ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΓΕΝΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΑΜΕΣΩΝ ΑΜΠΕΡΟΜΕΤΡΙΚΩΝ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΩΝ ΒΑΣΙΣΜΕΝΩΝ ΣΕ ΑΝΑΔΙΠΛΟΥΜΕΝΕΣ ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ

ΤΣΕΜΠΕΡΟΥΛΗ ΜΑΡΙΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Ν. Χανιωτάκης

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2014

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΣΤΡΟΠΗ

Χανιωτάκης Νικόλαος (Επιβλέπων Καθηγητής)

Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

Γανωτάκης Δημήτριος

Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

Σπύρος Απόστολος

Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημεία του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υπεύθυνο καθηγητή μου, κ. Ν. Χανιωτάκη για την πολύτιμη καθοδήγηση του και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αλλά και για την ηθική και οικονομική υποστήριξη του κατά την εκπόνηση του διπλώματος ειδίκευσης.

Παράλληλα θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της Τριμελούς Εξεταστικής μου Επιτροπής, τους καθηγητές Δ. Γανωτάκη και Α. Σπύρο για τα πολύτιμα σχόλια και τις παρατηρήσεις τους.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Μ. Φουσκάκη για την στήριξη της και την πολύτιμη καθοδήγηση της σε όλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας, καθώς και όλα τα υπόλοιπα μέλη του Εργαστηρίου Αναλυτικής Χημείας για την άψογη συνεργασία μας.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου για την αμέριστη συμπαράσταση και τη συνεχή του υποστήριξη όλα αυτά τα χρόνια.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ 1

ABSTRACT 3

ΜΕΡΟΣ Ι

1.1 ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ 5

1.1.1 Ορισμός - Αρχή Λειτουργίας 5

1.1.2 Βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης 6

1.1.3 Μεταλλάκτης Σήματος 7

1.1.4 Αναλυτικά Χαρακτηριστικά Βιοαισθητήρων 9

1. 2 ΑΜΠΕΡΟΜΕΤΡΙΚΟΙ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ 13

1.2.1 Αρχή λειτουργίας 13

1.2.2 Εξέλιξη ενζυμικών αμπερομετρικών βιοαισθητήρων.....15

1.2.3 Προβλήματα ενζυμικών αμπερομετρικών βιοαισθητήρων 17

1.3 ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ ΒΑΣΙΣΜΕΝΟΙ ΣΕ ΑΝΑΔΙΠΛΟΥΜΕΝΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ.....20

1.3.1 Αναδιπλούμενες Πρωτεΐνες Δέσμευσης.....20

1.3.2 Αναδιπλούμενη Πρωτεΐνη Δέσμευσης Ασβεστίου: Ασβεστιοτροποποιητίνη.....23

1.3.3 Ανάπτυξη Βιοαισθητήρων Βασισμένων σε Αναδιπλούμενες Πρωτεΐνες Δέσμευσης.....25

ΜΕΡΟΣ ΙΙ

2. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΑΜΕΣΟΥ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΑ ΒΑΣΙΣΜΕΝΟΥ ΣΕ ΑΝΑΔΙΠΛΟΥΜΕΝΗ ΠΡΩΤΕΙΝΗ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΑΣΒΕΣΤΙΟΥ- ΑΣΒΕΣΤΙΟΤΡΟΠΟΠΟΙΗΤΙΝΗ (CaM)……34

2.1 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ……34

2.2 ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΑΜΕΣΟΥ ΑΜΠΕΡΟΜΕΤΡΙΚΟΥ CaM- ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΑ……..36

2.2.1 Ηλεκτροχημικό Σύστημα……...36

2.2.2 Ακινητοποίηση Ασβεστιοτροποποιητίνης (CaM) σε SPE ηλεκτρόδια……39

2.2.3 Ηλεκτροχημικός Χαρακτηρισμός……40

2.2.4 Έλεγχος Απόκρισης CaM- Βιοαισθητήρα……..48

2.3 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ……52

ΒΙΒΙΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ……55

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ……58

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ……59

CURRICULUM VITAE……62

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες αποτελούν αναλυτικά όργανα που χρησιμοποιούνται για την ποιοτική και ποσοτική ανίχνευση μεγάλης ποικιλίας αναλυτών. Η ραγδαία εξέλιξη των ηλεκτροχημικών βιοαισθητήρων τα τελευταία 50 χρόνια, εντοπίζεται στις προσπάθειες των ερευνητών για τη βελτιστοποίηση της αναλυτικής απόδοσής τους και στην αντιμετώπιση των λειτουργικών προβλημάτων που εμφανίζουν. Σε αυτά συμπεριλαμβάνονται κυρίως η χαμηλή ευαισθησία τους και αναπαραγωγισιμότητα κατασκευής τους. Για το σκοπό αυτό το ερευνητικό ενδιαφέρον έχει πλέον στραφεί στην απλοποίηση των πολύπλοκων διαδικασιών που απαιτούνται για την ανάπτυξη των συστημάτων βιοαισθητήρων, αξιοποιώντας τις εγγενείς φυσικοχημικές αλλά και βιοχημικές ιδιότητες των βιολογικών μακρομορίων και χρησιμοποιώντας μεταλλάκτες σήματος με βελτιστοποιημένα και μοναδικά ηλεκτροχημικά χαρακτηριστικά.

Σε αυτή την εργασία μελετάται η ανάπτυξη άμεσων αμπερομετρικών βιοαισθητήρων για την παρακολούθηση φαινομένων δέσμευσης υποκαταστατών σε αναδιπλούμενες πρωτεΐνες δέσμευσης. Η μέθοδος στηρίζεται στην αξιοποίηση των χαρακτηριστικών στερεοδομικών αλλαγών που παρατηρούνται στην συγκεκριμένη οικογένεια πρωτεϊνών κατόπιν επιλεκτικής δέσμευσης με τον υποκαταστάτη τους και στην μεταγωγή της συγκεκριμένης αλληλεπίδρασης σε αναλυτική πληροφορία μέσω ενός ηλεκτροχημικού μεταλλάκτη σήματος. Για την ανάπτυξη της μεθόδου μελετήθηκε η ασβεστιοτροποποιητίνη (Calmodulin, CaM), μια πρωτεΐνη που λειτουργεί ως ανιχνευτής ασβεστίου σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα και η οποία υφίσταται έντονη αλλαγή στη στερεοδιάταξή της ύστερα από την δέσμευση τεσσάρων ιόντων ασβεστίου.

Οι ηλεκτροχημικές ιδιότητες του CaM-βιοαισθητήρα, που αναπτύσσεται με ακινητοποίηση της πρωτεΐνης μέσω φυσικής προσρόφησης στην επιφάνεια ενός ηλεκτροδίου επίστρωσης, αξιολογείται κυρίως με χρήση ηλεκτροχημικών τεχνικών όπως χρονοαμπερομετρία και την φασματοσκοπία ηλεκτροχημικής εμπέδησης. Με τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τη μελέτη της απόκρισης του CaM-βιοαισθητήρα παρουσία Ca^{2+}, τίθενται οι βάσεις για την ανάπτυξη απλών και

άμεσων βιοαναλυτικών συστημάτων με υποσχόμενες αναλυτικές εφαρμογές σε ένα ευρύ φάσμα επιστημονικών πεδίων.

ABSTRACT

Electrochemical biosensors provide an attractive means for the qualitative characterization and quantification for a diverse set of analytes. The extensive research in this field the last 50 years is focused on the optimization of their analytical performance and overcoming their operational problems. Some of the major obstacles in the biosensor systems include their low sensitivity and the poor sensor to sensor reproducibility. For this reason, the scientific interest in this field has focused on the simplification of the elaborate techniques required for the electrochemical biosensor development. This can be realized by exploiting the intrinsic physicochemical and biochemical properties of biological macromolecules, and by using signal transducers with optimized or unique electrochemical characteristics.

The aim of this work is the development of reagentless amperometric biosensors for transducing ligand binding events of ligand binding proteins. The basic characteristic of this superfamily of proteins is their hinge motion upon ligand binding. The method, is based on exploiting the induced large conformational changes of protein structure upon their ligand binding, and transducing this change into electrochemical response by using an electrochemical signal transducer. For the development of method presented here, Calmodulin was used as ligand binding protein. Calmodulin (CaM), a small calcium modulated protein, is an ubiquitous Ca^{2+}-sensor in all eukaryotic cells and undergoes a large conformational change upon the binding of four calcium ions.

Calomodulin based biosensor was developed by adsorption of protein on a screen printed electrode surface and its electrochemical performance was evaluated by electrochemical methods: chronoamperometry and electrochemical impedance spectroscopy. The results obtained by testing the response of Calmodulin based biosensor in the presence of Ca^{2+}, set the basis for the development of new bioelectronic interfaces for the reagentless and selective detection of analytes for defense applications.

ΜΕΡΟΣ Ι

1.1 ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ

1.1.1 **Ορισμός – Αρχή λειτουργίας**

Στο επίκεντρο του επιστημονικού ενδιαφέροντος, εδώ και 50 χρόνια βρίσκεται η μελέτη και η ανάπτυξη των βιοαισθητήρων, λόγω της πολλά υποσχόμενης χρήσης τους ως αξιόπιστων αναλυτικών οργάνων για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση διαφόρων χημικών ουσιών. Η εξέλιξή τους στο πέρασμα του χρόνου εστιάζεται κυρίως στην βελτίωση των αναλυτικών τους χαρακτηριστικών και στην ανάπτυξη καινοτόμων συστημάτων βιοαισθητήρων με στόχο την εφαρμογή τους σε ένα ευρύ φάσμα επιστημονικών πεδίων. Η ιστορία των βιοαισθητήρων ξεκινά το 1962, όταν ο Leland C. Clark[1,2] αναπτύσσει τον πρώτο αμπερομετρικό βιοαισθητήρα γλυκόζης, θέτοντας ταυτόχρονα τις βάσεις για την περαιτέρω εξέλιξη της τεχνολογίας των αναλυτικών αυτών συστημάτων. Οι βιοαισθητήρες, καθώς συνδυάζουν την ευαισθησία των χημικών αισθητήρων με την επιλεκτικότητα των βιοχημικών διεργασιών, έχουν αποδειχθεί πολύτιμα αναλυτικά όργανα για ένα πλήθος εφαρμογών σε τομείς όπως η ιατρική, η χημεία περιβάλλοντος, η χημεία τροφίμων και η βιομηχανία φαρμάκων.

Ως αισθητήρας ορίζεται ένα σύστημα ικανό να ανιχνεύει μια φυσική ή χημική μεταβολή και να την μετατρέπει σε αναλυτικό σήμα το οποίο μπορεί να μετρηθεί και να καταγραφεί. Οι βιοαισθητήρες ανήκουν στην κατηγορία των χημικών αισθητήρων, που χρησιμοποιούν βιολογικά μόρια για την ανίχνευση χημικών οντοτήτων σε δείγματα, μέσω βιοχημικών μηχανισμών. Πιο συγκεκριμένα, σύμφωνα με τη Διεθνή Ένωση της Θεωρητικής και Εφαρμοσμένης Χημείας (IUPAC), ο βιοαισθητήρας ορίζεται ως « *Μια αυτόνομη και ολοκληρωμένη συσκευή, ικανή να παρέχει ποσοτικές ή ημιποσοτικές αναλυτικές πληροφορίες χρησιμοποιώντας ένα βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης που βρίσκεται σε άμεση επαφή με έναν μεταλλάκτη σήματος*».[3,4]

Πιο συγκεκριμένα, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 1.1 πρόκειται για ένα υβριδικό σύστημα ανάλυσης που προκύπτει από την σύζευξη ενός βιολογικού στοιχείου ανίχνευσης και ενός φυσικοχημικού μεταλλάκτη σήματος. Η αρχή λειτουργίας των βιοαισθητήρων βασίζεται στην επιλεκτική βιοχημική αντίδραση, που συνδέει το

βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης με την προς ανάλυση ουσία, και στην μετατροπή της χημικής μεταβολής σε αναλυτικό σήμα, που προκύπτει από τον μεταλλάκτη σήματος. Για το σκοπό αυτό, βασική προϋπόθεση για ένα βιοαισθητήρα είναι το βιολογικό μόριο ανίχνευσης να βρίσκεται σε στενή επαφή τόσο με τον αναλύτη, όσο και με τον φυσικοχημικό μεταλλάκτη σήματος.

Εικόνα 1.1. Γενικό Διάγραμμα λειτουργίας των βιοαισθητήρων.

1.1.2. Βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης

Το βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης[5] ενός βιοαισθητήρα θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως η 'καρδιά' του αναλυτικού αυτού συστήματος. Πρόκειται για ένα βιολογικό μόριο το οποίο έχει την ιδιότητα να αλληλεπιδρά επιλεκτικά με την προς ανάλυση ουσία ακόμα και σε ιδιαίτερα πολύπλοκα χημικά δείγματα. Κατά τη βιολογική αναγνώριση το βιολογικό μόριο, το οποίο βρίσκεται στην διεπιφάνεια που σχηματίζει με τον μεταλλάκτη σήματος του βιοαισθητήρα, μπορεί να αποικοδομεί την προς ανάλυση ουσία ή να υφίσταται στερεοδομικές και φυσικοχημικές αλλαγές. Ανάλογα με το είδος της αλληλεπίδρασης του βιολογικού μορίου με τον αναλύτη, οι βιοαισθητήρες διακρίνονται σε δύο βασικές κατηγορίες, κατάλυσης και συγγένειας[6].

Βιοαισθητήρες Κατάλυσης

Η αρχή λειτουργίας των βιοαισθητήρων κατάλυσης βασίζεται στην κατάλυση μιας συγκεκριμένης βιοχημικής αντίδρασης από το βιολογικό μόριο αναγνώρισης κατά την οποία ο αναλύτης μπορεί να συμμετέχει ως αντιδρών ή ως προϊόν. Συνήθως τα βιολογικά μόρια που χρησιμοποιούνται σε αυτή την κατηγορία βιοαισθητήρων

είναι κυρίως τα ένζυμα. Τα ένζυμα, οι καταλύτες των βιολογικών συστημάτων, είναι πρωτεϊνικά μόρια που αναγνωρίζουν εξειδικευμένα υποστρώματα και καταλύουν με εξαιρετική ταχύτητα χημικούς μετασχηματισμούς και μεσολαβούν στον μετασχηματισμό διαφόρων μορφών ενέργειας. Η εξειδίκευση των ενζύμων οφείλεται στην ακριβή αλληλεπίδραση του υποστρώματος και του ενζύμου ενώ η κατάλυση λαμβάνει χώρα σε μια ιδιαίτερη περιοχή του ενζύμου , που ονομάζεται *ενεργό κέντρο*. Το ενεργό κέντρο το ενζύμου θα πρέπει να βρίσκεται στην πιο στενή επαφή με τον μεταλλάκτη σήματος για να επιτευχθεί η βέλτιστη ανίχνευση της βιοχημικής απόκρισης. Πιο σπάνιες είναι οι περιπτώσεις χρήσης κυτταρικών οργάνων, ιστών, κυττάρων ή και ολόκληρων μικροοργανισμών ως βιολογικών μορίων αναγνώρισης, λόγω της πολυπλοκότητας της αλληλουχίας των αντιδράσεων που καταλύουν οι δομές αυτές, γεγονός που καθιστά δύσκολη την επιλεκτική βιολογική αναγνώριση ενός συγκεκριμένου αναλύτη.

Βιοαισθητήρες Συγγένειας

Στους βιοαισθητήρες συγγένειας το βιολογικό μόριο αναγνώρισης αλληλεπιδρά με μόρια του αναλύτη συνήθως μέσω ενός μηχανισμού συμπληρωματικής δέσμευσης[7]. Στη κατηγορία αυτή τα βιολογικά μόρια που χρησιμοποιούνται συνήθως είναι τα αντισώματα, τα νουκλεικά οξέα και οι υποδοχείς. Λόγω της συμπληρωματικής δομής που συνδέει τα μόρια του αναλύτη με το βιολογικό υπόστρωμα του βιοαισθητήρα, το αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασής τους είναι ο σχηματισμός ενός συμπλόκου. Στις περισσότερες περιπτώσεις η δέσμευση του αναλύτη είναι μη αντιστρεπτή καθώς η σταθερά δέσμευσης του βιολογικού μορίου με τον αναλύτη είναι μεγάλη, γεγονός που καθιστά δυνατή την ανίχνευση ακόμα και πολύ μικρών συγκεντρώσεων του αναλύτη. Ωστόσο η μη αντιστρεπτότητα αυτής της αλληλεπίδρασης έχει ως συνέπεια συνήθως οι βιοαισθητήρες συγγένειας να είναι μίας και μόνο χρήσης.

1.1.3 Μεταλλάκτης Σήματος

Η διάκριση των βιοαισθητήρων δεν γίνεται μόνο με βάση το είδος του βιολογικού μορίου που χρησιμοποιείται αλλά και με το είδος του μεταλλάκτη σήματος. Ο μεταλλάκτης σήματος, το αβιοτικό και το δεύτερο σημαντικό τμήμα ενός

συστήματος βιοαισθητήρα, μετατρέπει τις μεταβολές που προκύπτουν από την αλληλεπίδραση του βιολογικού μορίου αναγνώρισης με τα μόρια του αναλύτη σε σήμα, από το οποίο με κατάλληλη επεξεργασία εξάγεται η αναλυτική πληροφορία. Η επιλογή του κατάλληλου μεταλλάκτη σήματος εξαρτάται από πολλούς παράγοντες εκ των οποίων ο πιο βασικός είναι το είδος της βιολογικής αναγνώρισης που μελετάται δηλαδή το είδος των χημικών και φυσικοχημικών αλλαγών που προκαλούνται στο σύστημα. Ως εκ τούτου, ανάλογα με το είδος του μεταλλάκτη που χρησιμοποιείται οι βιοαισθητήρες διακρίνονται σε ηλεκτροχημικούς, οπτικούς, θερμικούς και πιεζοηλεκτρονικούς.

Ηλεκτροχημικοί Βιοαισθητήρες

Στην κατηγορία των ηλεκτροχημικών βιοαισθητήρων η χημική πληροφορία, που προκύπτει από την αλληλεπίδραση του βιολογικού μορίου με τον αναλύτη, μετατρέπεται άμεσα σε ηλεκτρικό σήμα, γεγονός που τους καθιστά από τους πιο ευρέως διαδεδομένους στην χημική ανάλυση. Διακρίνονται με τη σειρά τους σε τρεις βασικές κατηγορίες ανάλογα με το είδος του ηλεκτρικού σήματος σε ποτενσιομετρικούς, αγωγιμομετρικούς, αμπερομετρικούς βιοαισθητήρες. Στους ποτενσιομετρικούς βιοαισθητήρες γίνεται μέτρηση της διαφοράς δυναμικού που αναπτύσσεται σε συνθήκες μηδενικού ρεύματος, μετά την αποκατάσταση της ισορροπίας. Η διαφορά δυναμικού είναι ανάλογη με τον λογάριθμο της συγκέντρωσης του αναλύτη, σύμφωνα με την εξίσωση του Nernst. Στους αγωγιμομετρικούς βιοαισθητήρες μετράται η μεταβολή στην αγωγιμότητα τους συστήματος, που προκύπτει από αλλαγή του αριθμού, του φορτίου ή της κινητικότητας των ιόντων ύστερα από τη βιολογική αναγνώριση του αναλύτη. Τέλος, στους αμπερομετρικούς βιοαισθητήρες μετράται το ρεύμα που προκύπτει από την οξείδωση ή την αναγωγή ηλεκτροενεργών ουσιών κατά την βιολογική αναγνώριση υπό την εφαρμογή σταθερής τιμής δυναμικού.

Οπτικοί αισθητήρες

Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται μεγάλη ανάπτυξη της συγκεκριμένης κατηγορίας βιοαισθητήρων, κυρίως λόγω της ανάπτυξης των οπτικών ινών. Η αναλυτική πληροφορία προκύπτει από την ανίχνευση αλλαγών στις οπτικές ιδιότητες τόσο του

βιολογικού μορίου αναγνώρισης παρουσία του αναλύτη, όσο και του ίδιου του αναλύτη.

Θερμικοί Βιοαισθητήρες

Όλες οι χημικές και βιοχημικές αντιδράσεις συνοδεύονται από έκλυση ή απορρόφηση θερμότητας, γεγονός στο οποίο βασίζεται και η αρχή λειτουργίας των θερμικών βιοαισθητήρων. Μεταβολές στην θερμότητα που λαμβάνουν χώρα κατά την βιολογική αναγνώριση μπορούν να ανιχνευθούν και να μετρηθούν από ευαίσθητα θερμόμετρα ηλεκτρικής αντίστασης (thermistor).

