

## **STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**

### **Badanie charakteru oddziaływań kwasy nukleinowe – analit w warstwach receptorowych biosensorów**

Kwasy nukleinowe odgrywają istotną rolę w procesach podziału oraz apoptozy komórkowej, a także w ekspresji białek. Jednak obecnie nie pełnią jedynie funkcji nośnika informacji genetycznej ze względu na wykazywane przez nie właściwości katalityczne i receptorowe. Oddziałują one z innymi cząsteczkami przede wszystkim poprzez hybrydyzację z komplementarnymi sekwencjami nukleotydowymi, ale są także zdolne do wiązania analitów takich jak jony metali, aminokwasy, białka, a nawet komórki bakterii. Co więcej, kwasy nukleinowe stanowią materiał biologiczny ulegający degradacji pod wpływem działania określonych enzymów oraz czynników chemicznych. Z kolei struktura zhybrydowanych cząsteczek DNA umożliwia efektywny transport ładunku wzdłuż podwójnej nici nukleotydowej. Wymienione powyżej właściwości kwasów nukleinowych sprawiają, że obecnie znajdują one szerokie zastosowanie jako elementy receptorowe w biosensorach.

Niniejsza praca doktorska, zaprezentowana jako zbiór tematycznie spójnych publikacji, dotyczy badań nad charakterem oddziaływań pomiędzy analitami a kwasami nukleinowymi stosowanymi jako warstwy receptorowe elektrochemicznych sensorów.

Pierwszy projekt dotyczył opracowania sensora z warstwą receptorową zawierającą oligonukleotydy DNA do oznaczania jonów ołowiu. Badania wskazały, że dzięki zastosowaniu sekwencji aptamerowej jako warstwy receptorowej możliwe jest selektywne oznaczenie jonów  $Pb^{2+}$ . Wysokie powinowactwo kationów ołowiu do warstwy aptamerowej wynika z utworzenia struktury G - kwadupleksu stabilizowanej w obecności jonów  $Pb^{2+}$ , co prowadzi do zmiany ułożenia monowarstwy na powierzchni elektrody. Oddziaływanie warstwy receptorowej z jonami ołowiu było analizowane z użyciem technik voltamperometrycznych i spektroskopii impedancyjnej z wykorzystaniem błękitu metylenowego oraz pary żelazi/żelazocyjanów jako znaczników elektroaktywnych. W ramach prowadzonych badań określono parametry pracy aptasensora oraz sprawdzono jego użyteczność w oznaczeniu jonów ołowiu w próbce rzeczywistej.

Kolejny projekt dotyczył badania degradacji DNA pod wpływem związków chromu(VI) przy wykorzystaniu długoniciowego DNA jako warstwy receptorowej

zaimmobilizowanej na powierzchni złotej elektrody. W ramach badań została dobrana metoda unieruchomienia cząsteczek DNA na powierzchni elektrod, czas inkubacji w roztworze Cr(VI) oraz wartość pH roztworu degradującego. W obecności związków chromu(VI) doszło do znacznego uszkodzenia warstwy dsDNA, co stwierdzono na podstawie pomiarów elektrochemicznych z użyciem błękitu metylenowego jako znacznika redoks. Wykazano również, że stopień uszkodzenia DNA może ulec zmianie poprzez wprowadzenie kwasu askorbinowego oraz nadtlenu wodoru do roztworu degradującego.

Tematem kolejnego projektu było opracowanie aptasensora do oznaczania jonów potasu. Prowadzone badania służyły dobraniu sekwencji aptamerowej stanowiącej warstwę receptorową, która wykazywała największe powinowactwo do jonów potasu. Ze względu na fakt, że kationy  $K^+$  stabilizują strukturę G-kwadrupleksu, wykorzystano cząsteczki aptamerów o dużej zawartości nukleotydów guaninowych. W ramach doświadczeń wyselekcjonowano również znacznik redoks, w obecności którego potwierdzono silne oddziaływanie pomiędzy aptamerami DNA i jonami potasu. Na podstawie wyników pomiarów elektrochemicznych z użyciem błękitu metylenowego jako znacznika elektroaktywanego stwierdzono, że największe powinowactwo do jonów  $K^+$  wykazuje aptamer trombinowy. Dla sensora zawierającego wybrany aptamer jako warstwę receptorową określone zostały parametry pracy. Rezultaty badań wskazały, że przy poprawie selektywności opracowany aptasensor mógłby stanowić alternatywne narzędzie dla metod oznaczania jonów  $K^+$  obecnie stosowanych w diagnostyce klinicznej.

Ze względu na fakt, że aptamery wykazują wysokie powinowactwo przede wszystkim do złożonych związków, w kolejnym projekcie podjęto próbę opracowania aptasensora do oznaczania dopaminy. Dzięki oddziaływaniu z aptamerem DNA unieruchomionym na powierzchni złota doszło do nagromadzenia cząsteczek dopaminy przy powierzchni elektrody, co umożliwiło bezpośrednią detekcję prądu utlenienia tej katecholaminy. Dla poprawy parametrów pracy sensora na powierzchni elektrody z węgla szklanego utworzono dodatkową warstwę pośrednią złożoną ze zredukowanego tlenku grafenu i nanocząstek złota, do której dowiązано aptamer. Uzyskany w ten sposób aptasensor pozwolił na selektywne oznaczenie dopaminy na poziomie  $10^{-6}$  M.

Ostatni projekt dotyczył opracowania aptasensora do oznaczania urokinazowego aktywatora plazminogenu (uPA). W tym celu aptamer RNA został unieruchomiony na powierzchni złota przy użyciu łącznika dowiązanego do końca 3' sekwencji, który składał się z tiofosforanowych nukleotydów adeninowych. Badania wskazały na istotny wpływ rodzaju znacznika redoks wymuszającego zastosowanie określonego zakresu potencjałów, którego

efektem mogła być zmiana ułożenia monowarstwy aptamerowej na powierzchni elektrody. Wysokie powinowactwo aptameru do urokinazowego aktywatora plazminogenu potwierdzono przy użyciu błękitu metylenowego jako znacznika elektroaktywnego, zwłaszcza po dodaniu białka - albuminy z surowicy bydlęcej do roztworu uPA.

Przeprowadzone badania wskazują na różnorodne możliwości zastosowania kwasów nukleinowych jako warstw receptorowych. Należy podkreślić, że do najistotniejszych kwestii podczas opracowania biosensorów, niezależnie od ich końcowego przeznaczenia, należy dobór sekwencji kwasu nukleinowego, sposobu jego immobilizacji na powierzchni przetwornika oraz metody generowania sygnału analitycznego.

Podsumowując, ze względu na prostotę przygotowania warstw receptorowych oraz wykonania pomiarów elektrochemicznych, a także wyróżniające się parametry pracy, zaprojektowanie biosensory zawierające kwasy nukleinowe w warstwie receptorowej stanowią alternatywne narzędzia, które mogą w przyszłości zostać użyte m.in. w analizie środowiskowej i diagnostyce klinicznej.