwas palmitynowy. Podczas reakcji enzymatycznej zostało usunięte ok. $6.48 \pm 0.42 \cdot 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{cm}^{-2}$ kwasu palmitynowego. W przypadku hybrydowej membrany otrzymanej techniką Langmuira–Schaefera ilość usuniętych w wyniku hydrolizy cząsteczek kwasu palmitynowego wynosi $6.60 \pm 0.50 \cdot 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{cm}^{-2}$. Ilość produktu w obydwu przypadkach jest zbliżona, natomiast czas reakcji był krótszy w przypadku membrany tworzonej metodą rozkładania liposomów, co sugeruje bardziej nieuporządkowaną strukturę warstwy i łatwiejszy dostęp enzymu do miejsca reakcji.

Dokсорubicyna była stosowana jako marker właściwości blokujących hybrydowej membrany. Dobrze uporządkowana dwuwarstwa o charakterze hydrofilowym ma właściwości blokujące wobec dokсорubicyny, jako próbnika redoks. Jednak po utworzeniu defektów w membranie w skutek działania fosfolipazy A₂ dokсорubicyna może dyfundować do powierzchni elektrody i tam ulegać redukcji, co jest obserwowane na voltamogramach jako pojawienie się dobrze wykształconych sygnałów, przy wartościach potencjałów odpowiadających redukcji dokсорubicyny na niepokrytej elektrodzie. Jednak w sytuacji, gdy utworzone kanały nie są jeszcze na tyle głębokie by cząsteczki dokсорubicyny mogły dyfundować aż do powierzchni złota, proces redukcji próbnika zachodzi w zewnętrznej warstwie membrany, dzięki czemu obserwowane sygnały redukcji dokсорubicyny położone są przy bardziej ujemnych wartościach potencjałów. Na podstawie analizy sygnałów redukcji dokсорubicyny można więc wnioskować w jakim stopniu zaszła reakcja katalityczna hydrolizy lipidów w membranie.

Modyfikacja lipidów poprzez wprowadzenie do cząsteczki łańcuchów bocznych z grupami tiolowymi może dodatkowo zwiększyć trwałość uzyskanych warstw, a lipidowe

otoczenie zapewnia większą swobodę komunikacji i uzyskania dogodnej orientacji względem podłoża elektrodowego, niż w przypadku ogólnie stosowanych warstw organotiolowych. Jednym z przykładów lipidów stosowanych do zakotwiczenia modelowych dwuwarstw na powierzchni elektrody jest 1,2-dipalmitoilo-sn-glicero-3-fosfotioetanol (DPPE) [40]. Monowarstwa DPPE na powierzchni elektrody badana była w obecności próbnika redoks podczas trwania reakcji katalizowanej przez fosfolipazę A₂. W pracy [H5] dowiodłam, że pierwszym etapem reakcji enzymatycznej jest adsorpcja, co również jest znane z literatury [41]. Produktem reakcji enzymatycznej jest kwas tłuszczowy oraz lizolipid. Defekty tworzone w czasie tej reakcji pozwalają na penetrację próbnika redoks do wnętrza warstwy i zmniejszeniu ulega wartość oporu przeniesienia ładunku. Wraz z wydłużaniem czasu reakcji właściwości blokujące warstwy lipidowej stają się coraz słabsze.



Rys.8. Sensogram zarejestrowany na dysku złotym modyfikowanym tiolipidem DPPE: (1) TRIS (0.010 M), NaCl (0.150 M), CaCl₂ (0.005 M), pH = 8.9 (2) PLA₂ 0.1 U/mL, (3) β-cyklodekstryna 2 mg/mL, (4) bufor, (5) woda.

W pracy [H6] metodą rezonansu plazmonów powierzchniowych obserwowałam adsorpcję enzymu PLA₂ na warstwie tiolowanego lipidu – DPPE unieruchomionego na elektrodzie złotej. Kolejnym etapem jest reakcja hydrolizy i próba usunięcia produktów z warstwy. Ponieważ zastosowanie buforu czy też wody nie przyniosło rezultatu zastosowałam roztwór β-cyklodekstryny w celu usunięcia produktów reakcji enzymatycznej z warstwy. Jednakże ta procedura okazała się nieskuteczna, w przeciwieństwie do obserwacji Mirsky'ego i współpracowników [42]. Następnie zastosowałam substancję powierzchniowo czynną (Triton

X-100 eter polimeru glikolu polietylenowego oraz p-t-oktylofenolu), która skutecznie usunęła cząsteczki kwasów tłuszczowych obecnych po reakcji z warstwy lipidu na elektrodzie. Korzystnym faktem jest to, że Triton X-100 nie był w stanie usunąć cząsteczek lipidów z powierzchni elektrody, czyli nie rozerwał wiązania pomiędzy atomem siarki lipidu a powierzchnią złota. Zatem, substancja powierzchniowo czynna nie zdegradowała warstwy lipidowej a tylko umożliwiła wyflukanie produktów reakcji enzymatycznej. Stężenie powierzchniowe, odpowiadające wymyciu produktów z warstwy, wyniosło: $1.60 \cdot 10^{-10} \text{ mol}\cdot\text{cm}^{-2}$.

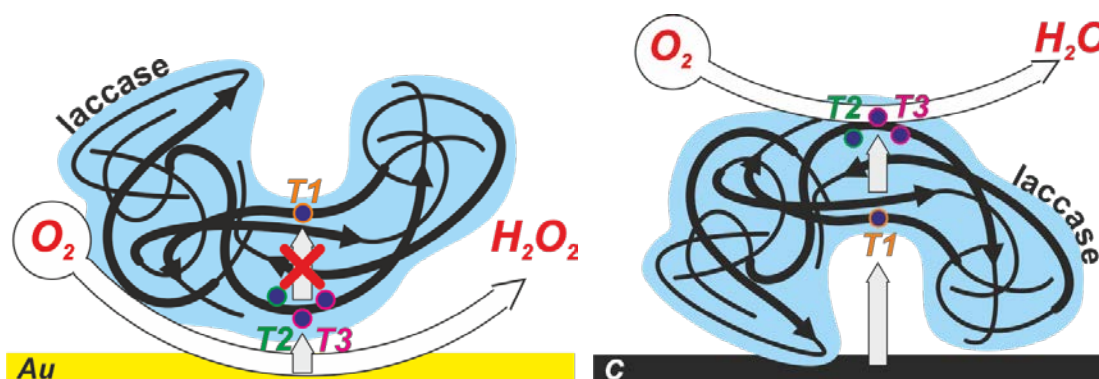
W pracy [H6] stosowałam doksorubicynę jako elektroaktywny wskaźnik właściwości warstwy lipidów zakotwiczonych na elektrodzie. W roztworze o pH=4 doksorubicyna ulega redukcji na elektrodzie z węgla szklonego przy potencjale -0.46 V względem Ag/AgCl i utlenianiu przy potencjale 0.70 V względem Ag/AgCl. Żadnego z tych sygnałów nie obserwuje się w roztworze doksorubicyny na elektrodzie złotej zmodyfikowanej warstwą lipidu DPPE. Natomiast po wystawieniu warstwy lipidowej na działanie lipazy A_2 można zaobserwować dwojakie zachowanie elektrochemiczne doksorubicyny, w zależności od rodzaju defektu. Pierwsze z nich polega na równoczesnej adsorpcji doksorubicyny wraz z enzymem na powierzchni warstwy lipidowej, dlatego pik redukcji leku pojawia się przy bardzo ujemnych wartościach potencjału (-0.60 V względem Ag/AgCl). Drugi typ zachowania można obserwować dopiero po pewnym czasie od zapoczątkowania reakcji hydrolizy i jest on związany z redukcją doksorubicyny w porach, powstałych wskutek hydrolizy wiązań estrowych lipidów w warstwie.

