



Recenzja pracy doktorskiej zatytułowanej
„Jedno- i wieloskładnikowe matryce do kontrolowanego unieruchamiania
enzymów i nici DNA na różnych podłożach”
autorstwa mgr Michała Fau.

Praca została wykonana w Pracowni Teorii i Zastosowań Elektrood kierowanej przez profesora Zbigniewa Stojka, który jest jednocześnie promotorem. Pracownia ta ma długą tradycję w dziedzinie elektrochemii, co wyraźnie przekłada się na wysoką jakość prezentowanych badań elektrochemicznych w przedstawionej do recenzji pracy.

W ostatnich latach daje się zauważyć intensywny rozwój badań nad konstrukcją bioczuźników chemicznych, czyli czuźników wykorzystujących związki biologicznie aktywne w warstwie receptorowej. Dzięki specyficzności reakcji biochemicznych, czuźniki oparte na ich wykorzystaniu mają szansę stać się wysmienitym narzędziem zarówno do badań samych reakcji, ich kinetyki, jak i do analizy chemicznej, przede wszystkim biomedycznej, środowiskowej oraz kontroli jakości żywności. Wśród tych czuźników ważne miejsce zajmują sensory z detekcją elektrochemiczną, które są przedmiotem badań w recenzowanej pracy. Bardzo ważnym i aktualnym zagadnieniem jest sposób unieruchamiania związków biologicznie aktywnych na powierzchni czuźnika. Powinny one zachować swoje właściwości i reaktywność oraz zapewnić stabilny sygnał analityczny. Stało się to celem badań Pana mgr Michała Fau.

Ocena strony technicznej i edytorskiej pracy.

Praca została przedstawiona na 186 stronach. Podzielona jest część wprowadzającą czytelnika w badane zagadnienia - wstęp oraz określenie założonych celów pracy, następnie część literaturową (rozdziały 1 – 10) - omawiającą aktualny stan wiedzy ściśle związanej z założonymi celami oraz zwięzłe przedstawienie podstaw stosowanych technik badawczych, część eksperymentalną - omawiającą w kolejnych rozdziałach: stosowane odczynniki i

aparaturę (rozdział 11), tworzone warstwy receptorowe i ich charakterystykę (rozdziały 12 - 14). Każdy z ostatnich trzech rozdziałów jest zakończony zwięzłym podsumowaniem uzyskanych wyników. Mimo różnicy w liczbie rozdziałów w części literaturowej i eksperymentalnej na korzyść tej pierwszej, zawartość obu części jest dobrze wyważona. Długie rozdziały w części eksperymentalnej są podzielone na kilka podrozdziałów porządkujących ich zawartość. Na końcu pracy zamieszczone jest streszczenie w języku polskim i angielskim, spis publikacji naukowych ze współautorstwem Pana mgr Michała Fau wykonanych w trakcie jego studiów doktoranckich (6 pozycji), bibliografia wykorzystywana w pracy doktorskiej (245 pozycji). Odnośniki literaturowe są starannie wybrane z bardzo bogatej dostępnej bazy publikacji i ograniczają się do pozycji ściśle związanych z tematyką pracy. Są odpowiednio cytowane i wystarczające.

Na początku pracy znajduje się alfabetyczny spis skrótów i symboli stosowanych w pracy, co znacznie usprawnia jej czytanie. Jakkolwiek nie wszystkie używane skróty się w niej znalazły (np. nie zamieszczono objaśnienia skrótu PM IRRAS, *ang. Polarization Modulation Infrared Reflection Adsorption Spectroscopy*). Praca jest ilustrowana wieloma rysunkami i wykresami (razem 91) oraz tabelami (21). Podsumowując stwierdzam, że praca jest napisana klarownie i ułożona w logiczną całość. Jest bardzo starannie opracowana edytorsko.

Ocena merytoryczna pracy.