Πιεζοηλεκτρικοί Βιοαισθήτηρες

Στους πιεζοηλεκτρονικούς βιοαισθητήρες το βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης βρίσκεται στην επιφάνεια ενός κρυστάλλου και κατά την επιλεκτική βιολογική αναγνώριση ο αναλύτης δεσμεύεται με το βιολογικό μόριο και παρατηρείται αύξηση της μάζας του κρυστάλλου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της συχνότητας συντονισμού του κρυστάλλου.

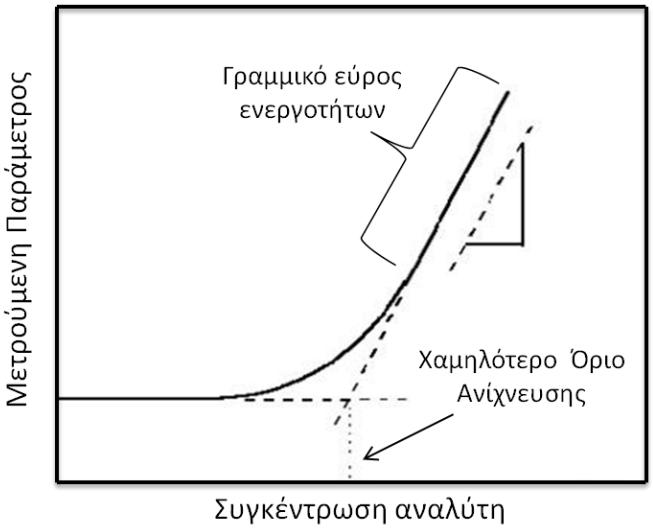
1.1.4 Αναλυτικά Χαρακτηριστικά Βιοαισθητήρων

Τα κύρια αναλυτικά χαρακτηριστικά που καθορίζουν την ποιότητα των βιοαισθητήρων και τα οποία εξετάζονται ενδελεχώς κατά την ανάπτυξή τους, περιγράφονται παρακάτω.

Καμπύλη Βαθμονόμησης

Το πρώτο βήμα μελέτης της αναλυτικής συμπεριφοράς ενός βιοαισθητήρα είναι η κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησής του (Εικόνα 1.2). Η καμπύλη βαθμονόμησης αποτελεί γραφική παράσταση του μετρούμενου σήματος σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του αναλύτη. Η καμπύλη προκύπτει με την βαθμονόμηση του βιοαισθητήρα είτε μέσω διαλυμάτων γνωστών συγκεντρώσεων, είτε με την μέθοδο γνωστής προσθήκης. Η απόκριση του βιοαισθητήρα προκύπτει

από τη μέτρηση του σήματος μετά την αποκατάσταση ισορροπίας ή τη μεταβολή της μετρούμενης αναλυτικής παραμέτρου.



Εικόνα 1.2. Τυπική καμπύλη βαθμονόμησης.

Γραμμικό Εύρος

Το εύρος των συγκεντρώσεων στο οποίο η μεταβολή της μετρούμενης αναλυτικής παραμέτρου παραμένει γραμμική ως προς τη μεταβολή της συγκέντρωσης του αναλύτη, καλείται ως γραμμικό εύρος απόκρισης. Το γραμμικό εύρος ενός βιοαισθητήρα θεωρείται ικανοποιητικό όταν καλύπτει τουλάχιστον δύο τάξεις μεγέθους της συγκέντρωσης του αναλύτη.

Ευαισθησία

Ως ευαισθησία ορίζεται ως ο λόγος της μεταβολής της μετρούμενης αναλυτικής παραμέτρου προς τη συγκέντρωση του αναλύτη και προκύπτει από την κλίση της καμπύλης βαθμονόμησης στο γραμμικό εύρος απόκρισης.

Όριο Ανίχνευσης

Η μικρότερη δυνατή συγκέντρωση του αναλύτη που μπορεί να μετρηθεί με αξιοπιστία, ορίζεται ως όριο ανίχνευσης. Το όριο ανίχνευσης μπορεί να υπολογιστεί μέσω της καμπύλης βαθμονόμησης, από το σημείο τομής της προέκτασης των δύο γραμμικών τμημάτων της καμπύλης. Πιο πρακτικά, το όριο ανίχνευσης ορίζεται και

ως η συγκέντρωση εκείνη του αναλύτη που δίνει σήμα τριπλάσιο από το θόρυβο (S/N=3).

Επιλεκτικότητα

Η επιλεκτικότητα ενός βιοαισθητήρα αποτελεί μέτρο της ικανότητάς του να αποκρίνεται στον αναλύτη παρουσία άλλων παρεμποδίζουσων ουσιών. Για να προσδιοριστεί η επιλεκτικότητα ενός βιοαισθητήρα, μετράται η απόκρισή του στον αναλύτη και συγκρίνεται με την αντίστοιχη απόκριση στις παρεμποδίζουσες ουσίες. Η επιλεκτικότητα εκφράζεται ως ο λόγος του σήματος σε μια συγκέντρωση αναλύτη ως προς το σήμα στην ίδια συγκέντρωση παρεμποδίζουσας ουσίας. Η επιλεκτικότητα ενός βιοαισθητήρα εξαρτάται κυρίως από το βιολογικό μόριο αναγνώρισης, αλλά ωστόσο μπορεί να επηρεαστεί και από το είδος του μεταλλάκτη σήματος που χρησιμοποιείται.

Σταθερότητα- Χρόνος ζωής

Η σταθερότητα ενός βιοαισθητήρα ορίζεται ως το χρονικό διάστημα που απαιτείται για την μείωση της ευαισθησίας του κατά 10% ή κατά 50% από την αρχική τιμή λειτουργίας του. Ανάλογα με τη χρήση του βιοαισθητήρα, η σταθερότητα διακρίνεται σε σταθερότητα αποθήκευσης (storage stability) και σε σταθερότητα συνεχούς λειτουργίας (operational stability). Ο πιο βασικός παράγοντας από τον οποίο επηρεάζεται η σταθερότητα ενός βιοαισθητήρα είναι η σταθερότητα του βιολογικού μορίου. Ωστόσο παράγοντες όπως ο τρόπος κατασκευής του βιοαισθητήρα, το είδος του μεταλλάκτη σήματος αλλά και οι πειραματικές συνθήκες όπως, το pH, η θερμοκρασία, κλπ., μπορούν να επηρεάσουν τον χρόνο βέλτιστης λειτουργίας του βιοαισθητήρα.

Αναπαραγωγισιμότητα- Επαναληψιμότητα

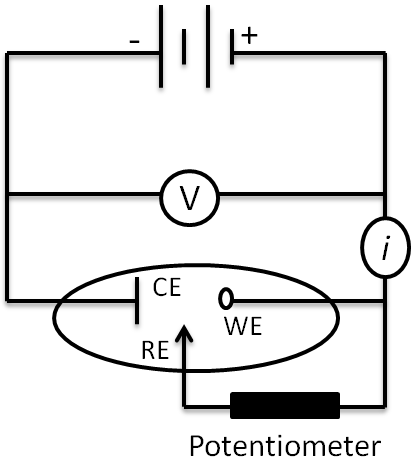
Ως επαναληψιμότητα εκφράζεται, η επί τοις εκατό σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) μεταξύ των μετρήσεων ή των χαρακτηριστικών του ίδιου βιοαισθητήρα ή ακόμα και διαφορετικών βιοαισθητήρων. Επομένως διακρίνεται σε επαναληψιμότητα μετρήσεων του βιοαισθητήρα και σε αναπαραγωγισιμότητα κατασκευής. Για τον προσδιορισμό της επαναληψιμότητας πραγματοποιούνται επαναλαμβανόμενες

μετρήσεις της ευαισθησίας και της απόκρισης του βιοαισθητήρα σε συγκεκριμένη συγκέντρωση αναλύτη. Γενικά για να κριθεί μια αναλυτική μέθοδος αξιόπιστη, θα πρέπει η επί τοις εκατό σχετική τυπική απόκλιση να είναι μικρότερη από 10%.

1.2 ΑΜΠΕΡΟΜΕΤΡΙΚΟΙ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ

1.2.1 Αρχή λειτουργίας

Η αρχή λειτουργίας των αμπερομετρικών βιοαισθητήρων βασίζεται στην ανίχνευση ηλεκτροχημικά ενεργών ουσιών που οξειδώνονται ή ανάγονται κατά τη διάρκεια της βιολογικής αναγνώρισης. Στους αμπερομετρικούς βιοαισθητήρες χρησιμοποιείται ένα σύστημα τριών ηλεκτροδίων που αποτελείται από το ηλεκτρόδιο εργασίας, το αναφορικό ηλεκτρόδιο και το βοηθητικό ηλεκτρόδιο (Εικόνα 1.3). Η αναλυτική πληροφορία προκύπτει από τη μέτρηση του ρεύματος που παράγεται από την οξειδοαναγωγική αντίδραση που λαμβάνει χώρα στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας κατά το στάδιο της βιολογικής αναγνώρισης. Πρακτικά εφαρμόζεται σταθερή διαφορά δυναμικού μεταξύ του ηλεκτροδίου εργασίας και του ηλεκτροδίου αναφοράς και μετράται το ρεύμα που διαρρέει το κύκλωμα ύστερα από την αντίδραση μεταφοράς φορτίου, μέσω ενός ποτενσιοστάτη. Ο ποτενσιοστάτης ελέγχει συνεχώς το δυναμικό του ηλεκτροδίου εργασίας ως προς το δυναμικό του ηλεκτροδίου αναφοράς. Η εφαρμοζόμενη τιμή δυναμικού επιλέγεται έτσι ώστε να μπορούν να οξειδωθούν ή να αναχθούν οι υπό ανάλυση ηλεκτροενεργές ουσίες στο ηλεκτρόδιο εργασίας. Το ρεύμα, που παράγεται από την οξείδωση ή την αναγωγή των ηλεκτροενεργών ουσιών, διαρρέει το κύκλωμα μέσω του βοηθητικού ηλεκτροδίου και συσχετίζεται με την συγκέντρωση του αναλύτη.

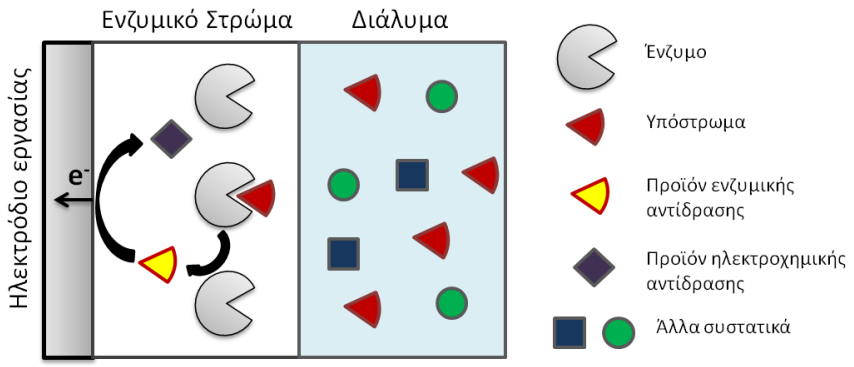


Εικόνα 1.3. Σύστημα τριών ηλεκτροδίων που χρησιμοποιείται στην αμπερομετρία. (WE: ηλεκτρόδιο εργασίας, RE: αναφορικό ηλεκτρόδιο, CE: βοηθητικό ηλεκτρόδιο).

Στην πλειονότητά τους οι αμπερομετρικοί βιοαισθητήρες βασίζονται σε ενζυμικές αντιδράσεις. Σε αυτή την περίπτωση το βιολογικό μόριο αναγνώρισης είναι ένα ακινητοποιημένο ένζυμο σε επαφή με το ηλεκτρόδιο εργασίας. Κατά το στάδιο ανάλυσης το υπόστρωμα διαχέεται προς το ενζυμικό στρώμα και δεσμεύεται από το ακινητοποιημένο ένζυμο. Ακολουθεί η ενζυμική αντίδραση από την οποία προκύπτει το προϊόν το οποίο συνήθως οξειδώνεται ή ανάγεται στο ηλεκτρόδιο εργασίας και παράγονται ηλεκτρόνια. Στην περίπτωση που η ηλεκτροενεργή ουσία είναι κάποιο από τα προϊόντα της αντίδρασης παρατηρείται αύξηση στο ρεύμα ανάλογη της συγκέντρωσης του αναλύτη. Όταν η ηλεκτροενεργή ουσία αποτελεί συμπαράγοντα της ενζυμικής αντίδρασης, τότε χρησιμοποιείται πάντα σε αφθονία ώστε να μην επηρεάζει την πραγματοποίηση της ενζυμικής αντίδρασης και τη μέτρηση του αναλύτη. Η τιμή του παραγόμενου ρεύματος δίνεται από την *εξίσωση Cottrell*:

$$I = \frac{nFAD^{1/2}C}{\pi^{1/2}t^{1/2}}$$

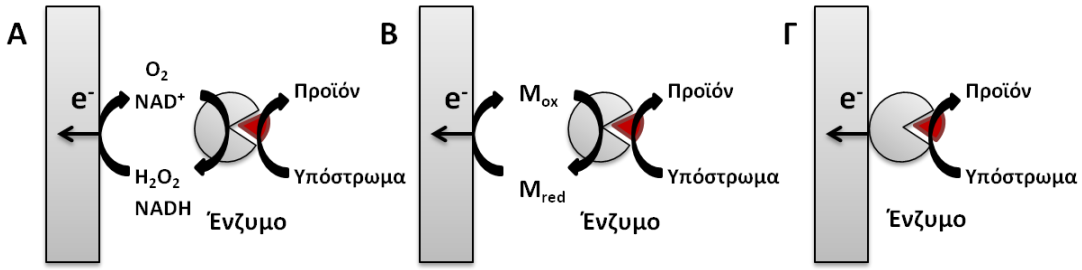
όπου n: ο αριθμός των ηλεκτρονίων που μεταφέρονται κατά την οξειδοαναγωγική αντίδραση, F: η σταθερά του Faraday, A: η ενεργή επιφάνεια του ηλεκτροδίου, D: ο συντελεστής διάχυσης της ουσίας, C: η συγκέντρωση της ουσίας. Η εξίσωση Cottrell δίνει την εξάρτηση του ρεύματος από το χρόνο και αποτελεί βασική εξίσωση για διάφορες ηλεκτροχημικές τεχνικές, όπως η χρονοαμπερομετρία που έχει χρησιμοποιηθεί και στη παρούσα εργασία. Στην Εικόνα 1.4 παρουσιάζεται η σχηματική αναπαράσταση της αρχής λειτουργίας ενός αμπερομετρικού ενζυμικού βιοαισθητήρα, στον οποίο το ακινητοποιημένο ένζυμο (βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης) βρίσκεται σε επαφή με το ηλεκτρόδιο εργασίας. Κατά την προσθήκη του βιοαισθητήρα στο δείγμα, η προς ανάλυση ουσία διαχέεται στην επιφάνεια του ενζυμικού στρώματος, αναγνωρίζεται επιλεκτικά και αλληλεπιδρά με το ένζυμο, όπου καταλύεται η μετατροπή της στο αντίστοιχο προϊόν. Η μέτρηση ολοκληρώνεται μόνο εάν ένα από τα αντιδρώντα ή τα προϊόντα είναι ηλεκτροχημικά ενεργό, ώστε να παρατηρηθεί ροή ηλεκτρονίων προς το ηλεκτρόδιο εργασίας.



Εικόνα 2. Αρχή λειτουργίας ενός αμπερομετρικού ενζυμικού βιοαισθήτηρα.

1.2.2 Εξέλιξη Αμπερομετρικών Ενζυμικών Βιοαισθητήρων

Οι μελέτες των επιστημόνων κατά την ανάπτυξη των αμπερομετρικών βιοαισθητήρων επικεντρώθηκαν στη σύζευξη του βιολογικού μορίου αναγνώρισης με το μεταλλάκτη σήματος και στην επίτευξη ταχύτατης μεταφοράς ηλεκτρονίων μεταξύ του ενεργού κέντρου του ενζύμου και της επιφάνειας του ηλεκτροδίου εργασίας. Με αυτό τον τρόπο κατά την εξέλιξη των αμπερομετρικών βιοαισθητήρων, αναπτύχθηκαν τρεις γενιές αισθητήρων (Εικόνα 1.5).



Εικόνα 1.5. Σχηματική αναπαράσταση της Α) Πρώτης Γενιάς, Β) Δεύτερης Γενιάς και Γ) Τρίτης Γενιάς Βιοαισθητήρων.

Βιοαισθητήρες πρώτης γενιάς

Στους βιοαισθητήρες πρώτης γενιάς η μεταφορά ηλεκτρονίων μεταξύ του οξειδοαναγωγικού κέντρου του ενζύμου και του ηλεκτροδίου επιτυγχάνεται μέσω ενός φυσικού συμπαράγοντα του ενζύμου[8]. Οι πιο γνωστοί φυσικοί συμπαράγοντες είναι το O_2 και το NAD^+, οι οποίοι λαμβάνουν ηλεκτρόνια από το ένζυμο και

ανάγονται σε H_2O_2 και NADH, αντίστοιχα. Τα προϊόντα που παράγονται οξειδώνονται στη συνέχεια στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας και έτσι έχουμε μια συνεχή ροή ηλεκτρονίων από το ενεργό κέντρο του ενζύμου στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Παρ' όλα αυτά η διαδικασία αυτή μεταφοράς ηλεκτρονίων είναι σχετικά αργή, με συνέπεια, οι αντίστοιχοι βιοαισθητήρες να εμφανίζουν αργή απόκριση και αργή αναγέννηση του ενζύμου. Ένα άλλο βασικό μειονέκτημα της συγκεκριμένης κατηγορίας ενζυμικών βιοαισθητήρων είναι ότι για την οξείδωση του H_2O_2 και του NADH, απαιτούνται μεγάλα υπερδυναμικά, στα οποία μπορούν να οξειδωθούν και άλλες ηλεκτροενεργές ενώσεις, συνεισφέροντας έτσι θετικά στο σφάλμα των αναλύσεων, ενώ παράλληλα μειώνεται και ο χρόνος ζωής των βιοαισθητήρων. Τα πρακτικά αυτά προβλήματα συνέβαλαν στην ανάπτυξη και χρήση των τεχνιτών συμπαραγόντων οι οποίοι ονομάζονται μεταφορείς ηλεκτρονίων, οδηγώντας με αυτό τον τρόπο στη δεύτερη γενιά βιοαισθητήρων.

Βιοαισθητήρες δεύτερης γενιάς

Οι μεταφορείς ηλεκτρονίων που χρησιμοποιούνται στους βιοαισθητήρες δεύτερης γενιάς, είναι μικρού μοριακού βάρους οξειδοαναγωγικά ζεύγη που έχουν την ικανότητα να μεταφέρουν ηλεκτρόνια από το οξειδοαναγωγικό κέντρο του ενζύμου στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου[9,10]. Όταν λαμβάνει χώρα η καταλυτική αντίδραση η οξειδωμένη μορφή του μεταφορέα ηλεκτρονίων (M_{ox}) αντιδρά με την ανηγμένη μορφή του ενζύμου και στη συνέχεια διαχέεται προς την επιφάνεια του ηλεκτροδίου όπου και υφίσταται ταχύτατη οξείδωση (M_{red}). Ένας ιδανικός μεταφορέας ηλεκτρονίων χαρακτηρίζεται από τα ακόλουθα:

1. Εμφανίζει αντιστρεπτή ηλεκτροχημική συμπεριφορά.
2. Αντιδρά ταχύτατα με την ανηγμένη μορφή του ενζύμου.
3. Εμφανίζει χαμηλό δυναμικό οξειδοαναγωγής και δεν επηρεάζεται από μεταβολές του pH.
4. Είναι σταθερός και στις δύο οξειδοαναγωγικές του μορφές.
5. Εμφανίζει μικρή διαλυτότητα στο δείγμα για να αποφεύγεται η διαφυγή του στο ενζυμικό στρώμα.

6. Δεν αντιδρά με τα αντιδρώντα ή τα προϊόντα του καταλυτικού κύκλου και κυρίως με το O_2.