Reakcja enzymatyczna prowadzi do zmian we właściwościach elektrycznych monowarstwy lipidu na elektrodzie. Zmniejszające się właściwości oporowe warstwy można obserwować zarówno przy użyciu impedancji faradajowskiej jak i dzięki zastosowaniu metod elektrochemicznych przy użyciu leku – doksorubicyny, który może wpływać do wnętrza porów i defektów warstwy lipidowej. Dlatego właśnie stosowanie technik elektrochemicznych w tego typu badaniach okazuje się bardzo pomocne.

Stosowanie enzymów o swoistych substratach i nieszkodliwych produktach umożliwia konstrukcję bioogniw paliwowych, które pracują w temperaturze pokojowej i obojętnym pH. Jednak jednym z najważniejszych zagadnień związanym z konstrukcją bioelektrod jest bezpośrednie przeniesienie elektronu (DET) z proteiny redoks do powierzchni elektrody. Wyjątkowo istotnym wyzwaniem jest zapewnienie dobrego kontaktu pomiędzy centrum aktywnym enzymu a elektrodą [43]. W przypadku większości oksydoreduktaz centrum redoks jest zwykle izolowane przez otoczkę białkową. Ze względu na obecność tej otoczki, proteina nie może być utleniania bądź zredukowana na powierzchni elektrody. Z tego powodu stosuje się

mediatory, czyli cząsteczki redoks umożliwiające kontakt elektryczny między enzymem a elektrodą. Bezpośredni transport elektronu może zachodzić dla pewnych protein redoks, a często bywa wspomagany przez stosowanie nanocząstek złota.

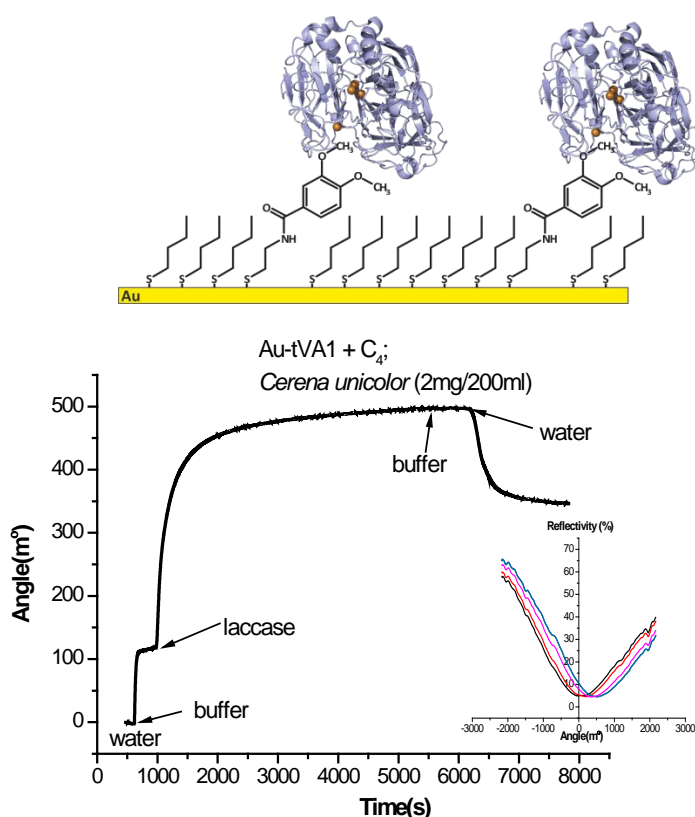
W pracy [H7] jako enzym do konstrukcji katody zastosowano lakazę, czteromiedziowe białko, która katalizuje czteroelektronową redukcję tlenu do wody, bez pośredniego etapu generowania nadtlenu wodoru. Centrum aktywne enzymu zawiera cztery jony miedzi podzielone na trzy grupy. Centrum T1 jest położone we wnętrzu hydrofobowej luki cząsteczki i jest odpowiedzialne za katalityczne utlenianie substratów. Elektrony uwalniane w tym procesie przenoszone są do centrów T2 i T3 (w odległości 1.2 nm od centrum T1), gdzie zachodzi proces redukcji tlenu [44]. Do centrum T1 umieszczonego w hydrofobowej wnęce mogą docierać zarówno elektrony z elektrody jak i mediatory organiczne. Ponadto, hydrofobowa kieszeń enzymu wykazuje powinowactwo do cząsteczek zawierających ugrupowania arylowe, które unieruchomione na powierzchni elektrody mogą wymuszać odpowiednią orientację enzymu w stosunku do elektrody, a tym samym umożliwiać efektywny transfer elektronu [45]. Unieruchomienie enzymu bezpośrednio na elektrodzie skutkuje niską gęstością prądu katalitycznego ze względu na niski stopień pokrycia powierzchni elektrody enzymem. Często wykorzystuje się przewodzące nanomateriały takie jak: nanorurki węglowe [46,47], czerni acetylenową, grafen [48] czy nanocząstki metaliczne w celu zwiększenia rzeczywistej powierzchni pracującej elektrody oraz zapewnienie dobrego kontaktu elektrycznego. Olbrzymią zaletą nanorurek węglowych, jako podłoża do unieruchomienia enzymu jest łatwość ich modyfikacji na końcach czy defektach sieci dzięki czemu można kontrolować dyspersję oraz wiązać enzymy [46, 47]. W porównaniu do struktur węglowych, mniej jest przykładów zastosowania nanocząstek metalicznych w celu unieruchomienia enzymu [49]. W przypadku złota może to wynikać z faktu niekorzystnej orientacji oksydoreduktaz na powierzchni tego materiału. Ponieważ, o ile dowiedziono, że lakaza na elektrodzie węglowej układa się centrum T1 w kierunku powierzchni elektrody, o tyle na



Rys. 9. Schemat ułożenia cząsteczki lakazy na różnych podłożach elektrody

elektrodzie złotej orientacja cząsteczek enzymu jest odwrotna, centrum T2 znajduje się najbliżej powierzchni elektrody [50]. Jednakże można znaleźć również prace, w których autorzy obserwowali DET lakazy na powierzchni elektrody węglowej z unieruchomionymi nanocząstkami złota [49].

Ciekawym rozwiązaniem problemu orientacji enzymu względem powierzchni elektrody jest użycie grup mających silne powinowactwo do luki hydrofobowej lakazy. Najodpowiedniejsze do tego celu wydają się być cząsteczki będące pochodnymi naturalnych substratów enzymu. W pracy [H7] zaprezentowane są wyniki badań wpływu obecności grup „adresujących” na proces adsorpcji enzymu oraz późniejszą katalityczną redukcję tlenu na tak przygotowanych powierzchniach.



Rys. 10. Schemat ilustrujący ułożenie kolejnych warstw na powierzchni [H7].

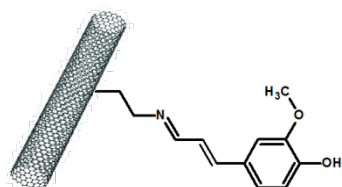
Sensogram zarejestrowany na dysku złotym pokrytym warstwą: tiolowanego kwasu weratrowego i butanotiolu (1:9) w trakcie przepływu: wody, buforu, roztworu enzymu, buforu i wody.

enzymu. Dodatkowym czynnikiem wskazującym na trwałe wiązanie enzymu do powierzchni elektrody jest brak możliwości odmycia enzymu za pomocą wody czy buforu. Takie zachowanie świadczy o wysokim powinowactwie enzymu do badanej powierzchni. Użyteczność złotej elektrody, pokrytej monowarstwą tiolowanego związku, zdolnego do wiązania lakazy jest

Rezonans plazmonów powierzchniowych umożliwia badanie oddziaływań pomiędzy lakazą a powierzchnią modyfikowaną pochodnymi kwasu weratrowego. Kształt sensogramu odzwierciedla adsorpcję lakazy na powierzchni złota zmodyfikowanej odpowiednią pochodną. Pomiar zmiany kąta rezonansowego umożliwia wyznaczenie powierzchniowego stężenia lakazy i wynosi ono $286.4 \pm 5.4 \text{ ng}\cdot\text{cm}^{-2}$.