Cele pracy zostały jasno określone. Podstawowymi celami było otrzymanie związków chemicznych dobrze wiążących się z powierzchnią elektrody, będących składnikami warstwy receptorowej bioczułnika oraz charakterystyka fizykochemiczna otrzymanych warstw. Związki biologicznie aktywne unieruchomione w warstwie receptorowej na powierzchni elektrody powinny zachować swoje właściwości i reaktywność oraz zapewnić stabilny sygnał analityczny. Część literaturowa pracy dobrze przygotowuje do wyboru sposobów modyfikacji podłoża, spośród wielu możliwych, takich, które rokują powodzenie w realizacji celów.

Jednym z rozwiązań było utworzenie na złotych podłożach przewodzących warstw fenylowych dwoma sposobami: na drodze samoorganizacji tioli oraz elektroredukcji soli diazoniowych. Starannie zbadano i przedyskutowano powstające warstwy pod kątem ich topografii, grubości i rozmieszczenia przestrzennego stosując współczesne techniki fizykochemiczne. Do porównania stabilności warstw zastosowano kilka technik fizykochemicznych: mikrowagę kwarcową, woltamperometrię cykliczną, elektrochemiczną

spektroskopię impedancyjną oraz spektroskopię odbicia w podczerwieni. Wyniki z zastosowaniem wszystkich technik wskazywały na większą stabilność i jednorodność warstwy uzyskanej za pomocą elektroredukcji soli diazoniowych. Jakkolwiek obie metody mają swoje zalety i wady, które zostały starannie przedyskutowane w pracy. W celu potwierdzenia obserwowanych charakterystyk warstw unieruchomiono w obu ich rodzajach związki biologicznie aktywne: aminowaną jednoniciową sondę DNA, badając wydajność procesu hybrydyzacji, oraz enzymy lakazę i oksydazę glukozową, badając aktywność enzymu. W obu przypadkach uzyskano lepsze parametry czujnika z warstwą powstałą w procesie redukcji soli diazoniowej potwierdzając obserwacje dotyczące stabilności warstw.

Następnym rozwiązaniem było zastosowanie kompozytu polipirol – nanocząstki złota osadzonego na powierzchni węgla szklanego w czujniku hybrydyzacji DNA. Polipirol był osadzany elektrochemicznie, a następnie przy zastosowaniu krótkich pulsów potencjałowych o stałej wartości $-1,6\text{ V}$ osadzano w nim nanocząstki złota z roztworu cyjankowego kompleksu złota. Badano wpływ grubości warstwy na jej jakość i topografię. Ponieważ jako sondę DNA stosowano aminowany oligonukleotyd, wprowadzano warstwę pośrednią – kwas 4-merkaptobenzoowy, wiążący się z powierzchnią nanocząstek złota z jednej strony i oligonukleotydem z drugiej strony. Jakość utworzonej warstwy sensorowej przed i po hybrydyzacji charakteryzowano za pomocą elektrochemicznej impedancji faradajowskiej w obecności próbnika redoks $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$. Uzyskane wyniki zostały starannie przedyskutowane. Ilość nici DNA związanych z nanocząstkami złota wzrosła o dwa rzędy wielkości w porównaniu z powierzchnią złotą o takiej samej wielkości geometrycznej, bez modyfikacji nanocząstkami, co świadczy o różnej powierzchni rzeczywistej. Nie wyeliminowano jednak nierównomierności rozmieszczenia nici DNA w warstwie i nie zwiększono wydajności hybrydyzacji.

Ostatnim rozwiązaniem było zastosowanie hydrożelu poli(N-izopropylakryloamidu)-pNIPA jako trójwymiarowej matrycy do unieruchamiania sondy DNA w czujniku hybrydyzacji. Zbadano wpływ zawartości procentowej grup karboksylowych na właściwości elektrochemiczne matrycy hydrożelowej stosując elektrochemiczną spektroskopię impedancyjną. Efektywność unieruchamiania sondy DNA i wydajność procesu hybrydyzacji badano stosując elektrochemiczną wagę kwarcową, spektroskopię impedancyjną oraz pomiary zawartości ^{31}P za pomocą spektrometrii mas z plazmą indukcyjnie sprzężoną z ablacją laserową (odparowaniem laserowym). Wyniki zostały starannie przedyskutowane. Optymalizacja zawartości grup karboksylowych pozwoliła na najbardziej efektywne ich

wykorzystanie do wiązania sond. Uzyskano większą liczbę związanych sond DNA o jeden rząd wielkości w porównaniu z monowarstwami tiolowymi czy warstwami fenyłowymi. Sprawdzono również, że komplementarna nić po hybrydyzacji może zostać usunięta z warstwy w procesie hydrolizy w słabo kwaśnym środowisku. Pozwala to na wielokrotne użycie czujnika. Jest to bardzo pożądaną cechą.

