

Warszawa, 19.06.2018

Marcin Drozd

Nowe strategie modyfikacji powierzchni złota do celów katalitycznych i bioanalitycznych

STRESZCZENIE

Rozprawa doktorska pod tytułem: „Nowe strategie modyfikacji powierzchni złota do celów katalitycznych i bioanalitycznych” obejmuje dwa zasadnicze wątki badawcze. Pierwszy z nich dotyczy problematyki aktywności katalitycznej nanocząstek złota stabilizowanych hiperrozgałęzionym poliglicydołem jako mimetyka peroksydazy chrzanowej (HRP). Istotny aspekt badawczy stanowiło w nim wskazanie różnic pomiędzy mechanizmem działania natywnych enzymów i katalitycznych nanomateriałów, tzw. nanozymów. Oceniony został także wpływ tychże różnic na możliwość wykorzystania chromogennych substratów - stosowanych typowo dla peroksydaz - również do oceny aktywności ich mimetyków. W odpowiedzi na liczne ograniczenia ze strony dostępnych narzędzi do detekcji aktywności typu peroksydazy, zaproponowane zostały nowe układy substratów na bazie pochodnych katecholowych. Ich przewagą w stosunku do obecnych rozwiązań jest możliwość spektrofotometrycznej oceny aktywności mimetyków peroksydaz w szerokim zakresie pH.

W drugim zasadniczym wątku badawczym podjęto zagadnienie wykorzystania pochodnych ditiokarbaminianów (DTC) do funkcjonalizacji powierzchni makroskopowych przetworników złotych. Główną wartość tej części pracy stanowiło wskazanie rozwiązań szeregu problemów, wynikających z prowadzenia reakcji syntezy DTC w środowisku wodnym, takich jak niewielka konwersja reakcji w typowych warunkach opisywanych w literaturze, czy znacząca hydroliza CS₂ w alkalicznych roztworach wodnych. Końcowy etap pracy obejmował charakteryzację parametrów analitycznych warstw receptorowych, zbudowanych z jednoniciowych fragmentów oligonukleotydów DNA. Warstwy te stanowią kluczowe elementy biosensorów do wykrywania specyficznej, modelowej sekwencji DNA techniką rezonansu plazmonów powierzchniowych. Właściwości warstwy receptorowej uzyskanej za pomocą chemisorpcji ditiokarbaminianów na powierzchni złota porównano z analogicznej budowy warstwami wykorzystującymi jako strategie unieruchomienia bioreceptorów adsorpcję fizyczną oraz chemisorpcję DNA modyfikowanego grupą tiolową.

W pierwszym rozdziale części badawczej opisana została metoda bezpośredniej syntezy nanocząstek złota stabilizowanych powierzchniowo hiperrozgałęzionym poliglicydolem oraz jego karboksylowaną pochodną. Dzięki małym rozmiarom i niewielkiemu stopniowi zablokowania powierzchni, uzyskane nanocząstki wykazywały wysoką aktywność katalityczną typu HRP, predestynującą je do pełnienia roli znaczników zastępujących enzymy w testach bioanalitycznych. W ramach badań dokonano szczegółowej charakterystyki morfologii i właściwości katalitycznych uzyskanej puli AuNPs. Z uwagi na bardzo dobrą stabilność koloidalną otrzymanych nanocząstek w roztworach wodnych o wysokiej sile jonowej i w szerokim zakresie pH, znalazły one zastosowanie również jako modelowe nanozymy w dalszych badaniach dotyczących układów substratów z detekcją optyczną, przeznaczonych dla mimetyków peroksydaz.