Βιοαισθητήρες τρίτης γενιάς

Η αρχή λειτουργίας της τρίτης γενιάς βιοαισθητήρων βασίζεται στην άμεση μεταφορά ηλεκτρονίων από το ενεργό κέντρο του ενζύμου στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας [11,12]. Ωστόσο η άμεση μεταφορά ηλεκτρονίων καθίσταται αρκετά δύσκολη λόγω της απόστασης του ενεργού κέντρου του ενζύμου από την επιφάνεια του ηλεκτροδίου, καθώς το ενεργό κέντρο βρίσκεται συνήθως πολύ βαθιά στο εσωτερικό της τεταρτοταγούς πρωτεϊνικής δομής. Για το σκοπό αυτό, εφαρμόζονται διάφορες τεχνικές ακινητοποίησης του ενζύμου, όπως η ομοιοπολική δέσμευση των πρωτεϊνών που συμβάλλει στη διευθέτησή τους με την επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας κατά τέτοιο τρόπο ώστε να έχουν τον κατάλληλο προσανατολισμό και να είναι εφικτή η άμεση μεταφορά των ηλεκτρονίων. Επιπλέον η εισαγωγή των πρωτεϊνών σε πολυμερικά πλέγματα που είτε είναι αγώγιμα, είτε έχουν κάποια οξειδοαναγωγικά κέντρα διευκολύνει την έμμεση ανταλλαγή ηλεκτρονίων.

1.2.3 Προβλήματα Αμπερομετρικών Ενζυμικών Βιοαισθητήρων

Η χρήση των αμπερομετρικών ενζυμικών βιοαισθητήρων εμφανίζει ένα μεγάλο εύρος εφαρμογών στην κλινική ιατρική, στην βιοτεχνολογία, στη χημεία τροφίμων και στη χημεία περιβάλλοντος, καθώς η διαδικασία ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης διαφόρων βιολογικών και βιοχημικών διεργασιών είναι μείζονος σημασίας για το παραπάνω φάσμα επιστημονικών πεδίων. Ωστόσο από την ανάπτυξη του πρώτου βιοαισθητήρα έως και σήμερα, κρίνεται συνεχώς αναγκαία η βελτιστοποίηση των αναλυτικών χαρακτηριστικών τους, όπως επίσης και η αντιμετώπιση ορισμένων βασικών λειτουργικών προβλημάτων που εμφανίζουν. Αυτά εστιάζονται τόσο στη σταθερότητα του βιολογικού στοιχείου αναγνώρισης που καθορίζει άμεσα και τον χρόνο ζωής του βιοαισθητήρα, όσο και στο στάδιο μεταλλαγής σήματος, της άμεσης δηλαδή μεταφοράς ηλεκτρονίων που επηρεάζεται

από παράγοντες όπως ο τρόπος κατασκευής του βιοαισθητήρα, το είδος των ηλεκτροδίων, η ηλεκτροχημική μέθοδος που χρησιμοποιείται για την ανάλυση, κ.ά.

Τα ένζυμα ως βιολογικοί καταλύτες και λόγω της εξαιρετικής βιολογικής επιλεκτικότητας που τα χαρακτηρίζει, αποτελούν τα πιο δημοφιλή βιολογικά στοιχεία αναγνώρισης για την ανάπτυξη βιοαισθητήρων. Ωστόσο σε συνθήκες συνεχούς λειτουργίας ή κατά την αποθήκευση των βιοαισθητήρων, έχει αποδειχθεί ότι μειώνεται η ευαισθησία τους, γεγονός που οφείλεται κυρίως στη μείωση της σταθερότητας του ενζύμου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μην μπορεί να επιτευχθεί η ευρεία ανάπτυξη εμπορικά διαθέσιμων συστημάτων βιοαισθητήρων σε επιθυμητό βαθμό. Διάφοροι παράγοντες όπως η θερμοκρασία, το pH, οι οργανικοί διαλύτες, το υψηλό δυναμικό που εφαρμόζεται στο ηλεκτρόδιο εργασίας στην περίπτωση των αμπερομετρικών βιοαισθητήρων, επηρεάζουν τη σταθερότητα του βιολογικού στοιχείου αναγνώρισης και μπορούν να οδηγήσουν σε απενεργοποίηση του βιολογικού μορίου κατά τη διάρκεια της κατασκευής των βιοαισθητήρων ή κατά τη διάρκεια των αναλύσεων. Οι ερευνητικές προσπάθειες, για την προστασία των ενζύμων από όλους αυτούς τους παράγοντες που μπορεί να επηρεάζουν την καταλυτική τους δραστικότητα, επικεντρώνονται είτε στην τροποποίηση τους μέσω χημικών και γενετικών μηχανισμών ή με την εισαγωγή πρόσθετων ομάδων, καθώς επίσης στην ακινητοποίησή τους σε οργανικά ή ανόργανα υποστρώματα μέσω ομοιοπολικής δέσμευσης, παγίδευσης και άλλων μεθόδων ακινητοποίησης[8].

Η βασική προσέγγιση για την ανάπτυξη άμεσων και αποτελεσματικών αμπερομετρικών βιοαισθητήρων εστιάζεται κυρίως στην άμεση μεταφορά ηλεκτρονίων μεταξύ του ακινητοποιημένου βιολογικού μορίου αναγνώρισης και της επιφάνειας του ηλεκτροδίου. Ωστόσο, οι προσπάθειες των ερευνητών για τη βελτίωση της σταθερότητας των ενζύμων ή της ακινητοποίησης του ενεργού τους κέντρου στη βέλτιστη δυνατή κοντινή απόσταση με την επιφάνεια του ηλεκτροδίου προϋποθέτουν περίτεχνους μηχανισμούς ανάπτυξης που οδηγούν σε αναγκαστική μείωση της αναπαραγωγιμότητας κατασκευής των βιοαισθητήρων. Το γεγονός αυτό περιορίζει αρκετά την ευρεία και αξιόπιστη εφαρμογή των βιοαισθητήρων. Για το σκοπό αυτό το επιστημονικό ενδιαφέρον έχει στραφεί τόσο στην αναζήτηση και χρήση άλλων πιο ευέλικτων και ίσως πιο σταθερών βιολογικών μορίων έναντι των

ενζύμων, όσο και στην απλοποίηση του μηχανισμού ανάπτυξης και μελέτης των βιοαισθητήρων.

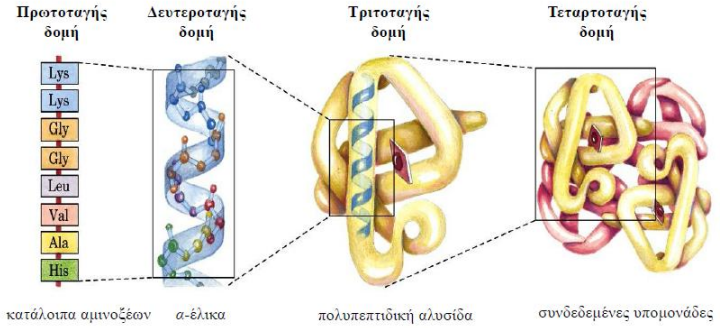
1.3 ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ ΒΑΣΙΣΜΕΝΟΙ ΣΕ ΑΝΑΔΙΠΛΟΥΜΕΝΕΣ ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ

Πολλά υποσχόμενη έχει αποδειχθεί η χρήση των αναδιπλούμενων πρωτεϊνών δέσμευσης (Hinge- Bending Motion Ligand Binding Proteins) ως βιολογικά στοιχεία αναγνώρισης για την ανάπτυξη μια νέας κατηγορίας βιοαισθητήρων για ένα ευρύ φάσμα αναλυτών. Πρόκειται για άμεσους, μη ενζυμικούς βιοαισθητήρες με τους οποίους ενδεχομένως θέτονται τα θεμέλια για την ανάπτυξη μια 'τέταρτης' γενιάς βιοαισθητήρων και δίνεται η δυνατότητα αντιμετώπισης των προβλημάτων των ενζυμικών βιοαισθητήρων, που προαναφέρθηκαν.

Γενικά, με τον όρο μη ενζυμικοί χαρακτηρίζονται κυρίως οι βιοαισθητήρες στους οποίους η βιολογική αναγνώριση δεν βασίζεται σε ενζυμικά καταλυόμενες αντιδράσεις και διαδικασίες, καθώς επίσης δεν κρίνεται απαραίτητη η προσθήκη επιπλέον δραστικών μορίων που θα διευκολύνουν την μεταγωγή της βιολογικής αλληλεπίδρασης. Σε αυτή την κατηγορία βιοαισθητήρων, συνήθως η ποσοτική ή ποιοτική ανίχνευση ενός βιολογικού μορίου ή η παρακολούθηση μιας βιολογικής αλληλεπίδρασης, βασίζεται κυρίως στην αξιοποίηση των φυσικοχημικών ή στερεοδομικών αλλαγών της τεταρτοταγούς δομής μη καταλυτικών βιολογικών μακρομορίων και δεν εξαρτάται από δευτερογενή προϊόντα αντιδράσεων ή συμπαράγοντες.

1.3.1 Αναδιπλούμενες Πρωτεΐνες Δέσμευσης

Οι πρωτεΐνες θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν ως 'η κινητήρια δύναμη' των κυττάρων, καθώς πρωταγωνιστούν σχεδόν σε όλες τις βιολογικές διεργασίες. Ο ρόλος τους είναι ζωτικής σημασίας για ένα ευρύ φάσμα βασικών κυτταρικών λειτουργιών, ενώ μπορούν να διαφέρουν μεταξύ τους τόσο όσες είναι και οι βιοχημικές διεργασίες που εξυπηρετούν. Συνήθως οι πρωτεΐνες κατηγοριοποιούνται σε μεγάλες οικογένειες είτε βάσει των δομικών τους χαρακτηριστικών (Εικόνα 1.6), είτε βάσει το είδος και τον μηχανισμό της βιολογικής λειτουργίας που επιτελούν.

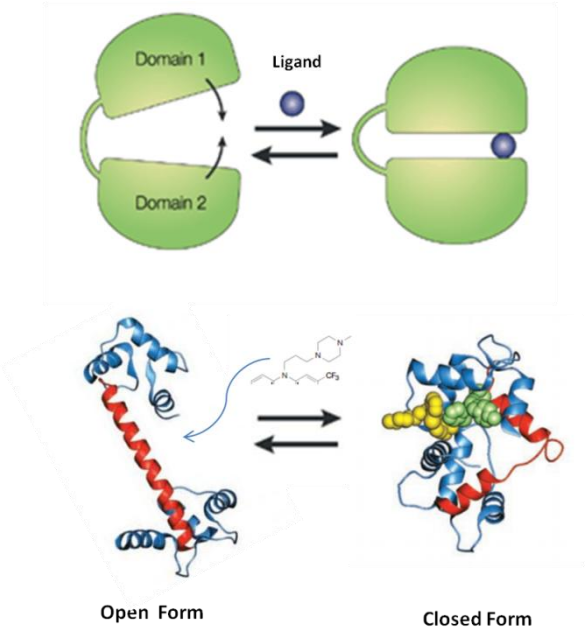


Εικόνα 1.6 . Η πρωτεϊνική δομή σε τέσσερα επίπεδα.

Οι αναδιπλούμενες πρωτεΐνες δέσμευσης ανήκουν σε μια μεγάλη οικογένεια πρωτεϊνών, που συμμετέχουν σε πολύ βασικές βιοχημικές διεργασίες όπως είναι η μεταγωγή σημάτων, η δομική στήριξη, η δημιουργία και η μεταφορά νευρικών ώσεων, κ.α.[13] Η ρύθμιση και ο μηχανισμός της δράσης τους βασίζεται σε αλλοστερικές αλληλεπιδράσεις με διάφορα σηματοδοτικά μόρια[14]. Τα σηματοδοτικά μόρια είναι οι χημικές ουσίες που υπάρχουν φυσιολογικά στο περιβάλλον ενός κυττάρου και ο ρόλος τους είναι να αλληλεπιδρούν εξειδικευμένα με πρωτεϊνικά μόρια υποδοχέων ως απόκριση σε κάποια βιοχημική αλλαγή. Ως σηματοδοτικά μόρια μπορούν να δράσουν τα μεταλλικά ιόντα (ασβεστίου, μαγνησίου, καλίου, νατρίου, κ.ά), διάφορες χημικές ενώσεις όπως οι υδρογονάνθρακες, ή ακόμα και μεγαλύτερα μόρια όπως οι ορμόνες, οι βιταμίνες, οι αυξητικοί παράγοντες, άλλα είδη πρωτεϊνών και τα νουκλεϊκά οξέα. Η εξειδικευμένη αλληλεπίδραση και δέσμευση των αναδιπλούμενων πρωτεϊνών με τους υποκαταστάτες τους είναι αποκλειστική συνέπεια της δομής τους, γεγονός που οδηγεί και σε εξειδικευμένη κυτταρική δράση.

Όσον αφορά τη φυσική τρισδιάστατη δομή τους, πρόκειται για μεγάλα σφαιρικά μόρια πρωτεϊνών που αποτελούνται συνήθως από δύο ίδιες ή πιο σπάνια διαφορετικές δομικές μονάδες συνδεδεμένες μέσω μιας εύκαμπτης πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Οι αναδιπλούμενες πρωτεΐνες δέσμευσης περιέχουν εξειδικευμένες θέσεις πρόσδεσης, μέσω το οποίων αλληλεπιδρούν με μεγάλη συγγένεια και επιλεκτικότητα με διάφορα σηματοδοτικά μόρια. Οι εξειδικευμένες θέσεις πρόσδεσης μπορεί να βρίσκονται είτε στην εύκαμπτη πολυπεπτιδική αλυσίδα που

ενώνει τις δύο δομικές περιοχές του μακρομορίου είτε στις δομικές υπομονάδες. Η πρόσδεση του υποκαταστάτη σε κάποια από αυτές τις εξειδικευμένες θέσεις προκαλεί έντονη αλλαγή στη στερεοδιάταξη της πρωτεΐνης, κατά την οποία παρατηρείται συνήθως κάμψη του μορίου μέσω της εύκαμπτης συνδετικής πολυπεπτιδικής αλυσίδας (hinge bending motion)[15] (Εικόνα 1.7). Μελέτες της κρυσταλλικής δομής των πρωτεϊνών έχουν δείξει ότι το ποσοστό αλλαγής της γωνίας στρέψης του μορίου κατά την μετατροπή της στερεοδιάταξής του εξαρτάται άμεσα από τη δευτεροταγή δομή της συνδετικής πολυπετιδικής αλυσίδας (α έλικα, β- πτυχωτή επιφάνεια, β-στροφή)[16,17,18].



Εικόνα 1.7. Σχηματική απεικόνιση της κίνησης κάμψης των αναδιπλούμενων πρωτεϊνών δέσμευσης, ύστερα από επιλεκτική δέσμευση του υποκαταστάτη τους.

Ο αριθμός των θέσεων μπορεί να ποικίλλει ανάλογα με τη δομή του πρωτεϊνικού μορίου. Με αυτό τον τρόπο, οι αναδιπλούμενες πρωτεΐνες δέσμευσης μπορούν να δεσμεύουν στο υπόστρωμά τους από ένα μέχρι και περισσότερα μόρια υποκαταστάτη. Οι αναδιπλούμενες πρωτεΐνες δέσμευσης απαντούν σε δύο μορφές: μια 'ανοιχτή' δομική μορφή κατά την οποία δεν έχει προσδεθεί ο υποκαταστάτης και σε μία 'κλειστή δομική μορφή' κατά την οποία οι εξειδικευμένες θέσεις δέσμευσης είναι πλήρως κατειλημμένες. Οι επαγόμενες δομικές αλλαγές στην τεταρτοταγή δομή των αναδιπλούμενων πρωτεϊνών που προκαλεί ο σχηματισμός

του συμπλόκου πρωτεΐνης- υποκαταστάτη πυροδοτούν αλλαγές στη βιολογική ενεργότητα της πρωτεΐνης. Οι μελέτες για τον προσδιορισμό τόσο της στοιχειομετρίας της αλληλεπίδρασης των συγκεκριμένων πρωτεϊνών με τους υποκαταστάτες τους όσο και του είδους των αλληλεπιδράσεων που λαμβάνουν χώρα, βρίσκονται στο επίκεντρο της βασικής έρευνας, καθώς η ερμηνεία αυτών των φαινομένων μπορεί να συμβάλει σημαντικά στον σχεδιασμό νέων φαρμάκων και την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών μεθόδων.

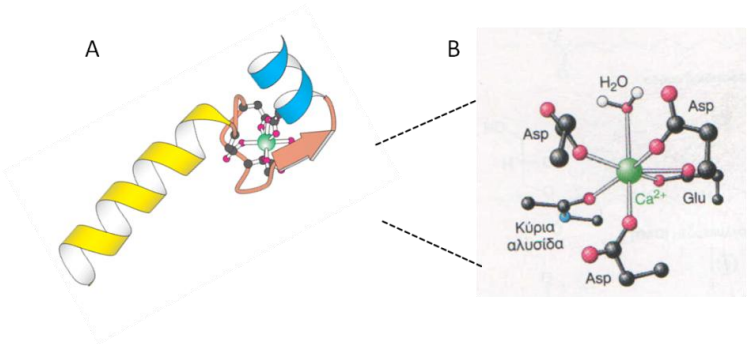
1.3.2 Αναδιπλούμενη Πρωτεΐνη Δέσμευσης Ασβεστίου: Ασβεστιοτροποποιητίνη

Το ασβέστιο το πιο άφθονο μεταλλικό στοιχείο στον ανθρώπινο οργανισμό (~ 1kg), είναι ένας ενδοκυτταρικός αγγελιαφόρος πολλών πορειών μεταγωγής σήματος. Διαμεμβρανικά συστήματα μεταφοράς ρυθμίζουν κατάλληλα τα επίπεδα Ca^{2+}, ώστε η φυσιολογική ενδοκυττάρια συγκέντρωσή του να είναι τυπικά 100nM, αρκετές τάξεις χαμηλότερο από τη συγκέντρωσή του στο αίμα η οποία είναι περίπου 2,5mM..

Ο αριθμός συναρμογής του Ca^{2+} μπορεί να κυμαίνεται από 4-8 και έχει την ικανότητα να δεσμεύεται ισχυρά με πρωτεΐνες μέσω αρνητικά φορτισμένων ατόμων οξυγόνου. Η ικανότητα του ασβεστίου να συναρμόζεται με πολλά προσδέματα-που έχουν από έξι έως οκτώ άτομα οξυγόνου- το καθιστά ικανό να σταυροσυνδέει διαφορετικά τμήματα μιας πρωτεΐνης και να επάγει σημαντικές αλλαγές στη στερεοδιάταξή της. Το Ca^{2+} μέσω των επαγόμενων στερεοδομικών αλλαγών που προκαλεί με τη δέσμευσή του σε υποστρώματα πρωτεϊνικών μορίων συμβάλει στη ρύθμιση της βιολογικής ενεργότητάς τους. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το ασβέστιο να συμμετέχει σε πολλές βιολογικές διεργασίες (έκκριση ορμονών, συστολή των μυών, νευροδιαβίβαση και σχηματισμός της μνήμης)[19].

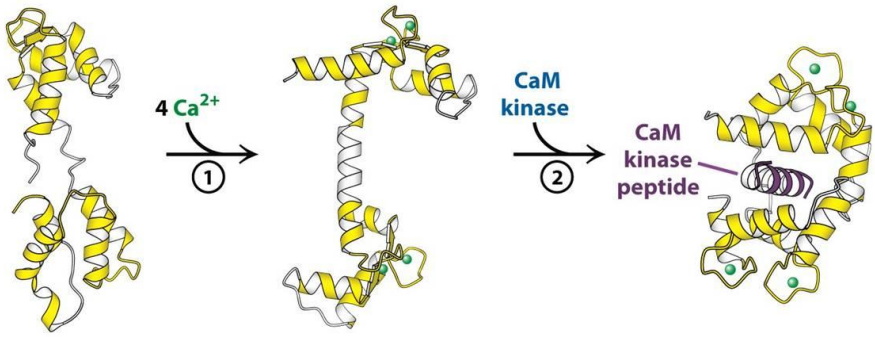
Η αβεστιοτροποποιητίνη, μια πρωτεΐνη που αποτελείται από 148 αμινοξέα και με μοριακό βάρος 17kDa, λειτουργεί ως ανιχνευτής ασβεστίου σχεδόν σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα. Η ασβεστιοτροποποιητίνη αποτελεί μέλος της οικογένειας των πρωτεϊνών με *χέρι EF* (EF hand) και ενεργοποιείται από τη δέσμευση Ca^{2+} όταν

τα κυτοσολικά επίπεδα ασβεστίου υπερβαίνουν τα 500nM. Το χέρι EF είναι ένα δεσμευτικό του μοτίβου Ca^{2+}, που αποτελείται από μια έλικα, μια θηλιά και μια δεύτερη έλικα[20]. Το σύμπλοκο συναρμογής με κάθε Ca^{2+} αποτελείται από επτά άτομα οξυγόνου: έξι προερχόμενα από τα αμινοξέα της πρωτεΐνης και ένα δεσμευμένο μόριο ύδατος (Εικόνα 1.8).