Obydwie pochodne kwasu weratrowego wykazują dobre dopasowanie cząsteczki do hydrofobowej kieszeni

ograniczona małą liczbą cząsteczek enzymu na powierzchni. Aby osiągnąć dużą gęstość prądu redukcji tlenu, przy możliwie niskich nadpotencjałach, należy skoncentrować się na utworzeniu trójwymiarowego hybrydowego układu nanorurek węglowych, zdolnych do akumulacji znacznie większej ilości enzymu [47]. Dlatego do konstrukcji biokatody wykorzystaliśmy nanorurki modyfikowane podobnymi grupami, będącymi pochodnymi naturalnych substratów lakazy. Porównano kilka typów modyfikowanych nanorurek z unieruchomionymi analogami substratów lakazy. Prąd katalityczny redukcji tlenu na tak modyfikowanych elektrodach jest znacznie większy w przypadku układu z nanorurkami modyfikowanymi analogami substratów lakazy w porównaniu do układów z niemodyfikowanymi nanorurkami, bądź z podstawnikami benzoilowymi. Struktura takich związków sprawia, że geometrycznie są lepiej dopasowane do wnęki hydrofobowej lakazy. Dzięki temu enzym może być ułożony w korzystnej orientacji i bliżej powierzchni elektrody, co ułatwia bezpośredni transport elektronów. Proces katalitycznej redukcji tlenu jest obserwowany przy potencjale 0.55 V względem Ag/AgCl, co odpowiada potencjałowi centrum miedziowego T1 w lakazie. Stałe Michaelis–Menten wyznaczone w badaniach przeprowadzonych w roztworze sugerowały, że nanorurki modyfikowane kwasem syryngowym, bądź weratrowym powinny wykazywać najwyższe powinowactwo do lakazy, a co za tym idzie, na tak modyfikowanych elektrodach powinniśmy osiągać najwyższe gęstości prądu. Jednakże, okazało się, że najwyższy stosunek wartości prądu katalitycznego do prądu tła obserwowano na elektrodach modyfikowanych nanorurkami z resztami kwasu ferulowego.



Rys. 11. Schemat nanorurki węglowej z resztą kwasu ferulowego [H7].

Powinowactwo lakazy silnie zależy od pochodzenia enzymu, jego czystości oraz rodzaju substratu. Umieszczenie biokatody, modyfikowanej nanorurkami z resztami kwasu ferulowego oraz zaadsorbowaną lakazą, w hybrydowym ogniwie z drutem cynkowym jako anodą prowadzi do układu w którym potencjał otwartego ogniwa wynosi 1.71 V, a maksymalna gęstość mocy wynosi $5.1 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ przy potencjale 0.6 V względem Ag/AgCl. Otrzymana wartość jest znacznie wyższa niż w przypadku analogicznego układu bez zaadsorbowanej lakazy.

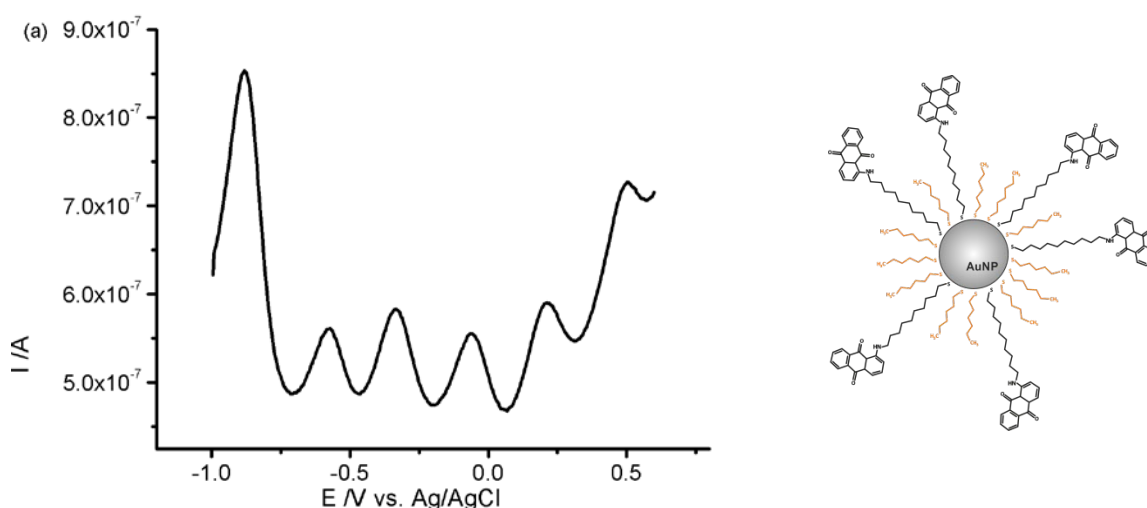
Kontynuacją obiecujących badań, dotyczących zastosowania lakazy do konstrukcji biokatody, było unieruchomienie enzymu na trójwymiarowej sieci nanocząstek złota. Do tego celu postanowiłam użyć nanocząstek złota o rozmiarach poniżej 2 nm o zupełnie innych właściwościach niż większe nanocząstki. Rozmiar nanocząstek złota wpływa na ich optyczne

i elektryczne właściwości. Przykładowo, pasmo plazmonów powierzchniowych (SPB) obserwowane jest dla nanocząstek złotych o rozmiarach powyżej 2 nm [51], natomiast zanika, gdy rozmiar nanocząstek spada poniżej 2 nm i na widmie pojawiają się zupełnie inne pasma przy ok. 680, 450 oraz 400 nm [52]. Właściwości elektrochemiczne nanocząstek również zależą od rozmiaru rdzenia [53]. Możliwe są trzy typy zachowania elektrochemicznego nanocząstek w roztworze: zachowanie „bulk-continuum”, zachowanie typu kwantowego ładowania warstwy podwójnej („quantum double layer charging”), oraz zachowanie zbliżone do zachowania molekuł („molecule-like”). W literaturze podaje się umownie określone granice rozmiarów rdzenia nanocząstek dla których występuje określony typ zachowania. I tak, poniżej rozmiaru rdzenia 1.4 nm nanocząstki właściwie nazywane już klasterami, zachowują się jak cząsteczki redoks-aktywne, co oznacza, że można obserwować proces przeniesienia pojedynczego elektronu na krzywej woltamperometrycznej. Przerwa energetyczna pomiędzy procesem przyjęcia pierwszego elektronu, a procesem oddania pierwszego elektronu jest opisywana jako „molecule-like HOMO-LUMO band gap” [54]. Wraz ze wzrostem rozmiaru rdzenia można obserwować wiele sygnałów pochodzących od ładowania nanocząstki. Natomiast, gdy rozmiar złotego rdzenia nanocząstki przekroczy 2.2 nm nie obserwuje się już żadnych sygnałów.