Badania własne, stojące w sprzeczności z szeregiem doniesień wskazujących na aktywność nanocząstek złota jedynie w roztworach o pH poniżej 6,5 stały się przyczynkiem do kolejnego etapu prac. Obejmował on krytyczne spojrzenie na różnice w mechanizmach i sposobach detekcji aktywności katalitycznej nanocząstek złota i natywnej peroksydazy chrzanowej. Zaobserwowane i zestawione w niniejszej rozprawie różnice w podstawowych właściwościach nanozymów i natywnej HRP, takie jak relatywnie niskie powinowactwo AuNPs do nadtlenu wodoru, czy też brak inhibicji ze strony wysokich stężeń substratów - prócz nowych możliwości - implikują także szereg ograniczeń względem składu medium katalizy. Wykazano, że stosowanie najpopularniejszych chromogennych substratów peroksydaz, takich jak 3,3',5,5'-tetrametylobenzydyna (TMB), *o*-fenylenodiamina (OPD) czy kwas 2,2'-azyno-bis(3-etylobenzotiazolino-6-sufonowy) (ABTS) do charakteryzacji właściwości katalitycznych nanocząstek wymaga uwzględnienia szeregu nieznanych wcześniej aspektów. W przypadku ABTS dowiedziono niekorzystnego wpływu anionów Cl⁻ (powszechnego składnika roztworów buforowych) na stabilność tego substratu w mediach o pH poniżej 3,5. Udokumentowano również istotny wpływ anionów fosforanowych(V) na tłumienie niekorzystnego, spontanicznego utleniania ABTS. Z kolei w przypadku TMB i OPD zarekomendowano zastosowanie wysokiego stężenia chromogenów względem katalizatora, celem uniknięcia degradacji barwnych produktów katalitycznego utleniania. Brak uwzględnienia negatywnego wpływu opisanych zjawisk - stosunkowo częsty w bieżących doniesieniach literaturowych - stanowić może źródło błędów w trakcie spektrofotometrycznych badań aktywności nanomateriałów.

Niedostatek narzędzi analitycznych do charakteryzacji aktywności mimetyków peroksydaz w całym zakresie ich stabilności (szczególnie w roztworach obojętnych

i zasadowych) stał się bodźcem do dalszych badań nad opracowaniem uniwersalnego układu substratów przeznaczonego wyłącznie do charakteryzacji aktywności katalitycznej nanozymów. Do roli chromogenów wytypowane zostały dwie pochodne katecholu: czerwień bromopirogallolowa (BPR) oraz pirogalol (PG). Co warte uwagi, zaproponowane na ich bazie układy substratów wykazywały szereg nowych, korzystnych właściwości, których zaobserwowanie nie było możliwe w przypadku stosowania natywnej HRP w roli katalizatora. Dowiedziono, iż pochodne katecholowe, w przeciwieństwie do znanych substratów HRP, cechuje znaczna podatność na katalityczne utlenianie pod wpływem nadtlenu wodoru w środowisku zasadowym. Jednocześnie, w pracy przedstawione zostały skuteczne sposoby supresji spontanicznego utleniania ugrupowania *o*-dihydroksyfenylowego przez cząsteczkowy tlen, które to zjawisko stanowiło do tej pory główny powód ograniczonego zastosowania tej grupy związków jako substratów peroksydaz. Zaobserwowana, wysoka stabilność układów substratów na bazie BPR i PG w mediach o pH w zakresie 7-10 przypisana została synergistycznemu efektowi estryfikacji ugrupowań katecholowych przez aniony boranowe, jak również wysokiemu stężeniu H₂O₂, przeciwdziałającemu równowagowej reakcji utleniania pochodnych katecholi przez tlen obecny w próbce. Co istotne, opisana strategia w sposób selektywny tłumi niekorzystną reakcję uboczną, jedynie w minimalny sposób zmniejszając wydajność generowania barwnego produktu reakcji katalitycznej.

Zaproponowane układy substratów na bazie PG i BPR pozwoliły na zaobserwowanie wysokiej aktywności typu peroksydazy nanocząstek złota również w roztworach obojętnych i zasadowych. Proponowane w tej pracy rozwiązanie umożliwia pełniejszą charakteryzację właściwości katalitycznych nowego typu mimetyków peroksydaz na bazie różnego typu nanomateriałów.