Εικόνα 1.8. Α) Το χέρι EF-Μοτίβο δέσμευσης ασβεστίου, Β) Ο τρόπος δέσμευσης του Ca^{2+} στην ασβεστιοτροποποιητίνη.

Απουσία δεσμευμένου ασβεστίου Ca^{2+} , η ασβεστιοτροποποιητίνη αποτελείται από δύο δομικές περιοχές, κάθε μια από τις οποίες είναι ένα ζεύγος μοτίβων χεριού EF συνδεδεμένων με μια ευέλικτη έλικα. Πολλά από τα κατάλοιπα αμινοξέων που τυπικά συμμετέχουν στη δέσμευση του ασβεστίου βρίσκονται στην επιφάνεια αυτών των δομικών περιοχών, προσανατολισμένα με τρόπο ακατάλληλο για τη δέσμευση Ca^{2+}. Με τη δέσμευση του Ca^{2+} σε κάθε μοτίβο χεριού EF αυτές οι μονάδες αλλάζουν στερεοδιάταξη: οι θέσεις δέσμευσης του Ca^{2+} στρέφονται προς το εσωτερικό για να δεσμεύσουν Ca^{2+} , μετακινώντας τα υδρόφοβα κατάλοιπα από το εσωτερικό στο εξωτερικό αυτών των δομικών περιοχών. Αυτές οι στερεοδομικές αλλαγές δημιουργούν υδρόφοβα τμήματα στην επιφάνεια κάθε δομικής περιοχής, τα οποία είναι κατάλληλα για αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες. Στην Εικόνα 1.9 απεικονίζεται η δομή της πρωτεΐνης πριν και μετά την δέσμευση των ιόντων ασβεστίου καθώς και η τελική δομή που αποκτά ύστερα από την αλληλεπίδραση με πρωτεΐνες-στόχους.



Εικόνα 1.9. Τα στάδια των στερεοδομικών αλλαγών της ασβεστιοτροποποιητίνης, 1) μετά την δέσμευση τεσσάρων Ca^{2+}, 2) μετά την αλληλεπίδραση της με πρωτεϊνικά μόρια-στόχους.

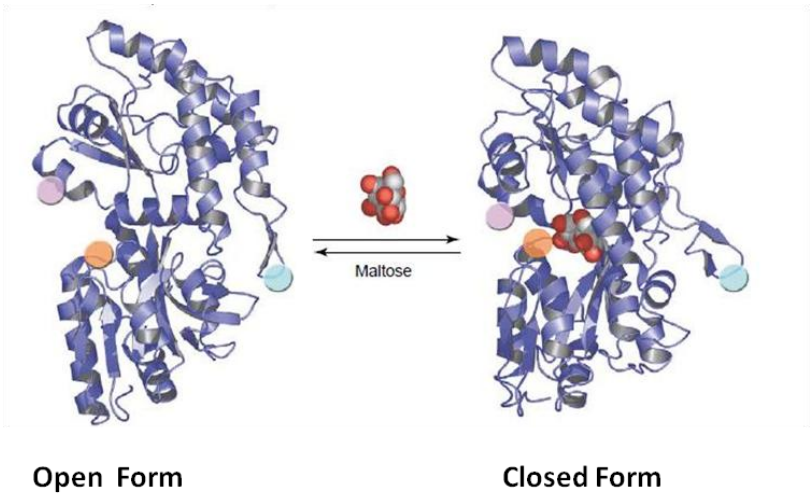
1.3.3 Ανάπτυξη Βιοαισθητήρων Βασισμένων σε Αναδιπλούμενες Πρωτεΐνες Δέσμευσης

Η μεγάλη επιλεκτικότητα που εμφανίζουν οι αναδιπλούμενες πρωτεΐνες δέσμευσης για τους υποκαταστάτες τους, αποτελεί ένα βασικό κίνητρο μελέτης της χρήσης και αξιοποίησής τους ως βιολογικά στοιχεία αναγνώρισης για την ανάπτυξη συστημάτων βιοαισθητήρων που θα αποκρίνονται σε ένα ευρύ φάσμα αναλυτών[21,22]. Παράλληλα, ιδιαίτερο ενδιαφέρον φαίνεται να εμφανίζει η αξιοποίηση των επαγόμενων δομικών αλλαγών που παρατηρούνται στη στερεοδιάταξη των αναδιπλούμενων πρωτεϊνών δέσμευσης κατόπιν αλληλεπίδρασης με τον υποκαταστάτη τους, για την ποιοτική ή ποσοτική ανίχνευση των φαινομένων δέσμευσης μέσω διαφόρων συστημάτων βιοαισθητήρων[23]. Η έντονη κίνηση του πρωτεϊνικού μορίου, κατά την χαρακτηριστική κάμψη που ακολουθεί τη δέσμευση του υποκαταστάτη σ’ αυτό, μπορεί να μετατραπεί σε αναλυτικό σήμα με τη χρήση διαφόρων μεταλλακτών σήματος.

Μερικές από τις εφαρμογές διαφόρων οικογενειών αναδιπλούμενων πρωτεϊνών δέσμευσης ως βιολογικά στοιχεία αναγνώρισης, έχουν αναφερθεί για την ανάπτυξη οπτικών βιοαισθητήρων. Πιο συγκεκριμένα, οι αναδιπλούμενες πρωτεΐνες δέσμευσης υδατανθράκων, που βρίσκονται στην περιπλασματική μεμβράνη των βακτηριακών κυττάρων (PBPs), έχουν μελετηθεί ευρέως ως βιολογικά στοιχεία αναγνώρισης στην ανάπτυξη βιοαισθητήρων φθορισμού για την ανίχνευση και παρακολούθηση της δέσμευσης των αντίστοιχων σακχάρων (γλυκόζη, μαλτόζη,

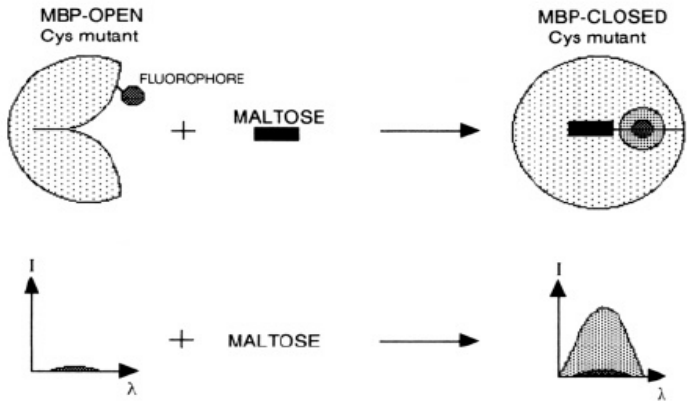
ριβόζη, κ.λ.π) σε αυτές[25,26,27]. Κατά την ανάπτυξη αυτής της κατηγορίας βιοαισθητήρων πραγματοποιείται ομοιοπολική σύζευξη μιας φθορίζουσας χρωστικής ομάδας σε ομάδες θειολών καταλοίπων κυστεΐνης της αναδιπλούμενης πρωτεΐνης δέσμευσης και παρατηρούνται αλλαγές στην ένταση του φθορισμού απουσία και παρουσία του υποκαταστάτη. Από αντίστοιχες μελέτες έχει βρεθεί ότι το σημείο σύζευξης της δραστικής φθορίζουσας ουσίας πρέπει να βρίσκεται κοντά στην περιοχή δέσμευσης του υποκαταστάτη της αναδιπλούμενης πρωτεΐνης, όπου παρατηρούνται και οι μέγιστες δομικές αλλαγές.

Η επιλεκτική αναδιπλούμενη πρωτεΐνη δέσμευσης για την μαλτόζη (Maltose Binding Protein,MBP) που αποτελεί ένας μέλος της μεγάλης οικογένειας των πρωτεϊνών δέσμευσης υδατανθράκων της περιπλασματικής μεμβράνης των βακτηριακών κυττάρων, έχει μελετηθεί και χρησιμοποιηθεί ευρέως για την ανάπτυξη οπτικών βιοαισθητήρων. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη αποτελείται από δύο μεγάλες υπομονάδες συνδεδεμένες με τρόπο που σχηματίζουν μεταξύ τους μια περιοχή άρθρωσης (hinge region). Η στοιχειομετρία δέσμευσης μορίων μαλτόζης με την MBP είναι 1:1, ενώ η θέση δέσμευσης της μαλτόζης βρίσκεται στη διεπιφάνεια που σχηματίζουν οι δύο υπομονάδες της πρωτεΐνης, δηλαδή στην περιοχή άρθρωσης (hinge region) και υφίσταται έντονη αλλαγή στη στερεοδιάταξή της μετά τη δέσμευση της μαλτόζης.



Εικόνα 1.10. Αλλαγή στερεοδιάταξης της αναδιπλούμενης πρωτεΐνης δέσμευσης μαλτόζης όπως επάγεται μετά την δέσμευση της μαλτόζης.

Με κρυσταλλογραφία ακτινών Χ υψηλής ανάλυσης έχει βρεθεί ότι η MBP απαντάει σε δύο δομικές μορφές[28]: σε μία ανοιχτή δομική μορφή, όπου δεν έχει δεσμευτεί η μαλτόζη και σε μία κλειστή πλήρως αναδιπλούμενη δομική μορφή όπου η θέση δέσμευσης είναι κατειλημμένη από μαλτόζη (Εικόνα 1.10). Για την ανάπτυξη βιοαισθητήρων φθορισμού βασισμένων στην MBP[29,30], απαιτείται γενετική τροποποίηση σε ορισμένες περιοχές της δομής της πρωτεΐνης (στη διεπιφάνεια μεταξύ των δύο υπομονάδων για την εισαγωγή καταλοίπων κυστείνης), ώστε να είναι δυνατή η ομοιοπολική σύζευξη της φθορίζουσας χρωστικής ουσίας μέσω ομάδων θειολών. Από τις συγκεκριμένες έρευνες, έχει βρεθεί ότι η ένταση της ενέργειας φθορισμού της φθορίζουσας χρωστικής αλλάζει σημαντικά έπειτα από προσθήκη διαφορετικής συγκέντρωσης μαλτόζης (Εικόνα 1.11), ενώ δεν παρατηρείται αλλαγή του αναλυτικού σήματος κατόπιν προσθήκης άλλων σακχάρων όπως της γλυκόζης, ριβόζης κ.α. Ωστόσο ένα βασικό μειονέκτημα της συγκεκριμένης κατηγορίας βιοαισθητήρων είναι ότι απαιτούνται πολύπλοκοι θεωρητικοί μοριακοί υπολογισμοί για τον προσδιορισμό της βέλτιστης θέσης σύζευξης της χρωστικής στο μόριο της πρωτεΐνης, η οποία θα επιτρέπει τη μέγιστη παρατήρηση και ανίχνευση των δομικών αλλαγών που λαμβάνουν χώρα.



Εικόνα 1.11. Οπτικός βιοαισθητήρας αναδιπλούμενης πρωτεΐνης δέσμευσης μαλτόζης.

Το παραπάνω μειονέκτημα αντιμετωπίστηκε με την ανάπτυξη των οπτικών βιοαισθητήρων που βασίζονται στην μέτρηση της μεταφοράς της ενέργειας συντονισμού φθορισμού (Förster resonance energy transfer, FRET-biosensors)[31] ανάμεσα σε δύο παράγωγα πράσινων φθορίζουσων πρωτεϊνών (green fluorescent proteins, GFP). Η μεταφορά της ενέργειας FRET είναι ένας μηχανισμός που

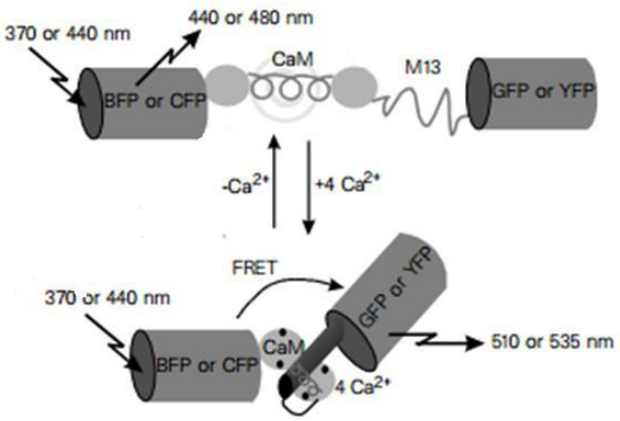
χρησιμοποιείται για τη μελέτη της μεταφοράς ενέργειας μεταξύ δύο φωτοευαίσθητων μορίων. Πιο συγκεκριμένα, πρόκειται για μια φωτοφυσική διαδικασία κατά την οποία η ενέργεια φωτοδιέγερσης μεταφέρεται από ένα μόριο δότη σε ένα μόριο δέκτη, τα οποία βρίσκονται σε στενή απόσταση μεταξύ τους (<10 Å). Το ποσοστό ευκολίας της μεταφοράς της ενέργειας FRET είναι αντιστρόφως ανάλογο με την έκτη δύναμη της απόστασης των δύο φωτοευαίσθητων μορίων σύμφωνα με την εξίσωση:

$$E = \frac{1}{1 + \left(\frac{r}{R_o}\right)^6}$$

Ως φωτοευαίσθητα μόρια για την μέτρηση της ενέργειας FRET σε βιολογικές μελέτες χρησιμοποιούνται συνήθως η πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP) και τα παράγωγά της. Η GFP είναι μια πρωτεΐνη μοριακού βάρους 26.9kDa (238 κατάλοιπα αμινοξέων) που απομονώθηκε από την μέδουσα Aequora Victoria η οποία φωταυγάζει πράσινο φώς (509nm) όταν απορροφήσει ακτινοβολία μήκους κύματος από 390-475 nm. Αργότερα ανακαλύφθηκαν τα παράγωγα της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης - γενετικά τροποποιημένα μόρια της GFP- με διαφορετικές τιμές απορρόφησης και εκπομπής ακτινοβολίας, ώστε να αξιοποιηθούν ως σηματοδοτικά μόρια για την παρακολούθηση in vivo διεργασιών με οπτικές μεθόδους. Για την ανάπτυξη των FRET-βιοαισθητήρων που βασίζονται στις αναδιπλούμενες πρωτεΐνες δέσμευσης, τα παράγωγα των πράσινων φθορίζουσων πρωτεϊνών συζεύγνυνται στο καρβόξυ και άμινο τελικό άκρο της αναδιπλούμενης πρωτεΐνης δέσμευσης με τεχνικές γενετικής μηχανικής. Κατόπιν προσθήκης του επιλεκτικού υποκαταστάτη η αναδίπλωση της δεσμευτικής πρωτεΐνης έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της απόστασης των φθορίζουσων πρωτεϊνών και την αύξηση της απόδοσης μεταφοράς της ενέργειας FRET.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα FRET- βιοαισθητήρα βασισμένο στην αναδιπλούμενη πρωτεΐνη δέσμευσης, την ασβεστιοτροποποιητίνη (Calmodulin, CaM), αποτελεί ο βιοαισθητήρας Cameleon[32,33] ο οποίος αναπτύχθηκε το 1997 από τον Roger Y.Tsien και την ομάδα του. Ο Cameleon αποτελείται, από την ασβεστιοτροποποιητίνη συνδεδεμένη με το πεπτίδιο-στόχο της πρωτεϊνικής κινάσης Ι (M13), τα οποία

βρίσκονται τοποθετημένα μεταξύ δύο παραγώγων της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης και χρησιμοποιείται για την ανίχνευση ασβεστίου σε ζωντανά κύτταρα.

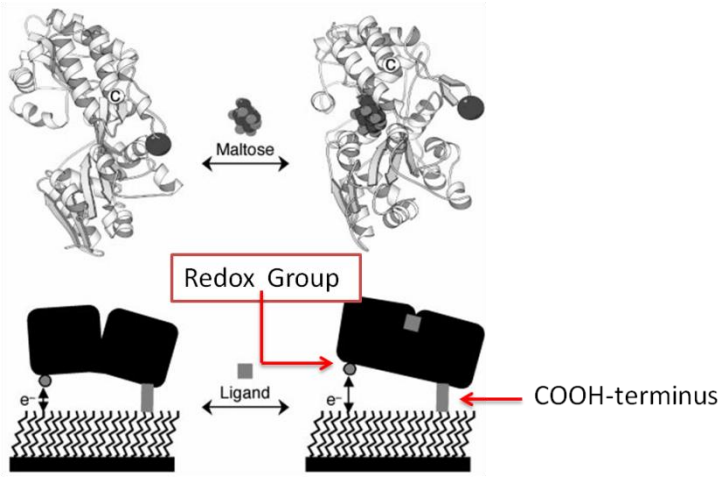


Εικόνα 1.12. Cameleon: ένας οπτικός βιοαισθητήρας Ca^{2+} βασισμένος στην ασβεστιοτροποιητίνη.

Στην Εικόνα 1.12 παρουσιάζεται η αρχή λειτουργίας του Cameleon, κατά την οποία παρουσία ιόντων ασβεστίου η ασβεστιοτροποποιητίνη αλλάζει στερεοδιάταξη και αποκτά την κατάλληλη δομή για την ισχυρή αλληλεπίδραση με το πεπτίδιο- στόχο της πρωτεϊνικής κινάσης Ι με την οποία είναι συνδεδεμένη. Η πλήρης αναδίπλωση της πρωτεΐνης μειώνει την απόσταση των δύο φθορίζουσων πρωτεϊνών με αποτέλεσμα να είναι πιο εύκολη η μετάβαση της ενέργειας FRET. Η αποδοτική μεταφορά της ενέργειας FRET στον Cameleon εξαρτάται από τα επίπεδα συγκέντρωσης των ιόντων ασβεστίου. Επίσης, με τεχνικές γενετικής μηχανικής τροποποιώντας την αλληλουχία των αμινοξέων στις περιοχές δέσμευσης των ιόντων ασβεστίου, είναι δυνατόν να μεταβληθεί η συγγένεια δέσμευσης του ασβεστίου στις περιοχές αυτές. Με αυτό τον τρόπο, ο βιοαισθητήρας Cameleon μπορεί να αποκρίνεται παρουσία ιόντων ασβεστίου σε ένα γραμμικό εύρος συγκεντρώσεων από 10^{-8}- 10^{-2}M για in vivo μετρήσεις σε ζωντανά κύτταρα και πλεονεκτεί έναντι άλλων συστημάτων βιοαισθητήρων CaM στα οποία η πρωτεΐνη είναι επισημασμένη με μία μόνο φθορίζουσα χρωστική ουσία.

Εκτός από την ανάπτυξη των οπτικών βιοαισθητήρων, οι αναδιπλούμενες πρωτεΐνες δέσμευσης έχουν αξιοποιηθεί ως βιολογικά στοιχεία αναγνώρισης και για την ανάπτυξη ηλεκτροχημικών βιοαισθητήρων. Το 2001, ο David E.Benson και οι

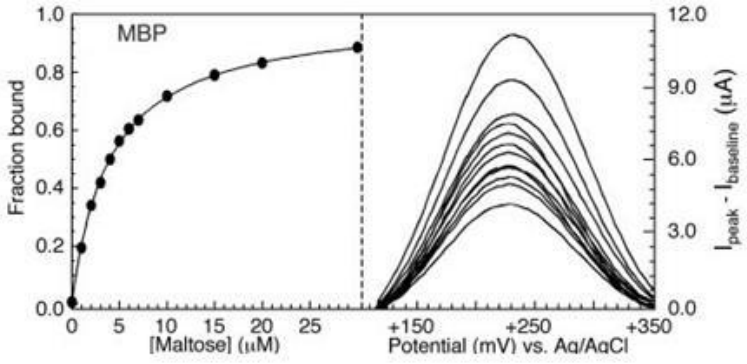
συνεργάτες του, πρότειναν μια αποτελεσματική μέθοδο ανάπτυξης άμεσων αμπερομετρικών βιοαισθητήρων για την ποσοτική ανίχνευση υδατανθράκων και όχι μόνο, βασισμένων σε αναδιπλούμενες πρωτείνες[34]. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, χρησιμοποιήθηκαν ως βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης οι αναδιπλούμενες πρωτεΐνες δέσμευσης υδατανθράκων της περιπλασματικής μεμβράνης των βακτηρίων (PBPs). Αρχικά για τον σχεδιασμό των βιοαισθητήρων, χρησιμοποιήθηκαν χημικά τροποποιημένα ηλεκτρόδια χρυσού ως ηλεκτρόδια εργασίας και ως βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης η αναδιπλούμενη πρωτεΐνη δέσμευσης μαλτόζης (MBP). Η ακινητοποίηση της MBP πραγματοποιήθηκε μέσω δέσμευσης του καρβόξυ- τελικού άκρου της στις δραστικές ομάδες (hydroxyl- Ni(II)-nitrilotriacetate groups) της χημικά τροποποιημένης επιφάνειας του ηλεκτροδίου.