Podsumowując stwierdzam, że cel pracy został osiągnięty. W badaniach wykorzystano wiele współczesnych, zaawansowanych technik fizykochemicznych. W publikacjach ze współautorstwem Doktoranta, Jego nazwisko występuje na pierwszym miejscu (1 pozycja) oraz na drugim (4 pozycje), co świadczy o jego istotnym udziale w przedstawionych badaniach. Każdy rozdział dotyczący badań eksperymentalnych oraz dyskusji wyników jest zakończony podsumowaniem, co dobrze świadczy o umiejętności organizacji pracy i systematyczności Autora. Wyniki pracy istotnie wzbogaciły wiedzę w dziedzinie konstrukcji czujników z modyfikowaną warstwą receptorową z zastosowaniem związków biologicznie aktywnych.

Podczas czytania pracy nasunęło mi się kilka pytań i uwag:

Str. 10, linia 10: $K_d=10^{-15}$ l/mol to stała dysocjacji kompleksu awidyny z biotyną a nie stała trwałości.

Str. 11: używane są obok siebie jednostki SI – nm oraz Å, nigdzie nie podano ich wzajemnej zależności.

Str. 50, linia 5: Autor stwierdza, że hybrydyzacja zachodzi tylko z nicią całkowicie komplementarną. Może zachodzić z fragmentami komplementarnymi.

Str. 69, tabela 3: z jakiego źródła pochodziły stosowane oligonukleotydy?

Str. 71, linia 5: Autor stwierdza, że bezpośredni kontakt DNA lub enzymów ze złotem prowadzi do deaktywacji biomolekuł, zablokowania hybrydyzacji DNA i zablokowania katalitycznych właściwości enzymów. Czy mógłby wyjaśnić co jest przyczyną?

Str. 78, tabela 5: jak była wyznaczona szybkość przeniesienia elektronu pomiędzy kompleksem $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ a elektrodą?

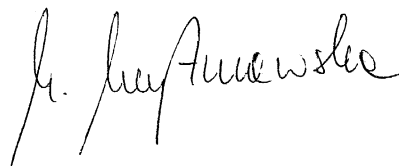
W wielu tabelach podano wartość średnią wyników i odchylenie standardowe. Z ilu wyników wykonano te obliczenia?

Niezupełnie zgadzam się z definicją temperatury topnienia DNA podaną przez Autora, proszę o wyjaśnienie.

Autor nie uniknął pewnych błędów nomenklaturowych czy językowych, np. mówimy spektrometria mas a nie spektrometria masowa, szybkość przemiatania potencjału a nie potencjałem. Jest ich jednak niewiele.

Moje uwagi mają charakter dyskusyjny i w żadnym stopniu nie umniejszają oceny pracy. Wyniki badań Doktoranta mają duże znaczenie poznawcze.

Reasumując stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Michała Fau spełnia wymagania formalne stawiane pracom doktorskim, określone ustawą o tytule i stopniach naukowych i wnoszę do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego o dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Warszawa, 26.09.2014r.