Druga, zasadnicza część badań była ukierunkowana na opracowanie wydajnej metody syntezy pochodnych ditiokarbaminianowych (DTC) w reakcji modelowych amin pierwszo- i drugorzędowych z CS₂ w roztworach wodnych. Celem badań był dobór warunków reakcji w taki sposób, aby możliwe było zastosowanie opracowanych metod do modyfikacji receptorów pochodzenia biologicznego, takich jak sekwencje oligopeptydowe czy jednoniciowe sekwencje oligonukleotydów DNA modyfikowanych grupami aminowymi. W obliczu niewielkiej wydajności najbardziej powszechnej metody syntezy DTC w środowisku wodnym, zaproponowane zostało jej usprawnienie poprzez optymalizację pH medium reakcyjnego i dodanie etapu inkubacji ultradźwiękowej. Pozwoliło to uzyskać satysfakcjonujące wydajności reakcji syntezy DTC, rzędu 70-90 % (w zależności od rzędowości aminy jako substratu). W dalszych etapach dokonano oceny istotności wpływu

wybranych parametrów, takich jak odczyn roztworu i dostępność tlenu, na stabilność pochodnych DTC. Wyczerpujące badania dotyczące wpływu rzędowości aminy na kinetykę syntezy i stabilność uzyskanych ditiokarbaminianów niezbicie wykazały wyższość amin drugorzędowych. Całość rezultatów przyczyniła się do opracowania optymalnej, jednoetapowej metodyki syntezy DTC. Uzyskane proponowaną metodą związki zostały wykorzystane w dalszej części badań do tworzenia monowarstw na powierzchni złota.

Badania dotyczące warstw receptorowych sensorów DNA otrzymanych poprzez chemisorpcję DTC miały na celu krytyczną weryfikację konkurencyjności ich parametrów analitycznych i użytkowych w porównaniu do warstw otrzymanych poprzez zastosowanie innych strategii unieruchamiania bioreceptorów: chemisorpcji tioli i adsorpcji fizycznej. Niestety, sensory otrzymywane w wyniku wytworzenia warstw ditiokarbaminianowych pochodnych DNA cechowała mniejsza czułość bezpośredniej detekcji modelowej sekwencji komplementarnej niż w przypadku analogicznych sensorów wykorzystujących monowarstwy otrzymane z tiolowanych oligonukleotydów. W ramach badań wykazano, iż wadą warstw DTC-DNA jest również podatność na desorpcję pod wpływem wypełniacza powierzchni – 6-merkaptoheksanolu. Dowiedziono ponadto, iż na proces tworzenia warstw receptorowych DNA na powierzchni złota w istotnym stopniu wpływa fizyczna adsorpcja oligonukleotydów.

W toku doświadczeń potwierdzono, iż w przypadku bezznacznikowej detekcji hybrydyzacji DNA-DNA czynnikiem determinującym czułość biosensora jest gęstość powierzchniowa sond DNA. Dalsze badania oddziaływań warstw receptorowych DNA z nanocząstkami złota modyfikowanymi sekwencją komplementarną przyczyniły się do wyjaśnienia zależności pomiędzy gęstością powierzchniową receptorów a wydajnością ich hybrydyzacji z AuNPs. Wykazano, iż obserwowane różnice w wydajności wiązania z powierzchnią pomiędzy układem wykorzystującym nanocząstki a układem bezznacznikowym są wynikiem znacznie wolniejszej kinetyki oddziaływania oraz dużych wymiarów geometrycznych nanocząstek złota, w stosunku do wzajemnej odległości receptorów oligonukleotydowych na powierzchni przetwornika.