Εικόνα 1.13. Η ακινητοποιημένη πρωτεΐνη MBP στην επιφάνεια ενός αμπερομετρικού βιοαισθητήρα και η επαγόμενη αλλαγή στην στερεοδιάταξη παρουσία μαλτόζης.

Έπειτα ένα οξειδοαναγωγικό σύμπλοκο Ru(II) συζεύχθηκε σε ένα κατάλοιπο κυστείνης της MBP με τέτοιο τρόπο ώστε να βρίσκεται στην μέγιστη κοντινή απόσταση με την επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας. Όπως αναφέρθηκε και στην περίπτωση ανάπτυξης των οπτικών βιοαισθητήρων η στοιχειομετρία δέσμευσης της MBP με την μαλτόζη είναι 1:1 και υφίσταται έντονη αλλαγή στη στερεοδιάταξή της μετά την δέσμευση. Όπως φαίνεται και από την Εικόνα 1.13, κατά την 'ανοιχτή' δομή της πρωτεΐνης όπου δεν έχει δεσμευτεί η μαλτόζη, το σύμπλοκο του Ru(II) βρίσκεται πολύ κοντά στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου με αποτέλεσμα να διευκολύνεται η άμεση μεταφορά ηλεκτρονίων. Παρουσία όμως μαλτόζης η MBP

αναδιπλώνεται απομακρύνοντας με αυτό τον τρόπο το σύμπλοκο του Ru(II) και καθιστώντας δυσκολότερη τη μεταφορά ηλεκτρονίων το όποιο οδηγεί σε μείωση της έντασης του ρεύματος που καταγράφεται κατά την ηλεκτροχημική μέθοδο.



Εικόνα 1.14. Καμπύλη βαθμονόμησης αμπερομετρικού βιοαισθητήρα βασισμένου στην πρωτεΐνη MBP και αμπερομετρική απόκριση που καταγράφεται παρουσία μαλτόζης.

Χρησιμοποιώντας δύο ακόμα μέλη πρωτεϊνών της οικογένειας των PBP επιλεκτικές για τη δέσμευση γλυκόζης και γλουταμινικού, και ελέγχοντας την απόκριση των αντίστοιχων βιοαισθητήρων, μπόρεσαν να προσδιορίσουν τις τιμές των σταθερών διάστασης του εκάστοτε υποκαταστάτη από το υπόστρωμα της πρωτεΐνης οι οποίες ταυτίζονται με τις τιμές που ελήφθησαν με αντίστοιχους οπτικούς βιοαισθητήρες.

Επίσης, απέδειξαν ότι ο βιοαισθητήρας της MBP μπορεί να ανταποκρίνεται στη δέσμευση Zn(II), τροποποιώντας κατάλληλα με τεχνικές γενετικής μηχανικής τη φυσική αλληλουχία της θέσης δέσμευσης της μαλτόζης στο υπόστρωμα της MBP σε αντίστοιχη για επιλεκτική δέσμευση Zn(II). Με αυτό τον τρόπο αποδείχθηκε πως οι αναδιπλούμενες πρωτεΐνες δέσμευσης μπορούν να αξιοποιηθούν για την ανάπτυξη βιο- ηλεκροχημικών διεπιφανειών για την άμεση ανίχνευση ενός ευρέως φάσματος αναλυτών βιολογικού ενδιαφέροντος.

Το πλεονέκτημα της συγκεκριμένης κατηγορίας βιοαισθητήρων εντοπίζεται στο ότι η ποσοτική ανίχνευση του αναλύτη δε βασίζεται σε ενζυμικά καταλυόμενες αντιδράσεις ή στην παραγωγή δευτερογενών προϊόντων αντιδράσεων, που προκαλούν σημαντικές παρεμποδίσεις στην ακρίβεια της μέτρησης. Επιπλέον οι αναδιπλούμενες πρωτεΐνες δέσμευσης έχουν διττό ρόλο: λειτουργούν ως βιολογικά

στοιχεία αναγνώρισης για την επιλεκτική δέσμευση των υποκαταστατών τους αλλά και ως μεταγωγοί σήματος καθώς μεταβιβάζουν τα φαινόμενα δέσμευσης μέσω των στερεοδομικών αλλαγών.

ΜΕΡΟΣ ΙΙ

2. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΑΜΕΣΟΥ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΑ ΒΑΣΙΣΜΕΝΟΥ ΣΕ ΑΝΑΔΙΠΛΟΥΜΕΝΗ ΠΡΩΤΕΙΝΗ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΑΣΒΕΣΤΙΟΥ: ΑΣΒΕΣΤΙΟΤΡΟΠΟΠΟΙΗΤΙΝΗ

2.1 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Οι αμπερομετρικοί βιοαισθητήρες αποτελούν τα πλέον δημοφιλή και ευρέως χρησιμοποιούμενα συστήματα βιοαισθητήρων κυρίως γιατί επιτρέπουν την ανίχνευση ενός ευρέως φάσματος αναλυτών σε πολύπλοκα δείγματα, σε πραγματικό χρόνο και με σχετικά μικρή προ-επεξεργασία του προς ανάλυση δείγματος. Το σύστημα ενός αμπερομετρικού βιοαισθητήρα αποτελεί ένα παζλ τμημάτων, η άρτια συνένωση των οποίων, καθώς επίσης ο πλήρης έλεγχος και η γνώση των χαρακτηριστικών τους, είναι εκείνα που καθορίζουν τη βέλτιστη αναλυτική απόδοση του ηλεκτροχημικού συστήματος και τη δυνατότητα εξαγωγής αξιόπιστων συμπερασμάτων από την αναλυτική πληροφορία που προκύπτει. Εξασφαλίζοντας τα παραπάνω, το ερευνητικό ενδιαφέρον έχει στραφεί στην απλοποίηση των πολύπλοκων διαδικασιών που απαιτούνται συνήθως για την ανάπτυξη των βιο-συστημάτων, αξιοποιώντας τις εγγενείς φυσικοχημικές αλλά και βιοχημικές ιδιότητες των βιολογικών μακρομορίων και χρησιμοποιώντας μεταλλάκτες σήματος με ανεπτυγμένα και μοναδικά ηλεκτροχημικά χαρακτηριστικά.

Οι αναδιπλούμενες πρωτεΐνες δέσμευσης λόγω της επιλεκτικότητας που εμφανίζουν προς τους αντίστοιχους υποκαταστάτες τους μπορούν να δράσουν ως εξαιρετικά στοιχεία βιολογικής αναγνώρισης. Ταυτόχρονα η μοναδική ιδιότητα που τις χαρακτηρίζει να υφίστανται αλλαγές στην στερεοδιάταξή τους ως αποτέλεσμα δέσμευσης του υποκαταστάτη τις καθιστά πολύ καλούς βιολογικούς μεταλλάκτες σήματος.. Εντούτοις, η χρήση των αναδιπλούμενων πρωτεϊνών δέσμευσης ως βιολογικά στοιχεία αναγνώρισης δεν έχει ακόμα βρει ευρεία εφαρμογή στην ανάπτυξη των άμεσων αμπερομετρικών συστημάτων βιοαισθητήρων.

Σε αυτή την εργασία μελετάται η ανάπτυξη άμεσων αμπερομετρικών βιοαισθητήρων για την παρακολούθηση φαινομένων δέσμευσης υποκαταστατών σε αναδιπλούμενες πρωτεΐνες δέσμευσης. Η μέθοδος στηρίζεται στην αξιοποίηση των χαρακτηριστικών στερεοδομικών αλλαγών που παρατηρούνται στην

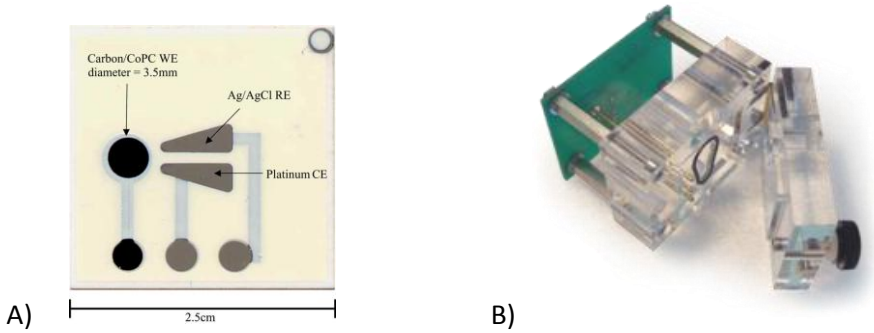
συγκεκριμένη οικογένεια πρωτεϊνών κατόπιν επιλεκτικής δέσμευσής τους με τον υποκαταστάτη τους και στην μεταγωγή της συγκεκριμένης αλληλεπίδρασης σε αναλυτική πληροφορία μέσω ενός ηλεκτροχημικού μεταλλάκτη σήματος. Για την ανάπτυξη της μεθόδου χρησιμοποιήθηκε η αναδιπλούμενη πρωτεΐνη δέσμευσης ασβεστίου, η ασβεστιοτροποποιητίνη (calmodulin, CaM), μια πρωτεΐνη που λειτουργεί ως ανιχνευτής ασβεστίου σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα και η οποία υφίσταται έντονη αλλαγή στην στερεοδιάταξή της ύστερα από την δέσμευση τεσσάρων ιόντων ασβεστίου. Ως ηλεκτροχημικός μεταλλάκτης σήματος χρησιμοποιείται ένα σύστημα τριών ηλεκτροδίων επίστρωσης (screen printed electrodes, SPEs), ενώ η απόκριση του βιο-συστήματος ελέγχεται με την χρήση των ηλεκτροχημικών τεχνικών της χρονοαμπερομετρίας και της φασματοσκοπίας ηλεκτροχημικής εμπέδησης. Με την ικανοποιητική απόδοση του βιοαισθητήρα που αναπτύσσεται παρουσία ιόντων ασβεστίου και σε συνδυασμό με τον απλό τρόπο κατασκευής του, προτείνεται μια νέα μέθοδος ανάπτυξης βιοενεργών διεπιφανειών βασισμένων στην οικογένεια των αναδιπλούμενων πρωτεϊνών δέσμευσης, με ένα πλήθος εφαρμογών σε διάφορους επιστημονικούς τομείς.

2.2 ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΑΜΕΣΟΥ ΑΜΠΕΡΟΜΕΤΡΙΚΟΥ CaM- ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΑ

2.2.1 Ηλεκτροχημικό Σύστημα

Για την ανάπτυξη του αμπερομετρικού βιοαισθητήρα βασισμένου στην ασβεστιοτροποποιητίνη (CaM), χρησιμοποιήθηκε ένα ηλεκτροχημικό στοιχείο τριών ηλεκτροδίωνεπίστρωσης. Τα ηλεκτρόδια αυτής της κατηγορίας κατασκευάζονται με την τεχνολογία παχιάς επίστρωσης κατά την οποία προκύπτουν εκτυπωμένα επίπεδα ηλεκτρόδια, διαφόρων γεωμετριών που αποτελούνται από αγώγιμες και μονωτικές επιστρώσεις πάνω σε κατάλληλα υλικά στήριξης (PVC, πολυεστέρα, κεραμικά). Το υλικό εκτύπωσης (μελάνι, ink) είναι ένα θιξοτροπικό υλικό κατάλληλου ιξώδους που εκτυπώνεται στο υλικό στήριξης και μπορεί να είναι Ag, Au, Pd, Pt, Ag/AgCl και διατίθεται γα την κατασκευή ηλεκτροδίων εργασίας, αναφοράς και βοηθητικών ηλεκτροδίων. Το εμπορικά διαθέσιμο ηλεκτροχημικό στοιχείο που χρησιμοποιήθηκε στη παρούσα εργασία απεικονίζεται στην Εικόνα 2.1Α και αποτελείται από:

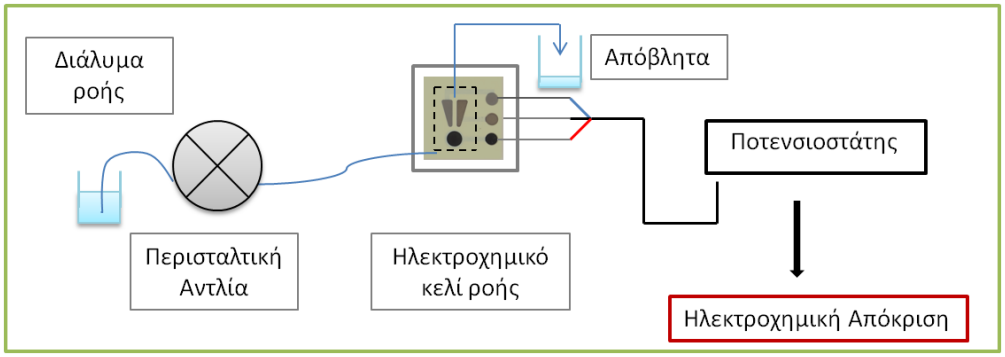
- Ως ***ηλεκτρόδιο εργασίας***, μελάνι γραφίτη με και χωρίς μεταφορέα ηλεκτρονίων, ένα οξειδοαναγωγικό σύμπλοκο του κοβαλτίου (Co(II)-phthalocyanine).
- Ως ***ηλεκτρόδιο αναφοράς***, μελάνι Ag/AgCl.
- Ως ***βοηθητικό ηλεκτρόδιο***, μελάνι Pt.



Εικόνα 2.1. Α) Ηλεκτροχημικό στοιχείο τριών ηλεκτροδίων επίστρωσης, Β) Ηλεκτροχημικό κελί ροής .

Για να λάβει χώρα η ηλεκτροχημική ανάλυση, τα ηλεκτρόδια επίστρωσης ανάλογα με τη γεωμετρία τους, τοποθετούνται σε κατάλληλα ηλεκτροχημικά κελιά στα οποία η εισαγωγή και η διέλευση του ηλεκτρολύτη και του προς ανάλυση δείγματος γίνονται με τη χρήση ενός συστήματος ροής (Εικόνα 2.1Β). Για να ολοκληρωθεί το

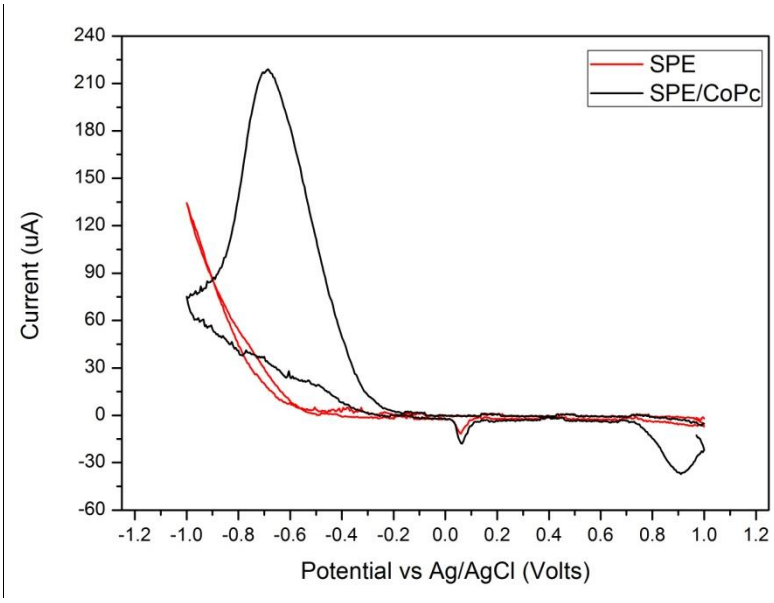
ηλεκτροχημικό σύστημα το ηλεκτροχημικό κελί συνδέεται με μια περισταλτική αντλία μέσω της οποίας γίνεται έλεγχος της ταχύτητας ροής του διαλύματος που εισέρχεται στο κελί, και με τις κατάλληλες ηλεκτρικές συνδέσεις μέσω της ηλεκτρικής πλακέτας που βρίσκεται στο πίσω μέρος του κελιού, συνδέεται με τον ποτενσιοστάτη. Στην Εικόνα 2.2 παρουσιάζεται η σχηματική απεικόνισης της παραματικής διάταξης που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία.



Εικόνα 2.2. Η πειραματική διάταξη του ηλεκτροχημικού συστήματος.

Για συγκριτικούς λόγους χρησιμοποιήθηκαν δύο είδη συστημάτων εκτυπωμένων ηλεκτροδίων (SPEs): ένα σύστημα στο οποίο το ηλεκτρόδιο εργασίας περιέχει μεταφορέα ηλεκτρονίων το οξειδοαναγωγικό σύμπλοκο του κοβαλτίου(II) (Cobalt(II) Phthalocyanine, CoPc) το οποίο για λόγους συντομίας θα αναφέρεται ως SPE/CoPc και ένα δεύτερο στο οποίο το ηλεκτρόδιο εργασίας δεν περιέχει μεταφορέα ηλεκτρονίων (SPE) και η εξωτερική επιφάνειά του αποτελείται μόνο από το ανθρακικό υλικό του γραφίτη.

Αρχικά με τη μέθοδο της κυκλικής βολταμετρίας μελετήθηκε η ποιοτική ηλεκτροχημική συμπεριφορά των δύο συστημάτων ηλεκτροδίων ώστε να επιλεχθεί το δυναμικό που θα εφαρμόζεται στις ακόλουθες μετρήσεις. Το κυκλικό βολταμογράφημα που λαμβάνεται σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτρολύτη Tris-HCl 10 mM με pH=7.4 και με ταχύτητα σάρωσης 200mV/s, παρουσιάζεται στην Εικόνα 2.3.

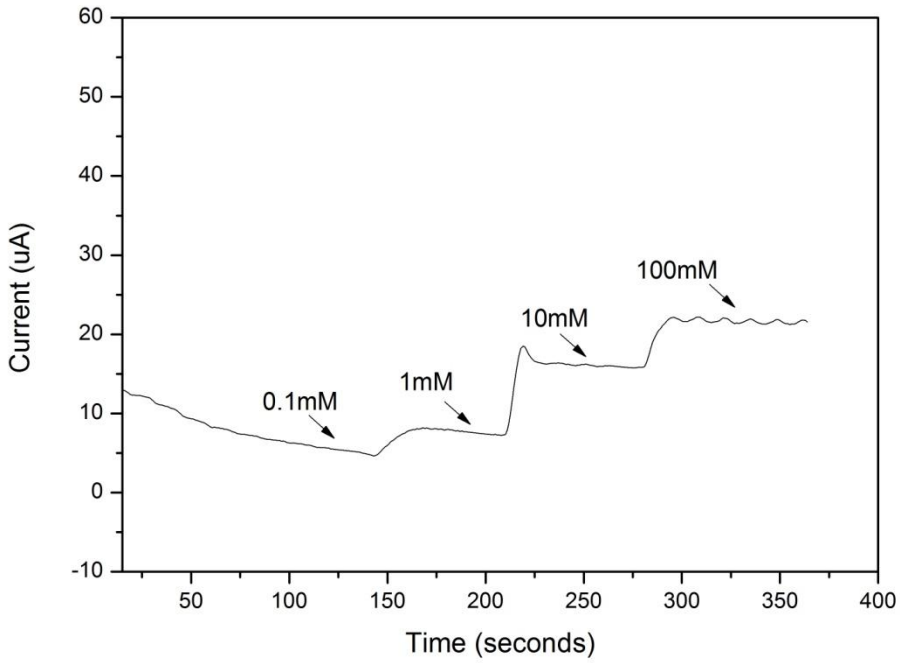


Εικόνα 2.3. Κυκλικά βολταμογραφήματα των SPE/CoPc και SPE ηλετροδίων αντίστοιχα σε 10mM Tris-HCl (pH= 7.4) και με ταχύτητα σάρωσης 200mV/sec.

Στο κυκλικό βολταμογράφημα του SPE/CoPc παρατηρείται η μέγιστη τιμή του καθοδικού ρεύματος I_{pc} σε τιμή καθοδικού δυναμικού E_{pc}= -600mV που οφείλεται στην αναγωγή του Co(II) σε Co(I) ενώ η μικρή κορυφή του ανοδικού ρεύματος I_{pa} σε τιμή ανοδικού δυναμικού E_{pa}= +900mV οφείλεται στην οξείδωση του Co(II) σε Co(III). Όπως αναμενόταν, οι παρατηρήσεις αυτές, που συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες[35,36] της κυκλοβολταμετρικής συμπεριφοράς των συμπλόκων κοβαλτίου- φθαλοκυανίνης, δεν σημειώνονται στο κυκλικό βολταμογράφημα του SPE. Επομένως λόγω της μεγάλης έντασης του καθοδικού ρεύματος που παρατηρείται από την αναγωγή του Co(II) σε Co(I), ως εφαρμοζόμενο δυναμικό για τις μετρήσεις που ακολούθησαν επιλέχθηκε η τιμή των -600mV.