W latach dziewięćdziesiątych zeszłego stulecia Natan i współpracownicy pokazali, że warstwa nanocząstek złota unieruchomionych na powierzchni elektrody pokrytej warstwą organotiolową zachowuje się jak złota elektroda [55]. Być może jest to powód, dla którego w szeregu prac poświęconych unieruchamianiu lakazy na powierzchni modyfikowanej nanocząstkami złota wykazano brak aktywności enzymu. W późniejszych pracach pokazano, że warstwa nanocząstek złotych zaadsorbowana na blokującej warstwie tiolowej na elektrodzie może „włączać” zachowanie faradajowskie substancji redoks w roztworze [56, 57]. Oznacza to, że stała szybkości przeniesienia elektronu między warstwą nanocząstek złota a powierzchnią elektrody, pomimo warstwy alkanotiolowej pomiędzy nimi, nie zależy od grubości tej warstwy (do ok. 20 Å). Z powodu niskiej pojemności, wynikającej z obecności warstwy alkanotiolowej, takie układy zbudowane z elektrody pokrytej warstwą tiolową i nanocząstkami złota stanowią dobrą matrycę do unieruchamiania enzymów i ułatwiają sprzężanie pomiędzy centrum aktywnym enzymu a powierzchnią elektrody [58].

Praca [H8] opisuje zastosowanie nanocząstek złotych o małych rozmiarach do unieruchomienia na powierzchni elektrody lakazy, a następnie zbadania aktywności katalitycznej układu. W pracy [H8] opracowałam metodę otrzymywania złotych nanocząstek

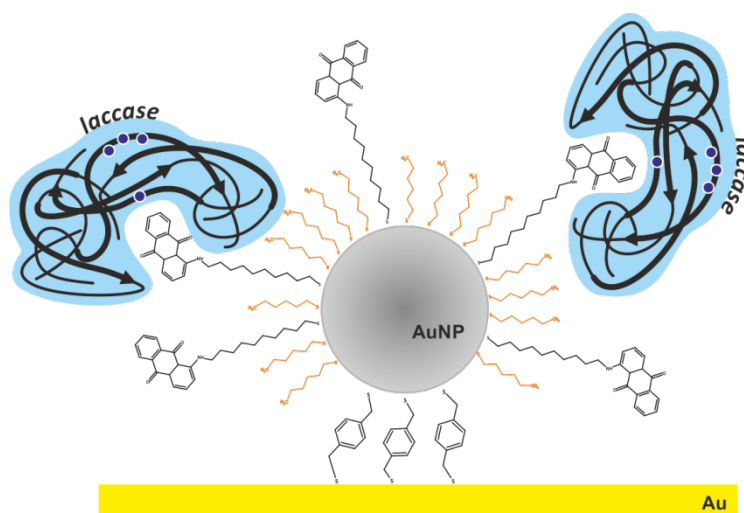
o rozmiarze ok. 2 nm modyfikowanych dwoma różnymi tiolami. W taki sposób wyeliminowany został etap wymiany ligandu na nanocząstkach złotych już po ich otrzymaniu. Kluczowym elementem procedury jest etap redukcji jonów złota (III) i tworzenia polimerów pomiędzy jonami złota (I) a cząsteczkami tiolowych pochodnych. W zależności od rozmiarów powstających polimerów, otrzymywane są bardziej lub mniej monodispersyjne mieszaniny nanocząstek złota. Także etap starzenia nanocząstek wpływa na polidispersyjność próbek, ponieważ zgodnie z literaturą nanocząstki złota o faworyzowanej liczbie atomów wymagają kilkudziesięciu godzin starzenia w niskiej temperaturze [52]. Rozmiar otrzymanych nanocząstek potwierdziłam przy użyciu metody korelacji fotoelektronów oraz transmisyjnej mikroskopii elektronowej. Promień hydrodynamiczny nanocząstek modyfikowanych heksanotiolem wynosił 1.55 ± 0.10 nm, a nanocząstek modyfikowanych zarówno heksanotiolem jak i pochodną antrachinonową wynosił 3.64 ± 0.12 nm. Natomiast z pomiarów przy użyciu TEM uzyskałam rozmiar samego rdzenia otrzymanych nanocząstek złota i wynosił on odpowiednio: 1.25 ± 0.29 nm, oraz 1.94 ± 0.74 nm dla AuNPs zmodyfikowanych heksanotiolem i AuNPs zmodyfikowanych heksanotiolem i pochodną antrachinonową. Również właściwości optyczne otrzymanych nanocząstek potwierdzały doniesienia literaturowe. Wielkość rdzenia nanocząstek złotych modyfikowanych heksanotiolem i pochodną antrachinonową sugeruje, że zachowanie elektrochemiczne roztworu takich nanocząstek powinno przypominać kwantowe ładowanie warstwy podwójnej.



Rys. 12 . Woltamogram fali prostokątnej (OSWV) zarejestrowany w roztworze 0.1M TBAHFP/
 CH_2Cl_2 zawierającym AuNPs modyfikowane heksanotiolem i pochodną antrachinonową [H8].

I faktycznie, na krzywej voltamperometrycznej można obserwować szereg pików ładowania rdzenia oraz sygnał redukcji ligandu antrachinonowego przy potencjale ok -0.9 V względem Ag/AgCl.

Celem badań opisanych w pracy było unieruchomienie enzymu – lakazy na nanocząstkach złota i z tego powodu zawierają one na powierzchni pochodne antrachinonowe, które pasują do hydrofobowej luki enzymu.



Rys. 13. Schemat unieruchomienia lakazy na warstwie nanocząstek złota związanych z podłożem elektrody złotej [H8].

Proces tworzenia kolejnych warstw był monitorowany za pomocą spektroskopii impedancyjnej oraz spektroskopii plazmonów powierzchniowych.

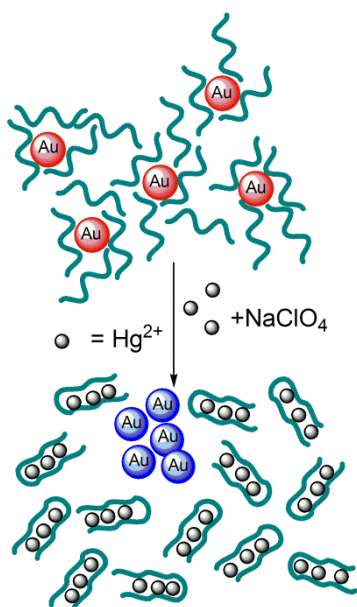
Eksperymenty przeprowadzone z użyciem impedancji faradajowskiej przeprowadziłam w obecności próbnika redoks $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$, a po zarejestrowaniu i zweryfikowaniu widm opracowałam model obwodu zastępczego i na tej podstawie wyznaczyłam parametry opisujące właściwości układu na elektrodzie. Pierwsza warstwa, czyli warstwa 1,4-benzenodimetanotolu ma właściwości blokujące, dlatego prowadzi do powstawania półkola na wykresie Nyquista odpowiadającego oporowi przeniesienia ładunku. Adsorpcja nanocząstek złotych powoduje zmniejszenie oporu przeniesienia ładunku, co jest w zgodzie z danymi literaturowymi [56, 57, 58]. Proces adsorpcji enzymu na warstwie nanocząstek skutkuje zwiększeniem wartości R_{ct} i efekt ten jest największy w przypadku małych nanocząstek zmodyfikowanych heksanotiolem oraz grupami o dużym powinowactwie do lakazy, a najmniejszy dla AuNPs o średnicy 10 nm. Potwierdzeniem otrzymanych wyników były badania SPR. W przypadku nanocząstek złotych zmodyfikowanych heksanotiolem i pochodną antrachinonową obserwowałam największy przyrost masy enzymu na sensorze SPR: $469.7 \pm 7.2 \text{ ng} \cdot \text{cm}^{-2}$. Taki wniosek nie jest nieoczekiwany, ponieważ w pracy [H7] dowiodłam, że grupy o