Magdalena Maj-Żurawska

Prof. Dr hab. Hanna Radecka

Pracownia Bioelektroanalizy

Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności

Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie

Recenzja rozprawy doktorskiej Mgr Michała Fau

pt:

„Jedno- i wieloskładnikowe matryce do kontrolowanego unieruchomienia enzymów i nici DNA na różnych podłożach”

wykonanej w Pracowni Teorii i Zastosowań Elektrood Zakładu Chemii Nieorganicznej
i Analitycznej Uniwersytetu Warszawskiego
pod kierunkiem Prof. Dr hab. Zbigniewa Stojka

Rozprawa doktorska Pana Mgr Michała Fau pt: „**Jedno- i wieloskładnikowe matryce do kontrolowanego unieruchomienia enzymów i nici DNA na różnych podłożach**” ma charakter badań podstawowych z jednoczesnym silnym podkreśleniem aspektów aplikacyjnych obejmujących rozwój nowoczesnych bioczuJNIKÓW, które mogą znaleźć szerokie zastosowanie w diagnostyce medycznej, kontroli jakości żywności, czy monitoringu środowiska. Jednym z kluczowych elementów bioczuJNIKÓW jest właściwe unieruchomienie na ich powierzchni elementu biologicznego odpowiedzialnego za selektywne rozpoznanie oznaczanego analitu. Poszukiwanie rozwiązania tego problemu stanowi główny cel rozprawy doktorskiej Pana Mgr Michała Fau.

Realizując go, Autor rozprawy przeprowadził badania mające na celu wykreowanie cienkich, jednorodnych i dobrze przewodzących warstw na powierzchni wybranego podłoża stałego, odpowiednich do zapewnienia prawidłowego unieruchomienia enzymów (z zachowaniem ich zdolności katalizowania procesów biochemicznych), oraz nici DNA (z zachowaniem możliwości przeprowadzania procesów hybrydyzacji).

Do realizacji powyższych zadań, Autor zastosował dwie techniki wytwarzania warstw (1) na drodze elektroredukcji odpowiednich soli diazoniowych oraz (2) chemisorpcji pochodnych tiolowych.

Bardzo istotnym etapem modyfikacji wybranego podłoża stałą warstwą zredukowanej soli diazoniowej jest wytworzenie rodnika arylowego. Może on wywołać niepożądany proces oligomeryzacji prowadzący do wytworzenia poliwarstwy.

Autor podjął się rozwiązania tego problemu i udowodnił, przeprowadzając systematyczne pomiary przy pomocy elektrochemicznej mikrowagi kwarcowej oraz elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej, że o tworzeniu się pożądanej monowarstwy soli diazoniowych decyduje potencjał elektroredukcji, a nie jak się powszechnie uważa, czas elektroosadzania (Analytical Chemistry 83, 20111, 9281). Orientacja grup aminoetylofenylowych względem podłoża została określona przy pomocy spektroskopii odbiciowej w podczerwieni z modulacją polaryzacji światła (PM IRRAS).

Do unieruchamiania nici DNA zmodyfikowanych grupami NH_2 na powierzchni filmu – $\text{CH}_6\text{H}_4(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$ Autor zastosował łącznik w postaci glikolu polietylenowego, który szybko reaguje z grupami aminowymi w temperaturze pokojowej. W celu wyznaczenia ilości pojedynczych i podwójnych nici DNA związanych z warstwą pośredniczącą, Autor zastosował pomiary chronokulometryczne w obecności heksaamonorutenu(III). Dwukrotny wzrost stężenia powierzchniowego DNA po procesie hybrydyzacji, świadczący o 100 % efektywności procesu hybrydyzacji, Autor zaobserwował jedynie w przypadku warstwy aminoetylofenylowej uzyskanej przy potencjale elektroredukcji -0.85 V. Wniosek ten został również potwierdzony przy pomocy pomiarów kąta zwilżania. Warstwa aminoetylofenylowa uzyskana przy potencjale elektroredukcji -0.85 V charakteryzowała się najwyższymi właściwościami hydrofilowymi, to znaczy największą liczbą grup aminowych unieruchomionych na powierzchni. Wartości parametrów uzyskanych dla tej warstwy metodą elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej były zdecydowanie bardziej korzystne w porównaniu z warstwami wytworzonymi przy innych potencjałach. Uzyskane wyniki pozwoliły na jednoznaczny wybór potencjału **-0.85 V** do elektroredukcji tetrafluoroboranu 4-aminoetylobenzenodiazoniowego w celu uzyskania warstwy optymalnej do unieruchomienia nici DNA oraz zapewnienia 100 % efektywności procesu hybrydyzacji.