Πριν την ακινητοποίηση της πρωτεΐνης στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας, προηγήθηκε έλεγχος της ηλεκτροχημικής συμπεριφοράς του συστήματος. Το διάλυμα του ηλεκτρολύτη που επιλέχθηκε για όλες τις ηλεκτροχημικές μετρήσεις ήταν ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl με pH 7.4, στο οποίο η βιολογική ενεργότητα της πρωτεΐνης διατηρείται. Χρησιμοποιώντας την ηλεκτροχημική μέθοδο της χρονοαμπερομετρίας, ελέγχθηκε η ηλεκτροχημική συμπεριφορά του στοιχείου SPE/CoPc (στοιχείο τριών εκτυπωμένων ηλεκτροδίων, στο οποίο δεν έχει ακινητοποιηθεί πρωτεΐνη) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις διαλύματος ηλεκτρολύτη. Η λήψη του χρονοαμπερογραφήματος έγινε υπό την εφαρμογή

δυναμικού -600mV και σε ταχύτητα ροής 1ml/min (Εικόνα 2.4). Παρατηρήθηκε έντονη διαταραχή θορύβου σε συγκέντρωση διαλύματος ηλεκτρολύτη 100mM (pH= 7,4) που οφείλεται στην ένταση του ρεύματος ροής (streaming current), η οποία δημιουργείται λόγω της κίνησης των φορτίων του ηλεκτρολύτη στην διεπιφάνεια που σχηματίζεται μεταξύ των δύο διαφορετικών φάσεων ηλεκτροδίου/ηλεκτρολύτη κατά τη ροή του στο ηλεκτροχημικό κελί. Για το λόγο αυτό οι επόμενες μετρήσεις που ακολούθησαν πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας διάλυμα ηλεκτρολύτη Tris-HCl 10mM (pH=7.4).



Εικόνα 2.4. Χρονοαμπερογράφημα SPE ηλεκτροδίου σε διαφορετικές συγκεντρώσεις διαλύματος ηλεκτρολύτη buffer Tris-HCl pH=7,4.

2.2.2 Ακινητοποίηση Ασβεστιοτροποποιητίνης (CaM) σε SPE ηλεκτρόδια

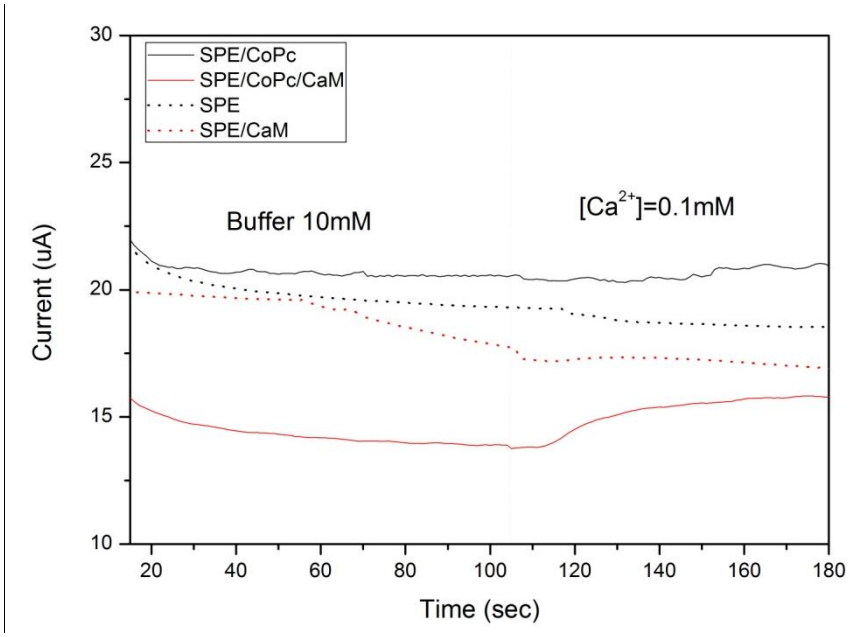
Για την κατασκευή των CaM- βιοαισθητήρων χρησιμοποιείται διάλυμα πρωτεΐνης ασβεστιοτροποποιητίνης συγκέντρωσης 1000μg/mL σε ρυθμιστικό διάλυμα 10mM Tris-HCl (pH=7.4). Η ακινητοποίηση της CaM πραγματοποιείται μέσω φυσικής προσρόφησης στην πορώδη επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας. Η πρωτεΐνη συγκρατείται στο υπόστρωμα του ηλεκτροδίου εργασίας μέσω ηλεκτροστατικών

αλληλεπιδράσεων, δεσμών υδρογόνου και ασθενών δυνάμεων Wan der Waals ή υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Η ακινητοποίηση γίνεται με την προσθήκη 10-15μL διαλύματος 1000μg/mL στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας και αφήνεται για 24h στους 4°C για να εξατμιστεί ο διαλύτης. Αφού περάσει το χρονικό διάστημα της εξάτμισης, στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας παρατηρείται ο σχηματισμός ενός λεπτού υμενίου. Για συγκριτικούς σκοπούς η CaM ακινητοποιήθηκε σε ηλεκτρόδια επίστρωσης με και δίχως τον μεταφορέα ηλεκτρονίων.

2.2.3 Ηλεκτροχημικός Χαρακτηρισμός

Αρχικά, με σκοπό να επιβεβαιωθεί η ακινητοποίηση της πρωτείνης στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας μελετήθηκαν τέσσερα διαφορετικά συστήματα ηλεκτροδίων: ένα σύστημα ηλεκτροδίων επίστρωσης που περιέχει τον μεταφορέα ηλεκτρονίων στο ηλεκτρόδιο εργασίας (SPE/CoPc), ένα σύστημα ηλεκτροδίων επίστρωσης που περιέχει τον μεταφορέα ηλεκτρονίων στο ηλεκτρόδιο εργασίας και στο οποίο έχει ακινητοποιηθεί η CaM (SPE/CoPc/CaM), ένα σύστημα ηλεκτροδίων επίστρωσης που δεν περιέχει τον μεταφορέα ηλεκτρονίων στο ηλεκτρόδιο εργασίας (SPE), και τέλος ένα σύστημα ηλεκτροδίων επίστρωσης που δεν περιέχει τον μεταφορέα ηλεκτρονίων στο ηλεκτρόδιο εργασίας αλλά έχει ακινητοποιηθεί η CaM (SPE/CaM).

Χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της χρονοαμπερομετρίας και με εφαρμοζόμενο δυναμικό -600mV, καταγράφηκε το ρεύμα υποβάθρου σε 10mM Tris-HCl (pH= 7.4) και αξιολογήθηκε η απόκριση παρουσία [Ca^{2+}]=0.1mM σε ταχύτητα ροής 1ml/min και για τα τέσσερα υπό μελέτη ηλεκτροχημικά συστήματα SPE/CoPc, SPE/CoPc/CaM,SPE,SPE/CaM. Στην Εικόνα παρατίθενται συγκεντρωτικά τα χρονοαμπερογραφήματα που προέκυψαν από τις μετρήσεις στις παραπάνω συνθήκες.



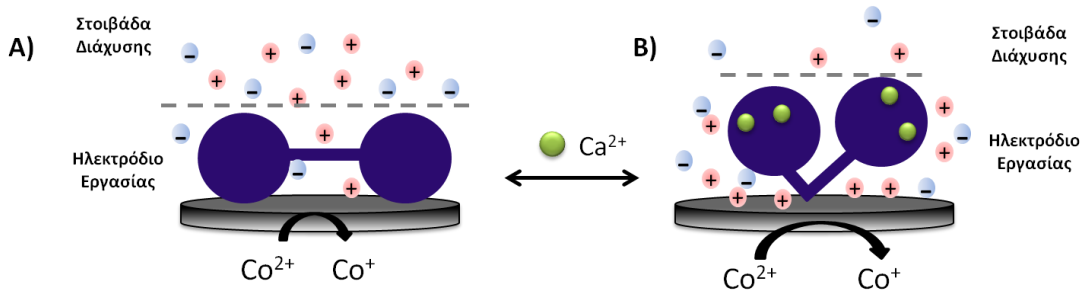
Εικόνα 2.5. Αμπερομετρική απόκριση των τεσσάρων υπό μελέτη ηλεκτροχημικών συστημάτων σε ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM Tris- HCl και σε [Ca^{2+}] 0.1mM σε εφαρμοζόμενο δυναμικό -600mV.

Σε κάθε ένα από τα τέσσερα υπό μελέτη ηλεκτροχημικά συστήματα σημειώνονται διαφορετικές τιμές ρεύματος υποβάθρου που οφείλονται στη διαφορετική αντίσταση που χαρακτηρίζει το κάθε σύστημα στη μεταφορά των φορτίων από τη φάση του ηλεκτρολύτη (ιοντική αγωγιμότητα) στην άλλη φάση (ηλεκτρονιακή αγωγιμότητα), διαμέσου της διεπιφάνειας ηλεκροδίου/ηλεκτρολύτη. Στο σύστημα SPE/CoPc παρατηρείται η μέγιστη τιμή ρεύματος υποβάθρου, το οποίο δικαιολογείται από την παρουσία του μεταφορέα ηλεκτρονίων (σύμπλοκο κοβαλτίου), ο οποίος διευκολύνει την άμεση και γρήγορη μεταφορά ηλεκτρονίων και φορτίων μέσω της αναγωγής του Co(II) σε Co(I) υπό την εφαρμογή δυναμικού -600mV. Αξιοσημείωτη ωστόσο είναι η μείωση του ρεύματος υποβάθρου σε 10mM Tris-HCl που παρατηρείται στο σύστημα SPE/CoPc/CaM σε σχέση με την αντίστοιχη τιμή του ρεύματος υποβάθρου για το σύστημα χωρίς την πρωτεΐνη SPE/CoPc. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει την ακινητοποίηση της πρωτεΐνης CaM, καθώς η παρατηρούμενη μειωμένη τιμή του ρεύματος υποβάθρου, οφείλεται στην μεγάλη αντίσταση του συστήματος για τη μεταφορά του φορτίου διαμέσου της διεπιφάνειας ηλεκροδίου/ηλεκτρολύτη. Η συγκεκριμένη παρατήρηση οδηγεί στο συμπέρασμα, ότι η προσθήκη της πρωτείνης CaM καλύπτει την επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας σχηματίζοντας μια διαφορετική διεπιφάνεια

ηλεκτροδίου/ηλεκτρολύτη από την αντίστοιχη στο SPE/CoPc σύστημα και καθιστά πιο δύσκολη την αναγωγή του Co(II) σε Co(I).

Ανάλογη τάση αλλά σε πολύ μικρότερο βαθμό παρατηρείται και για το αντίστοιχο ζεύγος συστημάτων SPE-SPE/CaM, γεγονός που οφείλεται στην απουσία του μεταφορέα ηλεκτρονίων. Στην επιφάνεια του SPE συστήματος, η οποία αποτελείται αποκλειστικά από γραφίτη με διάφορες λειτουργικές ομάδες (καρβοξυλικές, υδροξυλικές ομάδες,κλπ.), είναι δύσκολο να πραγματοποιηθεί κάποια αντίδραση μεταφοράς ηλεκτρονίων σε αυτήν την εφαρμοζόμενη τιμή δυναμικού, καθώς η αναγωγή του άνθρακα στον γραφίτη απαιτεί μεγάλες τιμές υπερδυναμικού (>1V) Για αυτό το λόγο τόσο οι τιμές του ρεύματος υποβάθρου του SPE όσο και του SPE/CaM συστήματος είναι μικρότερης έντασης σε σχέση με το SPE/CoPc σύστημα.

Επίσης κατά τη λήψη των παραπάνω χρονοαμπερογραφημάτων, σε χρονικό διάστημα περίπου 100 sec, έγινε εναλλαγή ροής του ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτρολύτη σε ρυθμιστικό διάλυμα ιόντων ασβεστίου με $[Ca^{2+}]$= 0.1mM και παρατηρήθηκε η απόκριση των τεσσάρων υπό μελέτη συστημάτων παρουσία των ιόντων ασβεστίου. Στο σύστημα του SPE/CoPc/CaM η παρουσία των ιόντων ασβεστίου που το διαπερνούν οδηγούν σε αύξηση της μετρούμενης έντασης του ρεύματος. Η πιο πιθανή εξήγηση που προτείνεται για αυτή την παρατήρηση είναι ότι παρουσία ιόντων ασβεστίου, η πρωτεΐνη που βρίσκεται προσροφημένη στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας αλλάζει στερεοδιάταξη ως αποτέλεσμα της δέσμευσης των ιόντων ασβεστίου, με τελικό αποτέλεσμα η ενεργή επιφάνεια του ηλεκτροδίου με τον μεταφορέα ηλεκτρονίων να βρίσκεται σε άμεση επαφή με τα ιόντα του διαλύματος και να καθίσταται πιο εύκολη η μεταφορά φορτίου μέσω της αναγωγής του Co(II) σε Co(I). Επομένως η επαγόμενη αναδίπλωση της πρωτεΐνης δημιουργεί οπές στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου, μειώνοντας τη συνολική αντίσταση μεταφοράς φορτίου του συστήματος (Εικόνα 2.6). Αντίθετα δεν παρατηρείται ανάλογη τάση τόσο στο σύστημα SPE/CoPc, όσο και στα δύο υπόλοιπα συστήματα των SPE και SPE/CaM.

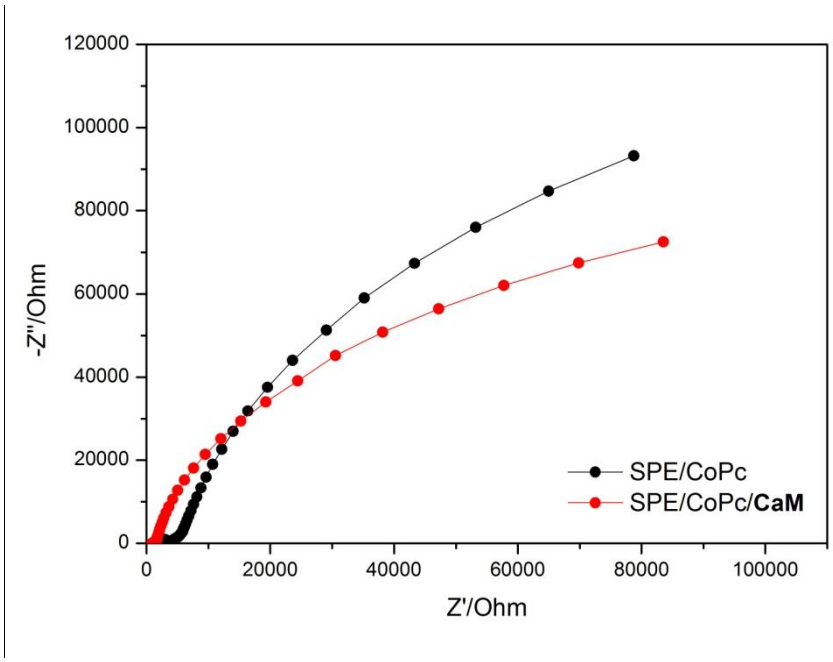


Εικόνα 2.6. Α) Η ανοιχτή μορφή της πρωτεΐνης CaM απουσία Ca^{2+}, ακινητοποιημένη στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας. Β) Η πρωτεΐνη CaM αλλάζει στερεοδιάταξη σε μια κλειστή μορφή κατόπιν δέσμευσης Ca^{2+} .

Αφού τα παραπάνω συμπεράσματα επιβεβαιώθηκαν επαναλαμβάνοντας το σχετικό πείραμα, το ενδιαφέρον και η μελέτη στράφηκε μόνο στα συστήματα ηλεκτροδίων που περιέχουν τον μεταφορέα ηλεκτρονίων SPE/CoPc και SPE/CoPc/CaM, καθώς απουσία του καθίσταται δύσκολη η παρατήρηση των διαφορών στο αναλυτικό σήμα.

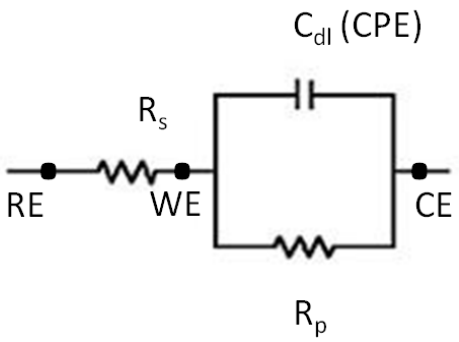
Στη συνέχεια, η μεταβολή στη συνολική αντίσταση των δύο συστημάτων SPE/CoPC και SPE/CoPc/CaM μελετήθηκε με χρήση της Φασματοσκοπίας Ηλεκτροχημικής Εμπέδησης (Electrochemical Impedance Spectroscopy, EIS). Η Φασματοσκοπία ηλεκτροχημικής εμπέδησης συνίσταται στη διαταραχή ενός συστήματος που βρίσκεται σε ισορροπία ή στατική κατάσταση, με την εφαρμογή ενός ημιτονοειδούς σήματος και στην ταυτόχρονη παρακολούθηση της χρονικής ή συχνοτικής απόκρισης του συστήματος ως προς το αίτιο της διαταραχής. Το βασικό πλεονέκτημα της EIS είναι η δυνατότητα προσομοίωσης του υπό μελέτη ηλεκτροχημικού συστήματος με ένα ισοδύναμο ηλεκτρικό κύκλωμα. Η διεπιφάνεια του ηλεκτροδίου που υφίσταται μια ηλεκτροχημική αντίδραση είναι τυπικά ανάλογη προς ένα ηλεκτρικό κύκλωμα το οποίο αποτελείται από ένα συγκεκριμένο συνδυασμό στοιχείων όπως αντιστάσεις, πυκνωτές και πηνία. Η θεωρία της EIS λοιπόν περιγράφει την απόκριση ενός κυκλώματος σε ένα σήμα εναλλασσόμενου ρεύματος ή δυναμικού ως συνάρτηση της συχνότητας. Με τη μέθοδο αυτή, προσδιορίζεται η εμπέδηση του υπό μελέτη συστήματος η οποία εκφράζει τη συνολική αντίσταση, όλων των στοιχείων του κυκλώματος, στην κίνηση των ηλεκτρονίων.

Η λήψη των φασμάτων εμπέδησης των συστημάτων SPE/CoPc και SPE/CoPc/CaM σε ρυθμιστικό διάλυμα 10mM Tris-HCl (pH=7.4) αντίστοιχα, πραγματοποιήθηκε υπό τη εφαρμογή πλάτους δυναμικού ±10mV και σε εύρος συχνοτήτων από 1MHz- 0.1mHz. Στην Εικόνα 2.7 παρουσιάζονται τα αντίστοιχα διαγράμματα Nyquist που προέκυψαν από τις παραπάνω μετρήσεις.



Εικόνα 2.7. Διαγράμματα Nyquist των συστημάτων SPE/CoPc και SPE/CoPc/CaM σε ρυθμιστικό διάλυμα 10mM Tris-HCl.

Ως ισοδύναμο ηλεκτρικό κύκλωμα για την προσομοίωση των δύο υπό μελέτη ηλεκτροχημικών κυκλωμάτων χρησιμοποιήθηκε το κύκλωμα Randles. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 2.8, το κύκλωμα Randles αποτελείται από μία αντίσταση R_s σε σειρά με ένα σύστημα πυκνωτή/αντίστασης σε παράλληλη σύνδεση. Η αντίσταση R_s εκφράζει την ωμική αντίσταση του διαλύματος μεταξύ των ηλεκτροδίων εργασίας (WE) και αναφοράς (RE). Η R_p, εκφράζει την αντίσταση πόλωσης, όταν οι μετρήσεις γίνονται απουσία οξειδοαναγωγικού ζεύγους στο διάλυμα. Τέλος, το στοιχείο C_{dl} (ή CPE) περιγράφει τη χωρητικότητα της ηλεκτρικής διπλοστοιβάδας.



Εικόνα 2.8. Κύκλωμα Randles. Τα WE, RE και CE αναφέρονται στα ηλεκτρόδια εργασίας αναφοράς και στο βοηθητικό ηλεκτρόδιο αντίστοιχα.