dużym powinowactwie do lakazy powodują zwiększoną adsorpcję na płaskiej powierzchni. W przypadku nanocząstek złotych modyfikowanych grupami antrachinonowymi mamy do czynienia z trójwymiarową powierzchnią i większą liczbą grup antrachinonowych niż na powierzchni płaskiej, zatem stopień adsorpcji enzymu jest znacznie większy. Stopień pokrycia enzymem powierzchni zależy zarówno od obecności grup „adresujących” jak i rozmiaru nanocząstek złotych. Na podstawie wyników otrzymanych dla dysku modyfikowanego warstwą największych nanocząstek złota wyznaczyłam najmniejszy stopień pokrycia enzymem. W przypadku zastosowań takich układów najistotniejszy jest nie stopień pokrycia elektrody enzymem a zachowanie aktywności enzymu na elektrodzie. Eksperymenty przeprowadzone w buforze Mc’Ilvaine’a dowiodły obecności fali redukcji tlenu katalizowanej przez lakazę, unieruchomioną na warstwie AuNPs zmodyfikowanych heksanotiolem i pochodną antrachinonową. Obserwowany potencjał katalitycznej redukcji tlenu wynosi 0.6 V względem Ag/AgCl i odpowiada termodynamicznemu potencjałowi centrum T1 w lakazie, co świadczy o zachowaniu jej aktywności po unieruchomieniu jej w hybrydowym układzie na elektrodzie.

Podsumowując, w niniejszej pracy zaproponowałam metodę syntezy odpowiednio modyfikowanych nanocząstek złota o rozmiarze poniżej 2 nm, zaproponowałam trójwymiarowy układ zawierający modyfikowane nanocząstki złota do unieruchomienia enzymu, zbadałam proces adsorpcji enzymu oraz udowodniłam zachowanie aktywności lakazy w proponowanym układzie obejmującym warstwę małych nanocząstek złotych modyfikowanych grupami antrachinonowymi, warstwę ditiolu, oraz elektrodę złotą.

Większe nanocząstki złota zastosowałam do oznaczania jonów metali ciężkich. W badaniach opisanych w pracy [H9] oznaczałam jony rtęci (II) dzięki wykorzystaniu zjawiska agregacji nanocząstek złota. Zjawisko to polega na łączeniu nanocząstek w większe ugrupowania wskutek pozbawienia nanocząstek otoczki ochronnej, gwałtownego zwiększenia siły jonowej roztworu nanocząstek złota, czy też pod wpływem światła. Duże nanocząstki złota (10-20 nm) otrzymywane metodą Turkevicha [59] są stabilizowane jonami cytrynianowymi, związanymi elektrostatycznie z rdzeniem nanocząstki, co oznacza, że łatwo mogą agregować. Gdy w roztworze nanocząstek złota stabilizowanych cytrynianami znajdują się inne cząsteczki o większym powinowactwie do dodatnio naładowanego rdzenia nanocząstek, jony cytrynianowe zostaną usunięte z powierzchni i zastąpione nowymi ligandami. W ten sposób ujemnie naładowane nici DNA oddziałują z nanocząstkami złota i adsorbują się na ich powierzchni, co uniemożliwia agregację. Zastosowana w pracy [H9] sekwencja DNA (5'-TTCTTTCTCCCTTGTTTGTT-3') została tak zaprojektowana, aby mogła tworzyć strukturę spinki

w obecności jonów rtęci, które z resztami tyminowymi kwasu nukleinowego tworzą stabilny kompleks. Zatem dodanie jonów Hg^{2+} do roztworu złotych klasterów oblepionych



Rys. 14. Schemat detekcji jonów Hg^{2+} za pomocą AuNPs [H9].

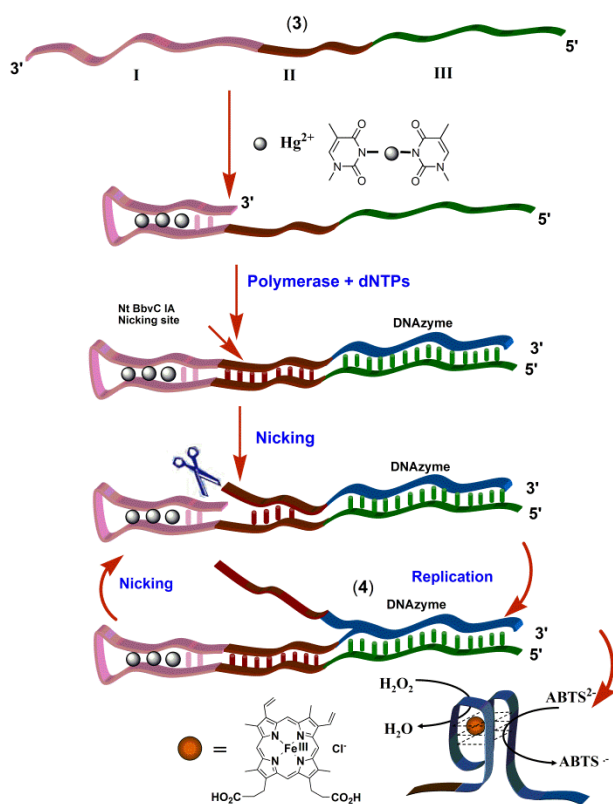
zaprojektowanym DNA powoduje powstawanie wspomnianej struktury spinki, kompleksu DNA z jonami rtęci. Nanocząstki złote, które nie są już stabilizowane cząsteczkami DNA, w obecności dużego nadmiaru soli agregują, co widoczne jest jako zmiana barwy roztworu z różowo-czerwonej na fioletową. Sól zastosowana do zwiększenia siły jonowej roztworu to nadchloran sodu, który nie tworzy z jonami rtęci trudno rozpuszczalnych soli. Zmiany barwy roztworu nanocząstek złotych można śledzić za pomocą spektroskopii UV/Vis, bowiem zsyntezowane klasterki miały średnicę ok. 12-14 nm, tak więc na widmie elektronowym obecne jest pasmo absorpcji ok. 520nm, natomiast proces agregacji zmienia położenie tego pasma. Granica oznaczalności wynosi 2ppb jonów Hg^{2+} . W celu

potwierdzenia zachodzącej agregacji nanocząstek złota zastosowano transmisyjną mikroskopię elektronową. Natomiast nanocząstki złota stabilizowane cząsteczkami DNA o sekwencji (5'-CCAACCCCCAGAAAGAA-3') nie ulegają procesowi agregacji w obecności jonów Hg^{2+} , gdyż nie tworzy się kompleks pomiędzy jonami rtęci a nicią DNA z powodu braku reszt tyminowych. Dlatego nanocząstki złota w obecności nadmiaru soli w roztworze pozostają zabezpieczone cząsteczkami DNA i nie ulegają agregacji.

Druga z metod oznaczania jonów rtęci opiera się działaniu maszyny DNA, czyli układu ze wzmocnieniem sygnału. Maszyna DNA w obecności analitu i odpowiednich substratów, oraz enzymów zaczyna działać. Do procesów, które mogą wykonywać maszyny zalicza się replikację, cięcie, usuwanie fragmentów DNA, itp. [60]. Zaprojektowana nić DNA zwana „track” (5'-CCCAACCCGCCCTACCCGCTGAGGTTCCCAAGATTCTTCTCCCTTGTTTGTCTGGGG-3') zawiera trzy domeny. Pierwsza domena zaprojektowana jest w taki sposób, by rozpoznawać i wiązać jony rtęci, czyli zawiera wiele reszt tyminowych. Druga domena jest sercem maszyny, ponieważ zawiera sekwencję komplementarną do sekwencji, która po replikacji będzie rozpoznawalna przez enzym tnący Nt BbvC 1A. Natomiast trzecia domena zawiera sekwencję komplementarną do DNAzemu („DNA-zyme”), który naśladuje działanie peroksydazy chrzanowej. DNAzym jest to krótki odcinek nici DNA o właściwościach katalitycznych.