Słowa kluczowe: nanocząstki złota, kataliza, peroksydaza chrzanowa, mimetyki enzymów, ditiokarbaminiany, biosensory DNA, rezonans plazmonów powierzchniowych

Warsaw, 19.06.2018

New strategies of gold surface modification for catalytic and bioanalytical applications

ABSTRACT

The dissertation entitled: „New strategies of gold surface modification for catalytic and bioanalytical applications” covers two general research fields. The first topic concerns the investigation of catalytic activity of gold nanoparticles stabilized with hyperbranched polyglycidol as horseradish peroxidase (HRP) mimic. The important aspect of conducted research was the indication of differences between catalytic mechanism of native and artificial enzymes (so called *nanozymes*). In the framework of the study, the impact of mentioned differences on the applicability of chromogenic substrates, typically used for peroxidases, was assessed. In response to numerous limitations arising from currently available tools used for spectrophotometric detection of peroxidase-like activity, new substrate systems based on catechol derivatives were proposed. Their main advantage over remaining chromogenic substrates is the possibility of application for studies on HRP-like catalytic activity over a wide pH range.

The second research topic covers the issue of applicability of dithiocarbamate derivatives (DTCs) for surface functionalization of macroscopic gold transducers. The main goal of this part was to provide solutions to several problems (such as low efficiency of reaction under typical conditions described in the literature, as well as occurrence of CS₂ hydrolysis in alkaline solutions), which arise from the necessity to conduct the synthesis of DTCs in aqueous medium. The final step of the work included analytical characterization of receptor layers composed of single-stranded DNA oligonucleotides. The prepared receptor layers were intended to act as the key elements of biosensors for detection of model DNA sequence by means of surface plasmon resonance. Properties of immobilized receptor layers obtained by chemisorption of dithiocarbamates on gold surface were compared with bioreceptor layers of similar composition, obtained by physical adsorption and chemisorption of thiolated DNA oligonucleotides.

The first chapter of experimental section describes the development of method of direct synthesis of gold nanoparticles stabilized with hyperbranched polyglycidol and its carboxylated

derivative. Due to the small size and only slight contribution of surface blocking, obtained nanoparticles exhibit high HRP-like catalytic activity, which predestines them for applications as labels in bioanalytical assays. In the framework of presented research, detailed characteristics of morphology and catalytic properties of the obtained family of AuNPs were made. Due to good colloidal stability in aqueous solutions of high ionic strength and over a wide pH range, nanoparticles were also used as model nanozymes in the research on substrate systems for optical detection of HRP-like catalytic activity.

Own results, which remain in contradiction with some reports indicating the activity of gold nanoparticles only in media of acidic pH, became the main contribution to the next section of studies. The second experimental issue concerns a detailed discussion about differences in mechanisms and methods of detecting the catalytic activity of gold nanoparticles and native horseradish peroxidase. Observed differences in essential properties of nanozymes and native HRP, such as low thermodynamic affinity of AuNPs to hydrogen peroxide and the absence of substrate-induced inhibition - apart from new possibilities - also imply several restrictions on the composition of catalysis medium. It was proven, that in case of utilization of popular chromogenic peroxidase substrates for characterization of catalytic properties of nanoparticles (e.g. 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB), *o*-phenylenediamine (OPD) and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS)), a number of previously unknown aspects has to be considered. In the case of ABTS, the adverse effect of Cl⁻ anion (common component of buffers) on substrate stability in media of pH below 3.5 was described. The efficiency of phosphate anion in suppression of unfavorable, spontaneous oxidation of ABTS was also documented. In turn, in the case of TMB and OPD, my studies lead to the conclusion, that high ratio of the substrate to catalyst should be applied, in order to avoid degradation of colored product of catalytic oxidation. Omission of the negative impact of such phenomena, which is quite common in current literature reports, may be a source of substantial errors during spectrophotometric detection of peroxidase-like activity of nanomaterials.