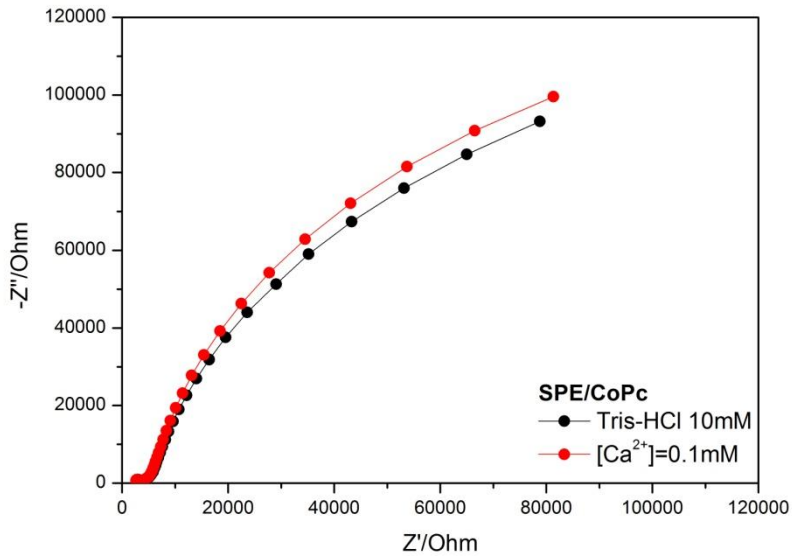
Από την προσομοίωση των δεδομένων από τα φάσματα εμπέδησης των δύο συστημάτων SPE/CoPc και SPE/CoPc/CaM στο κύκλωμα Randles που πραγματοποιήθηκε με τη χρήση κατάλληλου λογισμικού προσδιορίστηκαν οι τιμές των στοιχείων R_s, R_p και CPE για το κάθε σύστημα αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα της προσομοίωσης παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1. Αποτελέσματα προσομοίωσης μετρήσεων εμπέδησης των συστημάτων SPE/CoPc και SPE/CoPc/CaM σε κύκλωμα Randles.

Ηλεκτροχημικό Σύστημα	Αντίσταση πόλωσης $\mathbf{R_p}$ (MΩ)	Ωμική Αντίσταση διαλύματος $\mathbf{R_s}$ (mΩ)	Χωρητικότητα ηλ. Διπλοστοιβάδας **CPE** (μF)
SPE/CoPc	0.29	4.73	49
SPE/CoPc/CaM	0.35	2.49	52

Από τα αποτελέσματα της προσομοίωσης των μετρήσεων εμπέδησης των συστημάτων SPE/CoPc και SPE/CoPc/CaM, παρατηρείται αύξηση της αντίστασης πόλωσης του συστήματος SPE/CoPc/ CaM σε σχέση με την αντίστοιχη του συστήματος SPE/CoPc, γεγονός που επιβεβαιώνει τη δημιουργία μια διαφορετικής διεπιφάνειας ηλεκτροδίου/ ηλεκτρολύτη και συνεπώς την ακινητοποίηση της CaM στην επιφάνεια ηλεκτροδίου εργασίας. Επιπλέον η αυξημένη τιμή της αντίστασης πόλωσης του συστήματος SPE/CoPc/CaM συμφωνεί με την μείωση της έντασης του ρεύματος υποβάθρου που παρατηρήθηκε με τη μέθοδο της χρονοαμπερομετρίας.

Έπειτα πραγματοποιήθηκε λήψη των φασμάτων ηλεκτροχημικής εμπέδησης παρουσία ιόντων ασβεστίου με [Ca^{2+}]= 0.1 mM υπό τις ίδιες συνθήκες μέτρησης που χρησιμοποιήθηκαν και στην αντίστοιχη μέτρηση σε διάλυμα του ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτρολύτη για κάθε υπό μελέτη σύστημα, αντίστοιχα. Στην Εικόνα 2.9 παρουσιάζεται το διάγραμμα Nyquist για το σύστημα SPE/CoPc σε διάλυμα ηλεκτρολύτη και σε διάλυμα ιόντων ασβεστίου [Ca^{2+}]= 0.1 mM, ενώ στον Πίνακα 2 παρατίθενται τα αποτελέσματα της προσομοίωσης των δεδομένων μέτρησης στο ισοδύναμο ηλεκτρικό κύκλωμα Randles.



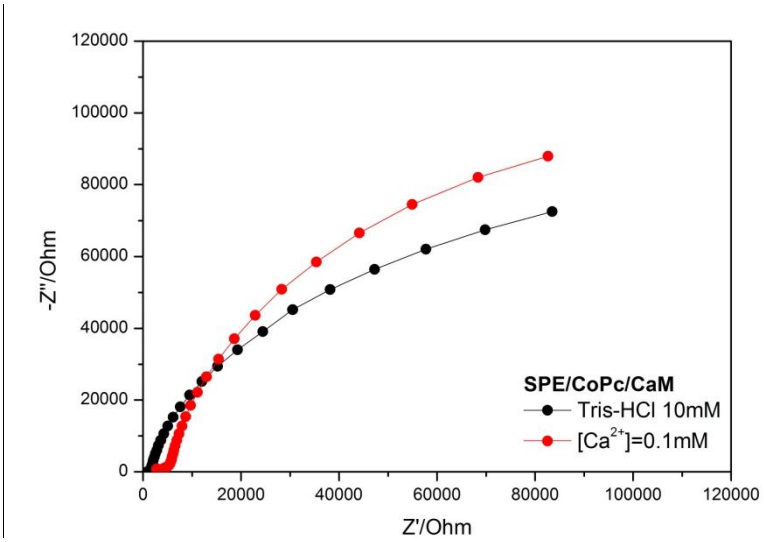
Εικόνα 2.9. Διάγραμμα Nyquist του συστήματος SPE/CoPc σε ρυθμιστικό διάλυμα 10mM Tris-HCl και [Ca^{2+}]= 0.1mM, αντίστοιχα.

Πίνακας 2. Αποτελέσματα προσομοίωσης σε κύκλωμα Randles των μετρήσεων εμπέδησης του συστήματος SPE/CoPc σε ρυθμιστικό διάλυμα 10mM Tris-HCl και [Ca^{2+}]= 0.1mM, αντίστοιχα.

SPE/CoPc	Αντίσταση πόλωσης $\mathbf{R_p}$ (MΩ)	Ωμική Αντίσταση διαλύματος $\mathbf{R_s}$ (mΩ)	Χωρητικότητα ηλ. Διπλοστοιβάδας **CPE** (μF)
Buffer Tris-HCl 10mM	0.29	4,73	49
[Ca^{2+}]=0.1mM	0.29	4.25	48

Από τα αποτελέσματα προσομοίωσης των δεδομένων μέτρησης της εμπέδησης του συστήματος SPE/CoPc σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτρολύτη Tris- HCl 10mM και σε διάλυμα ιόντων ασβεστίου με $[Ca^{2+}]$= 0.1mM αντίστοιχα, δεν παρατηρούνται σημαντικές αλλαγές στις τιμές των στοιχείων R_s, R_p και CPE. Επομένως, όπως αναμενόταν η παρουσία ιόντων ασβεστίου σε επίπεδο συγκέντρωσης $[Ca^{2+}]$= 0.1mM δεν προκαλεί διαταραχές στη διεπιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας.

Αντίστοιχα για το σύστημα SPE/CoPc/CaM, στην Εικόνα 2.10 παρουσιάζεται το διάγραμμα Nyquist σε διάλυμα ηλεκτρολύτη και σε διάλυμα ιόντων ασβεστίου $[Ca^{2+}]$= 0.1 mM, ενώ στον Πίνακα 3 που ακολουθεί παρατίθενται τα αποτελέσματα της προσομοίωσης των δεδομένων μέτρησης στο ισοδύναμο ηλεκτρικό κύκλωμα Randles.



Εικόνα 2.10. Διάγραμμα Nyquist του συστήματος SPE/CoPc σε ρυθμιστικό διάλυμα 10mM Tris-HCl και $[Ca^{2+}]$= 0.1mM, αντίστοιχα.

Πίνακας 3. Αποτελέσματα προσομοίωσης σε κύκλωμα Randles των μετρήσεων εμπέδησης του συστήματος SPE/CoPc σε ρυθμιστικό διάλυμα 10mM Tris-HCl και $[Ca^{2+}]$= 0.1mM, αντίστοιχα.

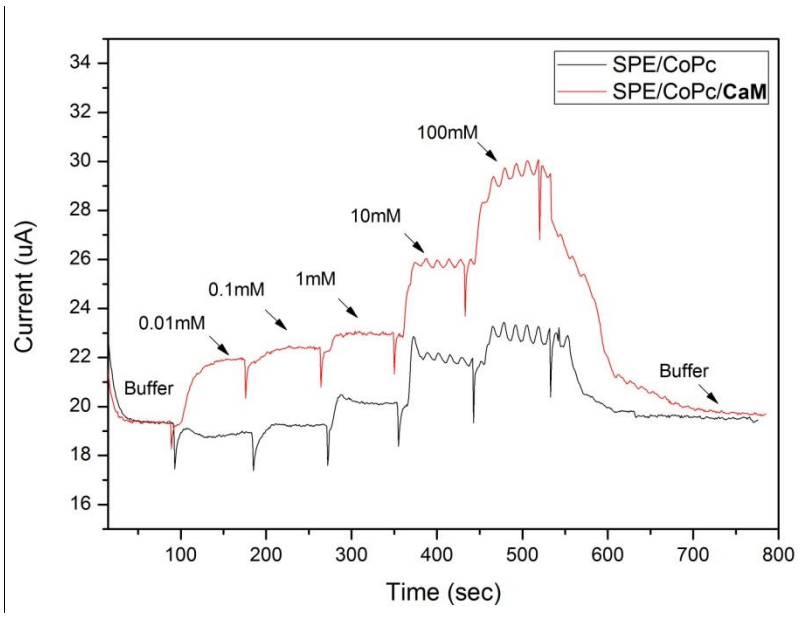
SPE/CoPc/CaM	Αντίσταση πόλωσης $\mathbf{R_p}$ (MΩ)	Ωμική Αντίσταση διαλύματος $\mathbf{R_s}$ (mΩ)	Χωρητικότητα ηλ. Διπλοστοιβάδας **CPE** (μF)
Buffer Tris-HCl 10mM	0.35	2.49	52
$[Ca^{2+}]$=0.1mM	0.24	4.39	58

Από τα αποτελέσματα προσομοίωσης των δεδομένων μέτρησης της εμπέδησης του συστήματος SPE/CoPc/CaM σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτρολύτη Tris- HCl 10mM και σε διάλυμα ιόντων ασβεστίου με [Ca^{2+}]= 0.1mM αντίστοιχα, αξιοσημείωτη είναι μείωση στη τιμή της αντίστασης πόλωσης R_p του συστήματος που παρατηρείται παρουσία ιόντων ασβεστίου. Η συγκεκριμένη αλλαγή επιβεβαιώνει τα αρχικά συμπεράσματα που είχαν εξαχθεί από την απόκριση του συστήματος παρουσία ιόντων ασβεστίου με τη μέθοδο της χρονοαμπερομετρίας. Η επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας στην οποία έχει ακινητοποιηθεί η πρωτεΐνη CaM, διαφοροποιείται ως αποτέλεσμα της αναδίπλωσης της πρωτεΐνης κατόπιν δέσμευσης των ιόντων Ca^{2+}, με αποτέλεσμα να δημιουργείται ελεύθερο χώρος στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας για την διάχυση των ιόντων σε αυτήν. Ταυτόχρονα οι αλλαγές στις τιμές των υπόλοιπων στοιχείων του κυκλώματος R_p και CPE οφείλονται επίσης στην διαφοροποίηση της επιφάνειας του ηλεκτροδίου εργασίας που φέρει την ακινητοποιημένη πρωτεΐνη.

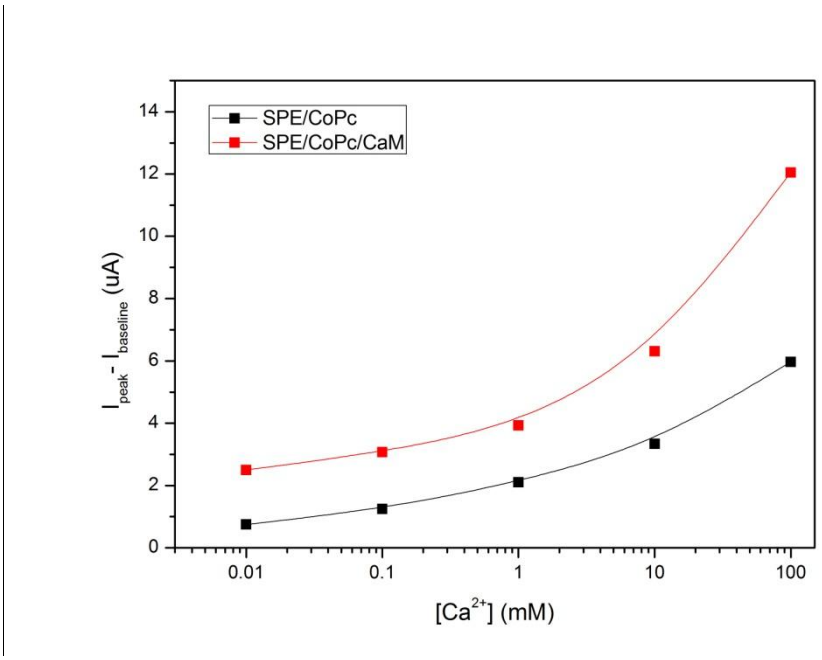
2.2.4 Έλεγχος Απόκρισης CaM- Βιοαισθητήρα

Με τα αποτελέσματα που εξάγονται τόσο με τη μέθοδο της φασματοσκοπίας ηλεκτροχημικής εμπέδησης όσο και με τη μέθοδο της χρονοαμπερομετρίας, συμπεραίνεται ότι η πρωτεΐνη δέσμευσης ασβεστίου CaM ακινητοποιείται στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας και παρατηρείται αλλαγή στο ρεύμα υποβάθρου (απουσία ιόντων Ca^{2+}) όταν η επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας έρχεται σε επαφή με ιόντα ασβεστίου. Βασιζόμενοι στα παραπάνω δεδομένα και χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της χρονοαμπερομετρίας, ακολούθησε έλεγχος της απόκρισης του συστήματος SPE/CoPc/CaM σε ένα εύρος συγκεντρώσεων ιόντων Ca^{2+} από 0.01mM έως 100mM υπό τη εφαρμογή δυναμικού E=-600mV και σε ταχύτητα ροής 1ml/min. Για συγκριτική μελέτη του συστήματος, πραγματοποιήθηκε έλεγχος και του συστήματος SPE/CoPc που δεν περιέχει πρωτεΐνη κάτω από τις ίδιες πειραματικές συνθήκες. Η αμπερομετρική απόκριση και η αντίστοιχες καμπύλες βαθμονόμησης που προκύπτουν για τα δύο υπό μελέτη συστήματα παρουσιάζονται στην Εικόνα 2.11 και στην Εικόνα 2.12, αντίστοιχα. Για την συγκριτική απεικόνιση

της αμπερομετρικής απόκρισης των δύο συστημάτων στα διαφορετικά επίπεδα συγκέντρωσης ιόντων Ca^{2+}, έχει γίνει διόρθωση του ρεύματος υποβάθρου στα αντίστοιχα γραφήματα, έτσι ώστε η τιμή της έντασης του ρεύματος στο ρυθμιστικό διάλυμα του ηλεκτρολύτη (10mM Tris-HCl) να είναι η ίδια και στα δύο συστήματα και να είναι δυνατόν να παρατηρηθούν οι απόλυτες διαφορές στο σήμα έπειτα από την προσθήκη των ιόντων Ca^{2+} .

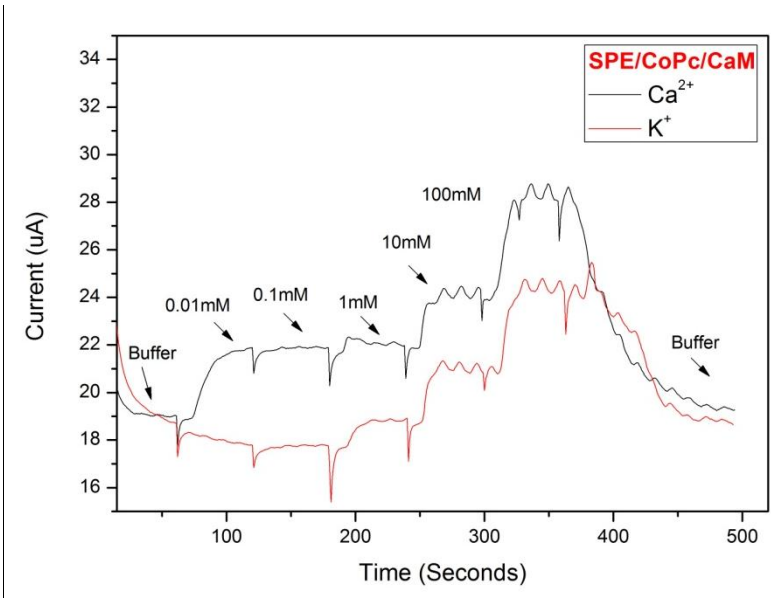


Εικόνα 2.11. Αμπερομετρική απόκριση των δύο υπό μελέτη συστημάτων SPE/CoPc και SPE/CoPc/CaM παρουσία ιόντων Ca^{2+}, με εφαρμοζόμενο δυναμικό E=-600mV.

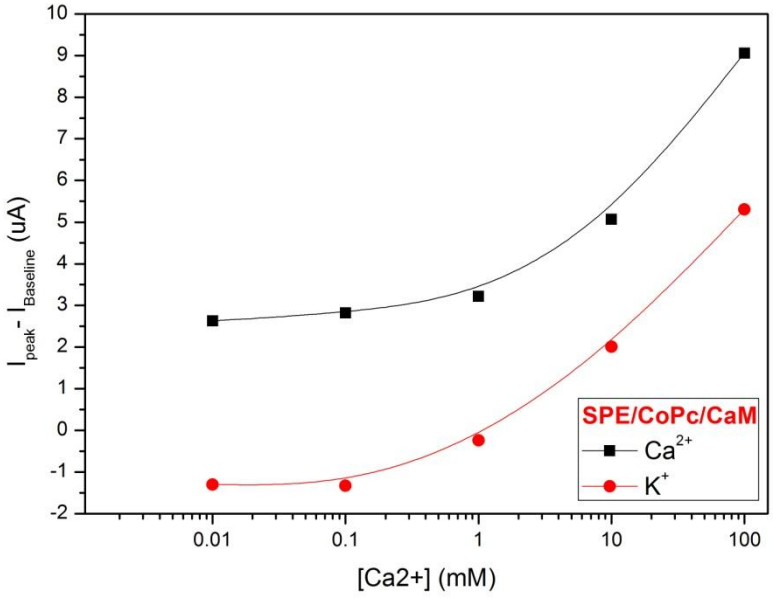


Εικόνα 2.12. Καμπύλη βαθμονόμησης των δύο υπό μελέτη συστημάτων SPE/CoPc και SPE/CoPc/CaM.

Στη συνέχεια, κάτω από τις ίδιες πειραματικές συνθήκες εξετάστηκε η αμπερομετρική απόκριση του συστήματος SPE/CoPc/CaM παρουσία ιόντων K^+ και συγκρίθηκε με την αντίστοιχη που λαμβάνεται παρουσία ιόντων Ca^{2+}, ώστε να επιβεβαιωθεί ότι απόκριση που παρατηρείται με την προσθήκη των ιόντων Ca^{2+}, οφείλεται σε επιλεκτική δέσμευση των ιόντων Ca^{2+} στο υπόστρωμα της πρωτεΐνης. Η αμπερομετρική απόκριση και η καμπύλη βαθμονόμησης που προκύπτει σε ιόντα K^+ και σε ιόντα Ca^{2+}, παρουσιάζονται στην Εικόνα 2.13 και 2.14, αντίστοιχα.