Autor rozprawy przeprowadził badania dotyczące szeregu parametrów wpływających, na jakość warstwy fenylowej wytworzonej z mieszaniny reakcyjnej aminy aromatycznej oraz azotanu (III) sodu w środowisku wodnym. W tym przypadku elektroredukcja soli diazoniowej zachodzi z tego samego roztworu, co jej synteza. Złożoność tego procesu może

mieć wpływ, na jakość wytwarzanej warstwy. Zatem, Autor zbadał wpływ takich parametrów jak: długość łańcucha alifatycznego pomiędzy grupą funkcyjną a pierścieniem aromatycznym, stosunek molowy substratów oraz reakcje uboczne karboksylowych soli diazoniowych. Wartości potencjału do chronoamperometrycznego procesu elektroredukcji soli diazoniowej z grupami karboksylowymi zostały wybrane na podstawie pierwszego voltamperogramu cyklicznego. Najbardziej równomierną oraz jednorodną warstwę uzyskano dla potencjału równego potencjałowi voltamperometrycznego pików redukcji soli.

Wartości potencjału znacznie się różnią pomimo bardzo niewielkiej różnicy w strukturze stosowanych soli (brak grupy CH_2 , jedna grupa CH_2 oraz dwie grupy CH_2). Również wartości potencjałów stosowanych do elektroredukcji tetrafluoroboranu

4-amnioetylobenzenodiazoniowego znacznie się różnią się od wartości stosowanych dla soli z grupą COOH . Dlaczego? Chciałabym zaprosić Autora do przedyskutowania tego zjawiska.

Badając wpływ stosunku molowego substratów, na jakość wytworzonych warstw, przy pomocy wagi mikrokwarcowej oraz elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej Autor jednoznacznie stwierdził, że stosunek równomolowy jest najbardziej odpowiedni do wytworzenia jednorodnej warstwy karboksyfenylowej. Zastosował ją do unieruchomienia nici DNA zmodyfikowanych grupami aminowymi wykorzystując wytworzenie wiązań amidowych w obecności EDC/NHS.

Odczuwa się brak porównania warstwy karboksyfenylowej oraz warstwy aminoetylofenylowej w połączeniu z łącznikiem glikolowym stosowanych do unieruchamiania nici DNA zmodyfikowanych grupami aminowymi.

Warstwę karboksyfenylową Autor wykorzystał również do unieruchamiania lakazy. Jej obecność na powierzchni warstwy udowodnił przy pomocy mikrowagi kwarcowej. Laktaza unieruchomiona na zoptymalizowanej warstwie karboksyfenylowej zachowała właściwości katalityczne. Sygnały elektrokatalitycznej redukcji tlenu zarejestrowane na zmodyfikowanej powierzchni były bardzo dobrze ukształtowane a wartości prądu znacznie wyższe w porównaniu do wartości prądu redukcji tlenu rejestrowane na czystej elektrodzie złotej. Szkoda, że Autor rozprawy nie przedyskutował bardziej szczegółowo sposobu unieruchamiania lakazy. Czy wartość pH roztworu miałaby wpływ na ten proces? Czy nie warto byłoby rozważyć wiązania kowalencyjnego poprzez wytworzenie wiązań amidowych?

Autor rozprawy dokonał porównania stabilności warstw fenylowych tworzonych na drodze samoorganizacji tioli oraz elektroredukcji soli diazoniowych na powierzchni elektrod złotych. Wykazał jednoznacznie, że warstwy wytworzone poprzez elektroredukcję charakteryzowały się lepszą stabilnością oraz lepszą przydatnością do unieruchamiania nici

DNA oraz oksydazy glukonowej. Autor wykazał, że modyfikacja elektrod zarówno złotych jak i węglowych poprzez elektroredukcję soli diazoniowych może stanowić korzystną alternatywę do szeroko stosowanej metody spontanicznej samoorganizacji pochodnych tiolowych na powierzchni złota. Jednocześnie, nie przekreśla tej metody, opracowując polipirołowe kompozyty wzbogacone nano cząsteczkami złota. Autor wykazał, że naniesienie cienkiej jednorodnej warstwy polipirołowego filmu wzbogaconego nano cząsteczkami złota na powierzchnię węgla szklanego gwarantuje bardzo dobre właściwości elektrochemiczne zmodyfikowanej elektrody. Tu nasuwa się pytanie, w jaki sposób można kontrolować grubości i jednorodność warstwy polimeru oraz stopień jego nasycenia nano cząsteczkami złota?