W niniejszej pracy zastosowałam DNAzym, który jest kompleksem G-kwadrupleksu z heminą. Utworzony kompleks może katalizować reakcję pomiędzy cząsteczką substratu (np. $ABTS^{2-}$, dwuanion kwasu 2,2-azynobis(3etylobenzotiazolino-6-sulfonowego) i nadtlenkiem wodoru.

W obecności jonów rtęci domena pierwsza zwiija się w strukturę spinki, gdzie 3'-koniec hybrydyzuje z odpowiednią częścią „DNA track”. Formowanie dwuniciowego regionu uruchamia w obecności wolnych zasad i polimerazy proces replikacji i budowę nici komplementarnej. W replikowanym obszarze drugim znajduje się specyficzna sekwencja dla enzymu tnącego i w obecności tego enzymu dochodzi do odcięcia produktu zawierającego DNAzym. Replikacja rozpoczyna się od nowa a powstały DNAzym w obecności heminy zwiija



Rys. 15. Zasada oznaczania jonów Hg^{2+} za pomocą maszyny DNA [H9].

się w G-kwadrupleks, który naśladuje działanie peroksydazy chrzanowej i katalizuje utlenianie $ABTS^{2-}$ przez H_2O_2 . Powstawanie barwnego produktu $ABTS^{\cdot}$ obserwowane jest jako zmiana absorbancji przy określonej długości fali i jest proporcjonalne do stężenia jonów Hg^{2+} . Limit oznaczania tej metody jest nawet niższy niż poprzedniej i wynosi 200ppt jonów rtęci. W nieobecności jonów rtęci w roztworze pojawia się szczątkowa odpowiedź, będąca wynikiem samorzutnego zwiijania nici DNA bez udziału jonów rtęci. Również próba uruchomienia maszyny DNA przez inne

dwudodatnie jony powoduje powstawanie szczątkowej odpowiedzi, zbliżonej do wielkości obserwowanej przy braku jonów Hg^{2+} w otoczeniu maszyny. Ponadto, eksperymenty potwierdzono stosując elektroforezę żelową. W obecności jonów Hg^{2+} pojawiało się nowe pasmo odpowiadające masie powstającego DNAzymu.

W niniejszej pracy zastosowałam dwa podejścia oznaczania jonów rtęci oparte na oddziaływaniu specjalnie zaprojektowanych nici DNA z jonami rtęci. Pierwsze z nich, wykorzystujące proces agregacji nanocząstek złota charakteryzuje się dużą prostotą, natomiast drugie, wykorzystujące działanie maszyny DNA umożliwia podwójne wzmocnienie sygnału.

Ponieważ rozpoznanie jonów Hg^{2+} włącza autonomiczne działanie maszyny, która syntezuje cząsteczki DNAzymu. Powtarzająca się synteza DNAzymu oraz jego katalityczna aktywność są odpowiedzialne za dwuetapowe wzmocnienie sygnału odpowiadającego stężeniu jonów rtęci.

4. | *podsumowanie*

Za swoje najważniejsze osiągnięcia uważam:

- skonstruowanie rotaksanu multimetalicznego na powierzchni elektrody złotej i opis jego tworzenia dzięki technikom elektrochemicznym (otrzymywanie funkcjonalnych nanomaszyn),
- zastosowanie oddziaływań donorowo-akceptorowych do tworzenia powierzchni o kontrolowanej zwilżalności, opis zjawiska za pomocą technik elektrochemicznych,
- oznaczenie aktywności enzymów (z grupy kinaz) dzięki zaprojektowaniu warstwy sensorowej za pomocą technik elektrochemicznych, w tym impedancji faradajowskiej,
- tworzenie modelowych membran na powierzchni i modyfikowanie ich kontrolowanymi defektami przy udziale enzymów hydrolizujących wiązania estrowe oraz zastosowanie technik impedancyjnych oraz spektroskopii rezonansu plazmonów powierzchniowych do obserwacji i opisu zjawiska,
- zaprojektowanie biokatody opartej na działaniu lakazy unieruchomionej na podłożu modyfikowanym substratami reakcji katalitycznej, zbadanie zjawiska przy użyciu spektroskopii rezonansu plazmonów powierzchniowych,
- opracowanie metody syntezy nanocząstek złota o rozmiarach poniżej 2 nm zmodyfikowanych dwoma różnymi pochodnymi tiolowym i wykorzystanie tych nanocząstek do unieruchomienia w trójwymiarowej sieci enzymu – lakazy z zachowaniem aktywności katalitycznej w kierunku redukcji tlenu do wody,
- opracowanie metod oznaczania jonów rtęci w wodzie na podstawie oddziaływania jonów Hg^{2+} z resztami tyminowymi, przy użyciu nici DNA oraz nanocząstek złota.

W swoich badaniach wykorzystuję nowoczesne metody chemiczne, ale także techniki kojarzone z biologią molekularną, fizyką doświadczalną i innymi dziedzinami, między innymi wszelkie techniki elektrochemiczne, spektroskopię impedancyjną, spektroskopię UV/Vis, rezonans plazmonów powierzchniowych, mikroskopię sił atomowych, pomiar kąta zwilżania, technikę Langmuira-Blodgett, technikę mikrowagi kwarcowej, elektroforezę żelową i inne.

W badaniach zajmowałam się głównie układami unieruchomionymi na powierzchni elektrod oraz nanocząstek złota i stosowałam metody woltamperometryczne do badania tychże warstw, oraz ich oddziaływania z konkretnymi indywiduami. Przy użyciu metod elektrochemicznych zaobserwowałam tworzenie struktury splecionej jaką był rotaksan zbudowany z cząsteczek kompleksów makrocyklicznych, które wymuszają zdefiniowaną architekturę i umożliwiają obserwację elektrochemiczną.

W ramach badań powierzchniowych zaprojektowałam również powierzchnię o zmiennych właściwościach hydrofilowych, przełączaną elektrochemicznie oraz chemicznie dzięki istnieniu oddziaływań donorowo-akceptorowych. Zaprojektowałam również powierzchnie sensorowe do oznaczania aktywności enzymów z klasy kinaz.

Enzymy z grupy fosfolipaz wykorzystałam jako czynnik modyfikujący warstwę lipidową unieruchomioną na powierzchni elektrody. Użycie enzymów umożliwiło tworzenie kanałów wewnątrzmembranowych, a proces ten zbadałam zarówno przy użyciu metod spektroskopowych jak i elektrochemicznych. Efektem badań jest opracowanie opartej na katalizie enzymatycznej, technologii otrzymywania nanostrukturalnych membran lipidowych o selektywnej przepuszczalności, przeznaczonych do konstrukcji powierzchni przewodzących o zaplanowanej architekturze i funkcjonalności do zastosowań jako elementów urządzeń bioelektronicznych oraz miniaturowych sensorów elektrochemicznych.

Opracowałam również podstawy konstrukcji biokatody stosowanej do bioogniw paliwowych przy użyciu enzymu - lakazy, która katalizuje czteroelektronową redukcję tlenu do wody, bez pośredniego etapu generowania nadtlenu wodoru. Aby zoptymalizować działanie takich elektrod, używanych do konstrukcji bioogniwa paliwowego, testowane były różne procedury immobilizacji enzymów, tak by zapewnić odpowiedni kontakt z materiałem elektrody.