The lack of substrate systems for characterization of peroxidase mimetics in a wide pH range (especially in media of neutral and basic pH values) became a driving force for further research. The third section aimed at the development of universal substrate system for characterization of catalytic activity of nanozymes. Two catechol derivatives: bromopyrogallol red (BPR) and pyrogallol (PG) were chosen as promising chromogens. It is worth noting, that proposed substrates exhibit new, advantageous properties in terms of capability to oxidation, whose observation was not possible when using native HRP as catalyst. It was proved, that

catechol derivatives - in contrast to known HRP substrates - are characterized by considerable susceptibility to catalytic oxidation by hydrogen peroxide in the basic environment.

The autoxidation of catechol derivatives was probably the main reason for their limited use as peroxidase substrates. In this section, an effective method of spontaneous oxidation suppression of *o*-dihydroxyphenyl moiety by molecular oxygen was described. The observed, high stability of BPR and PG-based substrate systems in aqueous media over pH range from 7 to 10 was assigned to synergistic effect of catechol group esterification by borate anion, as well as presence of H₂O₂ in a high concentration. Importantly, described approach leads to selective suppression of side reaction, while only slightly deteriorates the efficiency of catalytic reaction.

The proposed, PG and BPR-based substrate systems made possible to observe HRP-like activity of gold nanoparticles also in neutral and alkaline environment. Proposed substrate systems should enable a more complex characterization of catalytic properties of a new generation of peroxidase mimetics based on various nanomaterials.

The second, major research field of this work focuses on the development of efficient method for synthesis of dithiocarbamate derivatives (DTCs) based on condensation of primary and secondary amines with CS₂ in aqueous solutions. The aim of the research was to optimize reaction conditions in the way, which allows for further implementation of the developed method for modification of receptors of biological origin, such as oligopeptides and single-stranded DNA oligonucleotides terminated with amino- moieties. In view of low efficiency of the most common method of DTC synthesis in aqueous solution, several improvements involving optimization of reaction pH and application of ultrasonic treatment were proposed. Developed methodology allowed to obtain satisfactory efficiency of the studied reaction, in the range of 70-90 % (dependent on the type of parent amine). In the next step, the significance of selected factors, such as pH and availability of molecular oxygen, on the long-term stability of DTC derivatives was evaluated. Investigations of the effect of the order of applied amine on kinetics of synthesis and stability of synthesized dithiocarbamates clearly demonstrated the superiority of secondary amines as substrates. The obtained results contribute to the development of the seamless, one-step method of DTC synthesis. It should be pointed out, that synthesized DTCs were used for further research and preparation of monolayers on the gold surfaces.

Studies on receptor layers of DNA biosensors obtained by DTC chemisorption (DTC-DNA) aimed at critical verification of their performance in comparison to the layers obtained by other strategies namely: chemisorption of thiolated oligonucleotides and physisorption of unmodified oligonucleotides. Unfortunately, biosensors obtained *via* formation of monolayers

composed of dithiocarbamate derivatives were characterized with lower sensitivity in the direct detection of the model complementary sequence in comparison to those modified with thiolated ones. In the framework of further studies, susceptibility of DTCs to competitive desorption under the influence of surface active thiol - 6-mercaptohexanol was also indicated as a substantial disadvantage of DTC-DNA monolayers. It was also proved that the process of DTC-DNA layer formation on gold is significantly affected by physical adsorption of oligonucleotide backbones. The results point to the conclusion, that in the case of label-free detection of DNA-DNA hybridization, the sensitivity of the obtained biosensor is mainly determined by the density of DNA probes. Investigation of interactions of DNA receptor layers with gold nanoparticles (AuNPs) functionalized with complementary DNA sequence contributed to the explanation of the relationship between surface density of immobilized DNA and efficiency of hybridization with modified AuNPs. Observed differences in binding efficiency between labeled and label-free systems were explained by much slower kinetics of interaction and large geometric dimensions of gold nanoparticles in relation to the density of oligonucleotide receptors on the surface of gold transducer.

Keywords: gold nanoparticles, catalysis, horseradish peroxidase, enzyme mimics, dithiocarbamates, DNA biosensors, surface plasmon resonance