Elektrodę zmodyfikowaną optymalnym składem polipirołowego kompozytu wzbogaconego nano cząsteczkami złota Autor wykorzystał do konstrukcji geno-czujnika. Jego czułość zdecydowanie była lepsza od geno-czujnika, w którym nici DNA były unieruchamiane bezpośrednio na powierzchni czystego złota.

Kolejną metodą zaproponowaną przez Autora do unieruchamiania nici DNA to trójwymiarowe hydrożele N-izopropylakryloamidowe (pNIPA) zawierające grupy karboksylowe. Po zoptymalizowaniu ich zawartości (na poziomie 5%), hydrożel został zastosowany do unieruchamiania nici DNA poprzez wytworzenie wiązań amidowych w obecności EDC/NHS. Trójwymiarowość matrycy pozwoliła na unieruchomienie o jeden rząd większej ilości nici DNA w porównaniu z metodami opartymi o chemisorpcję pochodnych tiolowych czy też elektroredukcję związków diazoniowych. Autor wykazał, że pomimo wysokiej gęstości nici DNA w trójwymiarowej matrycy hydrożelowej, proces hybrydyzacji zachodził ze 100 % wydajnością. Dodatkowym atutem jest zdolność do usuwania nici DNA z hydrożelu, co umożliwia jego wielokrotne zastosowanie.

Podsumowując, chciałabym podkreślić, że osiągnięcia Pan Mgr Michała Fau stanowią istotny wkład przyczyniający się do rozwoju nowoczesnych bioczujników.

Ocena edytorska

Rozprawa jest przygotowana bardzo starannie. Wstęp teoretyczny jest dobrze udokumentowany aktualnymi pracami naukowymi o międzynarodowym zasięgu.

Cel rozprawy został jasno sprecyzowany. Część eksperymentalna, włącznie ze stosowanymi technikami została opisana jasno i syntetycznie. Zabrakło może jedynie wyraźnego oddzielenia części dotyczącej omówienia wyników.

W streszczeniu Autor bardzo dobrze określa swoje osiągnięcia.

Drobne uchybienia edytorskie to: dwie różne wartości potencjału elektroredukcji soli diazoniowej $\text{H}_2\text{N} - \text{C}_6\text{H}_4\text{COOH}$: 0.22 V (Tabela 11) oraz 0.18 V (Tabela 9 i Rys. 57 A). Co jest powodem tej różnicy? W Tabeli 11 i 12 brak zaznaczenia E_p .

Ocena dorobku

Pan Mgr Michał Fau jest współautorem 6 publikacji, które ukazały się w renomowanych czasopismach takich jak Biosensors and Bioelectronics (dwie) (IF 6.51), Analytical Chemistry (IF 5.825), Electroanalysis (2.502) oraz Electrochimica Acta (IF 4.086) (dwie). Są to czasopisma o szerokim zasięgu, o czym świadczą wysokie wartości współczynników oddziaływania.

Podsumowanie

W podsumowaniu, stwierdzam, rozprawa doktorska pt: **Jedno- i wieloskładnikowe matryce do kontrolowanego unieruchomienia enzymów i nici DNA na różnych podłożach** autorstwa Pana Mgr Michała Fau spełnia wszystkie wymagania określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki stawiane rozprawom doktorskim. Zatem, zwracam się do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego z wnioskiem o dopuszczenie Pana Mgr Michała Fau do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z poważaniem,



Prof. Dr hab. Hanna Radecka