Zaproponowałam metodę syntezy nanocząstek złota o rozmiarze poniżej 2 nm modyfikowanych grupami mającymi powinowactwo do lakazy. Zaprojektowałam trójwymiarową sieć zawierającą modyfikowane nanocząstki złota do unieruchomienia enzymu. Zbadałam, przy pomocy impedancji faradajowskiej oraz spektroskopii rezonansu plazmonów powierzchniowych, proces adsorpcji enzymu na warstwie nanocząstek. Dowiodłam, że poza obecnością grup o wysokim powinowactwie do enzymu, istotnym czynnikiem wpływającym na proces adsorpcji jest wielkość nanocząstek złota.

Udowodniłam także, że lakaza zaadsorbowana na proponowanym układzie obejmującym warstwę nanocząstek złotych modyfikowanych grupami antrachinonowymi, warstwę ditiolu, oraz elektrodę złotą, pozostaje aktywna.

Opracowałam metody oznaczania jonów rtęciowych dzięki oddziaływaniom tych jonów z resztami tyminowymi specjalnie zaprojektowanych przeze mnie sekwencji DNA. Pierwsza z tych bioanalitycznych metod opiera się na procesie agregacji nanocząstek złota zabezpieczonych cząsteczkami DNA, które w obecności jonów Hg^{2+} tworzą z nimi kompleks uwalniając prawie nagie nanocząstki złota. Druga z opracowanych przeze mnie metod polega na autonomicznym działaniu maszyny DNA uruchamianej przez obecność jonów rtęci. Maszyna DNA generuje wielokrotnie syntezę DNAzymu, który katalizuje barwną reakcję, zatem wzmocnienie sygnału jest dwuetapowe.

5. | *cytowana literatura*

- [1] R. N. Kostoff, R. G. Koytcheff, C. G. Y. Lau;
"Structure of the nanoscience and nanotechnology applications literature."
The Journal of Technology Transfer, 2008, 33, 472-484.
- [2] E. Katz, I. Willner;
"Integrated nanoparticle-biomolecule hybrid systems: synthesis, properties, and applications."
Angew. Chem. Int. Ed., 2004, 43, 6042-6108.
- [3] J.-M. Lehn, „Supramolecular Chemistry – Concepts and Perspectives”,
Verlag Chemie, Weinheim 1995.
- [4] M.A. Reed, J.M. Tour;
"Computing with molecules"
Sci. Am., 2000, 282, 86 – 93.
- [5] A.M. Brouwer, C. Frochot, F.G. Gatti, D.A. Leigh, L. Mottier, F. Paollucci, S. Roffia, G.W.H. Wurpel;
"Photoinduction of fast, reversible translational motion in a hydrogen-bonded molecular shuttle"
Science, 2001, 291, 2124-2128.
- [6] A. Ulman;
"An introduction to ultrathin films: From Langmuir-Blodgett to self-assembly"
Academic Press, New York, 1991.
- [7] K. B. Blodgett, I. Langmuir;
"Built-up films of barium stearate and their optical properties"
Phys. Rev., 1937, 51, 964 –982.
- [8] K. B. Blodgett;
"Films built by depositing successive monomolecular layers on a solid surfaces"
J. Am. Chem. Soc., 1935, 57, 1007-1022.
- [9] W. C. Bigelow, D.L. Pickett, W. A. Zisman;
"Oleophobic monolayers. films adsorbed from solution in non-polar liquids"
J Colloid Sci. 1946, 1, 513–538.
- [10] R. G. Nuzzo, D.L. Allara;
"Adsorption of bifunctional organic disulfides on gold surfaces"
J. Am. Chem. Soc., 1983, 105, 4481-4483.
- [11] H. O. Finklea, S. Avery, M. Lynch, T. Furtusch;
„Blocking oriented monolayers of alkyl mercaptans on gold electrodes"

- Langmuir, 1987, 3, 409-410.
- [12] A. Ulman;
"Formation and structure of self-assembled monolayers"
Chem. Rev., 1996, 96, 1533-1554.
- [13] J. P. Folkers, P. E. Laibinis, G. M. Whitesides;
"Self-assembled monolayers of alkanethiols on gold: comparisons of monolayers containing mixtures of short and long-chain constituents with CH₃ and CH₂OH terminal groups"
Langmuir, 1992, 8, 1330-1341
- [14] K. Doblhofer, J. Figura, J-H. Fuhrhop;
"Stability and electrochemical behavior of "self-assembled" adsorbates with terminal ionic groups"
Langmuir, 1992, 8, 1811-1816.
- [15] B. Korybut – Daszkiewicz, A. Więckowska, R. Bilewicz, S. Domagała, K. Woźniak;
"Novel [2]catenane structure introducing communication between two Nickel(II) centers via $\pi\cdots\pi$ interactions"
J. Am. Chem. Soc., 2001; 123, 9356-9366.
- [16] B. Korybut – Daszkiewicz, A. Więckowska, R. Bilewicz, S. Domagała, K. Woźniak;
"An electrochemically controlled molecular shuttle"
Angew. Chem. Int. Ed., 2004; 43, 1668-1672.
- [17] P. R. Ashton, P. T. Glink, J. F. Stoddart, P. A. Tasker, A. J. P. White, D. J. Williams;
"Self-assembling [2]- and [3]rotaxanes from secondary dialkylammonium salts and crown ethers"
Chem. Eur. J., 1996, 2, 729-736.
- [18] T. Ikeda, I. Aprahamian, J. F. Stoddart;
"Blue-colored donor-acceptor [2]rotaxane"
Org. Lett., 2007, 9, 1481-1484.
- [19] P. Gaviña, J.-P. Sauvage;
"Transition – metal template synthesis of a rotaxane incorporating two different coordinating units in its thread"
Tetrahedron Lett. 1997, 38, 3521-3524.
- [20] J.-P. Collin, V. Heitz, S. Bonnet, J.-P. Sauvage;
"Transition metal-complexed catenanes and rotaxanes in motion: Towards molecular machines"
Inorg. Chem. Commun., 2005, 8, 1063–1074.
- [21] G. McHale, N. J. Shirtcliffe, M. I. Newton;
"Super-hydrophobic and super-wetting surfaces: Analytical potential?"
Analyst, 2004, 129, 284-287.
- [22] X. Wang, A. B. Kharitonov, E. Katz, I. Willner;
"Potential-controlled molecular mechanics of bipyridinium monolayer-functionalized surfaces; electrochemical and contact angle analyses"
Chem. Commun., 2003, 1542-1543.
- [23] X. Wang, E. Katz, I. Willner;
"Potential-induced switching of electrical contact by controlling droplet shapes at hydrophilic/hydrophobic interfaces"
Electrochem. Commun., 2003, 5, 814-818.
- [24] G. Manning, D. B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter, S. Sudarsanam;
"The protein kinase complement of the human genome"
Science, 2002, 298, 1912-1934.
- [25] Y. Umezawa;
"Genetically encoded optical probes for imaging cellular signaling pathways"
Biosens. Bioelectron. 2005, 20, 2504-2511.
- [26] H. Nordin, M. Jungnelius, R. Karlsson, O. P. Karlsson;
"Kinetic studies of small molecule interactions with protein kinases using biosensor technology"
Anal. Biochem., 2005, 340, 359-368
- [27] R.-H. Yeh, C.-A. Chen, D. S. Lawrence;

- “Biosensors of protein kinase action: from in vitro assays to living cells”
Biochim Biophys. Acta, 2004, 1697, 39-51.
- [28] K. Kerman, M. Chikae, S. Yamamura, E. Tamiya;
“Gold nanoparticle-based electrochemical detection of protein phosphorylation”
Anal. Chimica Acta 2007, 588, 26–33.
- [29] M. Schutkowski, U. Reineke, U. Reimer;
“Peptide arrays for kinase profiling”
ChemBioChem. 2005, 6, 513-521.
- [30] Z. Wang, J. Lee, A. R. Cossins, M. Brust;
“Microarray-based detection of protein binding and functionality by gold nanoparticle probes”
Anal. Chem. 2005, 77, 5770-5774.
- [31] A. Lasia;
“Electrochemical impedance spectroscopy and its applications”,
Modern Aspects of Electrochemistry, B. E. Conway, J. Bockris, and R.E. White, Edts., Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 1999, Vol. 32.
- [32] J. R. Macdonald;
“Impedance spectroscopy”
Ann. Biomed. Eng., 1992, 20, 289-305.
- [33] J. de Gier;
“Permeability barriers formed by membrane lipids”
Bioelectrochem. Bioenerg., 1992, 27, 1-10.
- [34] A. Hochapfel, H. Hasmonay, M. Jaffrain, P. Peretti;
“A monolayer study of the antibiotic ionophore monensin: pH influence and salt effects”
Thin Solid Films, 1992, 221, 292-297.
- [35] T. M. Fylesa;
“Synthetic ion channels in bilayer membranes”
Chem. Soc. Rev., 2007, 36, 335-347.
- [36] D. L. Scott, S. P. White, Z. Otwinowski, W. Yuan, M. Gelb, P. B. Sigler;
“Interfacial catalysis: the mechanism of phospholipase A2”
Science, 1990, 250, 1541–1546.
- [37] R. H. Schaloske, E. A. Dennis;
“The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system”
Biochim. Biophys. Acta, 2006, 1761, 1246–1259.
- [38] F. M. Mirabella, N. J. Harrick;
Internal reflection spectroscopy: Review and supplement;
Harrick Scientific Corporation Ossining, NY: 1985.
- [39] J. Homola;
“Surface plasmon resonance sensors for detection of chemical and biological species”
Chem. Rev., 2008, 108, 462-493.
- [40] D.J. Qian, C. Nakamura, J. Miyake;
“Spectroscopic studies of the multiporphyrin arrays at the air–water interface and in Langmuir–Blodgett films”
Thin Solid Films, 2001, 397, 266–275.
- [41] M. Kumar Jain, B-Z. Yu, M. H. Gelb, O. G. Berg;
“Assay of phospholipases A2 and their inhibitors by kinetic analysis in the scooting mode”
Mediators Inflamm. 1992, 1, 85–100.
- [42] V.M. Mirsky, M. Mass, Ch. Krause, O.S. Wolfbeis;
“Capacitive approach to determine phospholipase A(2) activity toward artificial and natural substrates”
Anal. Chem., 1998, 70, 3674–3678.
- [43] M. L. Mena, P. Yanez-Sedeno, J. M. Pingarron;
“A comparison of different strategies for the construction of amperometric enzyme biosensors using gold nanoparticle-modified electrodes”
Anal. Biochem., 2005, 336 (1), 20-27.
- [44] S.K. Lee, S.D. George, W.E. Antholine, B. Hedman, K.O. Hodgson, E.I. Solomon;

- “Nature of the intermediate formed in the reduction of O₂ to H₂O at the tri-nuclear copper cluster active site in native laccase”
J. Am. Chem. Soc., 2002, 124, 6180-6193.
- [45] M. Sosna, J.-M. Chrétien, J. D. Kilburn, P. N. Bartlett;
“Monolayer anthracene and anthraquinone modified electrodes as platforms for *Trametes hirsuta* laccase immobilization”
Phys. Chem. Chem. Phys., 2010, 12, 10018–10026.
- [46] K. Karnicka, K. Miecznikowski, B. Kowalewska, M. Skunik, M. Opallo, J. Rogalski, W. Schuhmann, P.J. Kulesza;
“ABTS modified multiwalled carbon nanotubes as an effective mediating system for bioelectrocatalytic reduction of oxygen”
Anal. Chem., 2008, 80, 7643–7648.
- [47] K. Stolarczyk, D. Lyp, K. Zelechowska, J.F. Biernat, J. Rogalski, R. Bilewicz;
“Arylated carbon nanotubes for biobatteries and biofuel cells”
Electrochim. Acta, 2012, 79, 74-81.
- [48] C. Liu, S. Alwarappan, Z. Chen, X. Kong, C. Z. Li;
“Membraneless enzymatic biofuel cells based on graphene nanosheets,”
Biosensors and bioelectronics, 2010, 25, 1829–1833.
- [49] M. Dagys, K. Haberska, S. Shleev, T. Arnebrant, J. Kulys, T. Ruzgas;
“Laccase–gold nanoparticle assisted bioelectrocatalytic reduction of oxygen”
Electrochem. Commun., 2010, 12, 933–935.
- [50] S. Shleev, J. Tkac, A. Christenson, T. Ruzgas, A. I. Yaropolov, J. W. Whittaker, L. Gorton;
“Direct electron transfer between copper-containing proteins and electrodes”
Biosensors and Bioelectronics 2005, 20, 2517–2554.
- [51] R.W. Murray;
“Nanoelectrochemistry: metal nanoparticles, nanoelectrodes, and nanopores”
Chem. Rev., 2008, 108, 2688–2720.
- [52] R. Jin, H. Qian, Z. Wu, Y. Zhu, M. Zhu, A. Mohanty, N. Garg;
“Size focusing: a methodology for synthesizing atomically precise gold nanoclusters”
J. Phys. Chem. Lett. 2010, 1, 2903–2910.
- [53] B.M. Quinn, P. Liljeroth, V. Ruiz, T. Laaksonen, K. Kontturi;
“Electrochemical resolution of 15 oxidation states for monolayer protected gold nanoparticles”
J. Am. Chem. Soc. 2003, 125, 6644–6645.
- [54] T. Dainese, S. Antonello, J.A. Gascón, F. Pan, N.V. Perera, M. Ruzzi, A. Venzo, A. Zoleo, K. Rissanen, F. Maran;
“Au₂₅(SET)₁₈, a nearly naked thiolate-protected Au₂₅ cluster: structural analysis by single crystal X-ray crystallography and electron nuclear double resonance”
ACS Nano 2014, 8, 3904–3912.
- [55] K. C. Grabar, K. J. Allison, B. E. Baker, R. M. Bright, K. R. Brown, R. G. Freeman, A. P. Fox, C. D. Keating, M. D. Musick, M. J. Natan
“Two-dimensional arrays of colloidal gold particles: a flexible approach to macroscopic metal surfaces”
Langmuir 1996, 12, 2353-2361.
- [56] J.-N. Chazalviel, P. Allongue;
“On the origin of the efficient nanoparticle mediated electron transfer across a self-assembled monolayer”
J. Am. Chem. Soc. 2011, 133, 762–764.
- [57] J. B. Shein, L. M. H. Lai, P. K. Eggers, M. N. Paddon-Row, J. J. Gooding;
“Formation of efficient electron transfer pathways by adsorbing gold nanoparticles to self-assembled monolayer modified electrodes”
Langmuir, 2009, 25, 11121–11128.
- [58] J. J. Gooding, M. T. Alam, A. Barfidokht, L. Carter;
“Nanoparticle mediated electron transfer across organic layers: from current understanding to applications”
J. Braz. Chem. Soc., 2014, 25, 418-426.

- [59] P. Zhao, N. Li, D. Astruc;
“State of the art in gold nanoparticle synthesis”
Coord. Chem. Rev., 2013, 257, 638-665.
- [60] B. Shlyahovsky, D. Li, Y. Weizmann, R. Nowarski, M. Kotler, I. Willner;
“Spotlighting of cocaine by an autonomous aptamer-based machine”
J. Am. Chem. Soc. 2007, 129, 3814 – 3815.