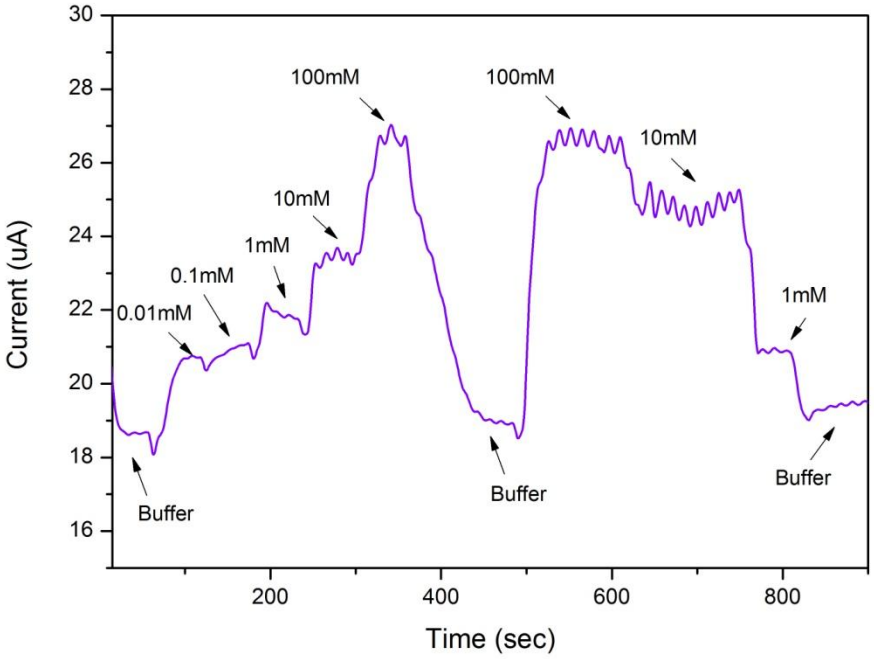


Εικόνα 2.13. Σύγκριση αμπερομετρικής απόκρισης του συστήματος SPE/CoPc/CaM παρουσία ιόντων Ca^{2+} και ιόντων K^+, αντίστοιχα.



Εικόνα 2.14. Καμπύλη βαθμονόμησης του συστήματος SPE/CoPc/CaM παρουσία ιόντων Ca^{2+} και ιόντων K^+, αντίστοιχα.

Από τις μετρήσεις της αμπερομετρικής απόκρισης του συστήματος SPE/CoPc/CaM παρουσία διαφορετικών επιπέδων συγκεντρώσης ιόντων Ca^{2+}, έχει παρατηρηθεί ότι μόλις το σύστημα διαρρέεται με ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτρολύτη (10mM Tris-HCl, pH=7.4) αμέσως μετά την προσθήκη των αντίστοιχων διαλυμάτων Ca^{2+}, το σήμα υποβάθρου επιστρέφει στην αρχική τιμή που έχει καταγραφεί πριν την καμπύλη βαθμονόμησης. Αυτό οδήγησε σε μια πρώτη εκτίμηση αντιστρεπτής δέσμευσης Ca^{2+}, με αποτέλεσμα την αναγέννηση της επιφάνειας του ηλεκτροδίου εργασίας που φέρει την ακινητοποιημένη πρωτεΐνη. Η παρατήρηση αυτή εξετάστηκε με την πραγματοποίηση συνεχόμενων καμπυλών βαθμονόμησης στο ίδιο σύστημα. Η αμπερομετρική απόκριση του συστήματος SPE/CoPc/CaM που λαμβάνεται ύστερα από δύο συνεχόμενες καμπύλες βαθμονόμησης σε εφαρμοζόμενο δυναμικό E=-600mV και ταχύτητα ροής των διαλυμάτων 1ml/min, παρουσιάζεται στην Εικόνα 2.15.



Εικόνα 2.15. Αντιστρεπτή δέσμευση Ca^{2+} στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας του ηλεκτροχημικού συστήματος SPE/CoPc/CaM.

2.3 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία εξετάστηκε ένας μηχανισμός ανίχνευσης ιόντων ασβεστίου με την ανάπτυξη μιας βιοενεργής διεπιφάνειας βασισμένης στην αναδιπλούμενη πρωτεΐνη δέσμευσης ασβεστίου, την ασβεστιοτροποποιητίνη (Calmodoulin, CaM). Για την ανάπτυξη της μεθόδου χρησιμοποιήθηκαν ηλεκτροχημικά συστήματα τριών ηλεκτροδίων επίστρωσης (SPE/CoPc), εκ των οποίων το ηλεκτρόδιο εργασίας αποτελείται από μια πορώδη επίπεδη επιφάνεια γραφίτη εμποτισμένη με το οξειδοαναγωγικό σύμπλοκο του κοβαλτίου-φθαλοκυανίνης (Cobalt(II)-phthalocyanine, CoPc) ως μεταφορέα ηλεκτρονίων. Η ακινητοποίηση της πρωτεΐνης στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας πραγματοποιείται μέσω του απλού μηχανισμού της φυσικής προσρόφησης.

Για την ανάπτυξη της μεθόδου, πραγματοποιείται συγκριτική μελέτη μεταξύ του συστήματος ηλεκτροδίων επίστρωσης στο οποίο δεν έχει ακινητοποιηθεί η πρωτεΐνη (SPE/CoPc) και του συστήματος ηλεκτροδίων επίστρωσης στου οποίου η επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας φέρει την ακινητοποιημένη πρωτεΐνη (SPE/CoPc/CaM). Η μελέτη και σύγκριση των ηλεκτροχημικών ιδιοτήτων των παραπάνω συστημάτων απουσία και παρουσία ιόντων Ca^{2+}, λαμβάνουν χώρα κυρίως με τη χρήση των ηλεκτροχημικών τεχνικών της χρονοαμπερομετρίας και της φασματοσκοπίας ηλεκτροχημικής εμπέδησης.

Από τα αποτελέσματα που λαμβάνονται με τη μέθοδο της χρονοαμπερομετρίας, παρατηρείται ότι απουσία ιόντων ασβεστίου Ca^{2+}, η ακινητοποίηση της CaM προκαλεί σημαντική μείωση του ρεύματος υποβάθρου σε σχέση με την αντίστοιχη τιμή που λαμβάνεται από το σύστημα SPE/CoPc. Η παρατήρηση αυτή οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η παρουσία της CaM προκαλεί μεγάλη αύξηση της συνολικής αντίστασης μεταφοράς φορτίου του συστήματος, καθώς η ακινητοποίησή της στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας δεν επιτρέπει την άμεση επαφή του μεταφορέα ηλεκτρονίων CoPc με το διάλυμα του ηλεκτρολύτη και συνεπώς την αποτελεσματική αναγωγή του Co(II) σε Co(I). Το παραπάνω συμπέρασμα, επιβεβαιώθηκε μετρώντας την εμπέδηση των δύο υπό μελέτη συστημάτων με τη χρήση της φασματοσκοπίας ηλεκτροχημικής εμπέδησης, από την οποία

προσδιορίστηκε ότι το σύστημα SPE/CoPc/CaM παρουσιάζει μεγαλύτερη αντίσταση πόλωσης σε σχέση με το SPE/CoPc σύστημα.

Στη συνέχεια μελετώντας την αμπερομετρική απόκριση των δύο συστημάτων παρουσία διαφορετικών επιπέδων συγκέντρωσης ιόντων Ca^{2+}, αξιοσημείωτη ήταν η αύξηση του ρεύματος υποβάθρου και συνεπώς η μείωση της αντίστασης μεταφοράς φορτίου του συστήματος SPE/CoPc/CaM έναντι του SPE/CoPc. Η παρατήρηση αυτή οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η διεπιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας του SPE/CoPc/CaM συστήματος μορφοποιείται ως συνέπεια της αναδίπλωσης της πρωτεΐνης από τη δέσμευση των ιόντων Ca^{2+}, δημιουργώντας ελεύθερο χώρο (οπές) στην επιφάνεια. Με αυτόν τον τρόπο ο μεταφορέας ηλεκτρονίων έρχεται σε άμεση επαφή με το διάλυμα του ηλεκτρολύτη και διευκολύνεται η αναγωγή του Co(II) σε Co(I). Ωστόσο δεν παρατηρείται ανάλογη τάση για το σύστημα SPE/CoPc παρουσία ιόντων ασβεστίου. Επίσης, η προσθήκη ιόντων K^{+} στο ηλεκτροχημικό σύστημα SPE/CoPc/CaM δεν προκαλεί αλλαγή στην αμπερομετρική απόκρισή του, το οποίο επιβεβαιώνει την επιλεκτική δέσμευση των ιόντων Ca^{2+} στην πρωτεΐνη.

Ταυτόχρονα, διαπιστώθηκε ότι η ροή διαλύματος ηλεκτρολύτη μετά από τις προσθήκες Ca^{2+} οδηγεί σε επιστροφή του ρεύματος υποβάθρου στην αρχική τιμή οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι η δέσμευση Ca^{2+} πραγματοποιείται με αντιστρεπτό τρόπο, δίνοντας με αυτό τον τρόπο την δυνατότητα αναγέννησης της επιφάνειας του βιοαισθητήρα και της επαναλαμβανόμενης χρήσης του. Ωστόσο απαιτείται περαιτέρω μελέτη της αμπερομετρικής απόκρισης του βιοαισθητήρα σε μικρότερο εύρος συγκεντρώσεων ιόντων Ca^{2+}, που αναμένεται να δώσει τη δυνατότητα εξαγωγής συμπερασμάτων σχετικά με τα θερμοδυναμικά ή κινητικά δεδομένα της δέσμευσης ή αποδέσμευσης του υποκαταστάτη στην πρωτεΐνη.

Συνοψίζοντας στην εργασία αυτή προτείνεται μια νέα μέθοδος ανάπτυξης απλών και άμεσων συστημάτων βιοαισθητήρων αξιοποιώντας τις επαγόμενες στεροδομικές αλλαγές ενός ευρέως φάσματος αναδιπλούμενων πρωτεϊνών δέσμευσης κατά την επιλεκτική δέσμευση του υποκαταστάτη τους. Η ανάπτυξη των συγκεκριμένων συστημάτων απαιτεί αυστηρό έλεγχο και γνώση όλων των

ηλεκτροχημικών παραμέτρων που καθορίζουν την αναλυτική απόδοσή τους. Εξασφαλίζοντας το παραπάνω, τα νέα αυτά συστήματα υπόσχονται να οδηγήσουν στην ανάπτυξη μιας νέας γενιάς βιοαισθητήρων, που θα πλεονεκτούν έναντι των αντίστοιχων ενζυμικών βιοαισθητήρων, κυρίως λόγω του απλού τρόπου κατασκευή τους και της άμεσης ανίχνευσης αναλυτών για εφαρμογή τους σε ιατρικές και περιβαλλοντικές μελέτες, αναλύσεις τροφίμων κ.α.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Clark L. C., Lyons C., Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1962, 102,29.

2. Clark L. C., Monitor and control of blood and tissue O_2 tensions. Trans Am. Soc. Artif. Intern. Organs, 1956, 2,41.

3. IUPAC Compendium of Chemical Terminology 2nd Edition (1997) http://www.iupac.org/goldbook/B0063.pdf.

4. Therenot D. R., Toth K., Durst R. A., Wilson G. S., Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification, Pure Appl. Chem, 1999, 71, 2333.

5. Byfield M.P., Abuknesha. R. A., Biochemical aspects of biosensors, Biosens. Bioelectron, 1994, 60, 373.

6. Colllings A. F., Carnso F., Biosensors: recent advances, Rep. Prog. Phys., 1997, 60, 1397.

7. Rogers K. R., Mulchandani A., Affinity Biosensors Techniques and Protocols, Methods in Biotechnology, Humana Press, Totowa, New Jersey, 1998.

8. Eggins B., Chemical sensors and biosensors, Analytical Techniques in the Sciences, John Wiley & Sons, West Sussex,2002.

9. Scheller F., et al, Second generation biosensors, Biosens. Bioelectron. 1991, 6,245

10. Chaubey A., Malhorta B. D., Mediated biosensors. Biosens. Bioelectron. 2002, 17, 441.

11. Gorton L., Lindgren A., Larsson T., Munteanu F.D., Ruzgas T., Gazaryan I., Direct electron transfer between heme- containing enzymes and electrodes as basis for third generation biosensors. Anal. Chim. Acta, 1999, 400,91L.

12. Lotzbeyer T., Schumann W., Schimdt H.L. Minizymes. A new strategy for the development of reagentless amperometric biosensors based on direct electron transfer processes. Biosens. Bioelectron. 1997,12,1.

13. De Wolf F. A., Brett G. M., Ligand- Binding Proteins: Their potential for application in systems for controlled delivery and uptake of ligands, Pharmacological Reviews, 2000,52,2, 207-236.

14. Perutz M., Mechanisms of cooperativity and allosteric regulation in proteins (Cambridge Univ. Press, Cambridge, 1990).

15. Gerstein M., Lesk A.M., Chothia C., Structural mechanisms for domain movements in protein, Biochemistry, 1994, 33, 22.

16. Dixon M.M., Nicholson H., Shenchuk L., Bease W.A., Matthews B. W., J. Mol. Biol. 1992, 227,917.

17. Gerstein M., Chothia C.H., J. Mol. Biol., 1991, 220, 133.

18. Gerstein ., Lesk A. M., Baker E.N., Anderson B., Norris G., Chothia C., J. Mol. Biol. 1993b, 234, 357.

19. Jenny J. Yang et al, Calciomics: integrative studies of Ca^{2+}- binding proteins and their interactomes in biological systems, Metallomics, 2013, 5, 29-42.

20. Kumar S. et al, Flexibility of Ef-hands motifs: structural and thermodynamic studies of calcium binding Protein-1 from Entamobea histolytica with Pb^{2+}, Ba^{2+} and Sr^{2+}, BMC, Biophisics, 2012,5:15.

21. Deuscle K., Okumoto S., Fehr M., Looger L. L., Kozhurk L. & Frommer W. B., Construction and optimization of a family of genetically encoded metabolite sensors by semirational protein engineering. Protein science: a publication of the Protein Society, 2005, Vol. 14, No 9.

22. Stratton M. M. & Loh S.N. Converting a protein into a switch for biosensing and functional regulation Protein Science, 2011, ISSN 0961-8368, 19-29.

23. Dwyer M. A. & Hellinga H. W. Periplasmic binding proteins: a versatile superfamily for protein engineering. Current Opinion in Structural Biology, August 2004, Vol. 14, 495-504.

24. Tolosa L., On the design of low cost fluorescent protein biosensors. Advances in biochemical engineering/biotechnology, 2010, Vol. 116, 143-157.

25. Gilardi G., Zhou L. Q., Hibbert L., Cass AEG: Engineering the maltose binding protein for reagentless fluorescence sensing, Anal. Chem. 1994, 66: 3840-3847.

26. Tolosa L., Gryczynski i., Eichhorn L. R., Dattelbaum J. D., Castellano F. N., Rao G., Lakowicz J. R. Glucose sensor for low cost lifetime- based sensing using a genetically engineered protein. Anal. Biochem. 1999, 267: 114-120.

27. De Lorimier R. M., Smith J. J.,Dwyer M. A., Looger L. L., Sali K.M., Paavola C. D., Rizk S. S., Sadigov S., Conrod D. W., Loew L. et al, Construction of a fluorescent biosensor family. Protein Sci., 2001, 11: 2655-2675.

28. Sharff A. J., Rodseth L.E., Spurlino J. C., Quiocho F. A. Crystallographic evidence of a large ligand- induced hinge- twist motion between the two domains of the

maltodextrin binding protein involved in active transport and chemotaxis, Biochemistry 31, 1992, 10657-10663.

29. gilardi G., Zhou L.Q., Hibbert L., Cass A. E. Engineering te maltose binding protein for reagentless fluorescence sensing, Anal. Chem., 1994 66,3840-3847.

30. Marvin J. S., Corcoran E. E. Hattangardi N. A., Zhang J. V., Gere S. A., Hellinga H. W. The rational design of allosteric interactions in a monomeric protein and its applications to the construction of biosensors, Proc. Natl. Sci. 1997, 94, 4366- 4371.

31. Fehr M., Frommer W. B., Lalounde S. Visualization of maltose uptake in living yeast cells by fluorescent nanosensors, Proc. Natl Acad Sci. USA 2002, 99: 9846-9851.

32. Miyawaki A. Griesbeck O., Heim R., Tsien R. Y. Dynamic and quantitative Ca^{2+} measurements using improved Cameleons, Proc Natl Acad Sci USA 1999, 96, 15: 2135-40.

33. Miyawaki A. Llopis J., Heim R., McCaffery J. M., Adams J. A., Ikura M., Tsien R. Y. Fluorescent indicators for Ca^{2+} based on green fluorescent proteins and calmodulin, Nature, 1997, 388, 6645:882-7.

34. Benson E.D., Conrad w. D., de Lorimier M. R., Tranmell S. A., Hellinga H. W. Design of bioelectronic interfaces by exploiting hinge-binding motions in proteins, Science,2001,293,1641.

35. Caro C. A., Bedioni F., Zagal H. J. Electrocatalytic oxidation of nitrite on a vitreous carbon electrode modified with cobalt phthalocyanine, Electrochimica, 2002, 47,9, 1489-1494.

36. Tanaka A. A., dos Santos J. R. Electrocatalytic activity of metal phthalocyanines for oxygen reduction. J. Electrochem. Chem. 1990, 339,13-30.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Αντιδραστήρια

Η ασβεστιοτροποποιητίνη αγοράστηκε από την εταιρία Sigma Aldrich (Calmodulin from bovine testes: Bioultra, ≥ 98%, lyophilized powder, ≥ 40000 units/mg protein, 10KU). Το αντιδραστήριο για την παρασκευή του ρυθμιστικού διαλύματος του Tris-HCl αγοράστηκε από την εταιρία Sigma Aldrich και τα άλατα $CaCl_2$ και KCl από την Merck.

Για την παρασκευή όλων των διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκε δις- απιονισμένο νερό (18MΩ, EASY pure model D7033, Barnstead).

Οργανολογία

Τα ηλεκτρόδια επίστρωσης που χρησιμοποιήθηκαν με ή χωρίς τον μεταφορέα ηλεκτρονίων αγοράστηκαν από την Gwent Electronic Materials Ltd (Gwent, Wales, UK). Ο έλεγχος της ταχύτητας ροής των διαλυμάτων στο ηλεκτροχημικό κελί πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της περισταλτικής αντλίας υψηλής ακρίβειας της εταιρείας ISMATEC (IPC High Precision Multichannel Dispenser). Όλες οι αμπερομετρικές μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τον ποτενσιοστάτη UieChem της εταιρίας Uniscan Instruments Ltd ενώ για φασματοσκοπικές μετρήσεις ηλεκτροχημικής εμπέδησης πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του ποτενσιοστάτη Autolab PGSTAT 30.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Όνομα: Μαρία

Επώνυμο: Τσεμπερούλη

Ημερομηνία Γεννήσεως: 18 Νοεμβρίου 1988

Οικογενειακή κατάσταση: Άγαμη

Ηλεκτρον. διεύθυνση: mtsemperouli@gmail.com

Τηλέφωνο επικοινωνίας: +306939428143

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

Σεπτέμβριος 2012- έως τώρα

Μεταπτυχιακές σπουδές στο Γενικό Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης, στον τομέα της Αναλυτικής Χημείας με επιβλέποντα καθηγητή τον κ. Νικόλαο Χανιωτάκη .

2008-2012

Πτυχίο Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης, με βαθμό πτυχίου 6,94 .

Οκτώβριος 2011- Ιούνιος 2012

Διπλωματική εργασία με θέμα, « *Χρήση Νανοϊνών Άνθρακα ως Πληρωτικό Υλικό σε Στήλες Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC) για Εφαρμογή σε Διαχωρισμό Νανοτελειών Άνθρακα* », στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας στο Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης, με επιβλέποντα καθηγητή τον κ. Νικόλαο Χανιωτάκη.

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΡΙΑ

1/01/2013- έως τώρα

Σύμβαση έργου ως χημικός στο επιστημονικό πρόγραμμα INTERREG με τίτλο, « *HYDROFLIES: Ορθολογική Διαχείρηση Βιοτικών και Αβιοτικών Παραμέτρων σε Υδροπονική Καλλιέργεια Τομάτας και Μαρουλιού* » με επιστημονικό υπεύθυνο τον κ. Νικόλαο Χανιωτάκη.

1/03/2013 – 15/03/2014

Συμμετοχή ως χημικός στο επιστημονικό πρόγραμμα Bilateral με τίτλο « *Ανάπτυξη Εμφυτεύσιμων Βιο- αισθητήρων για την Παρακολούθηση Νευροδιαβιβαστών, με Σύνθετα Ηλεκτροχημικά Παραγόμενα Πολυμερή Υμένια Συζευγμένα με Νανοδομές Πορώδους 'Ανθρακα / CarPolsense* » με επιστημονικό υπεύθυνο τον κ. Νικόλαο Χανιωτάκη.

1/07/2011- 30/09/2011

Πρακτική Άσκηση στο Εργαστήριο Ελέγχου Ποιότητας στη CBL Patras (Χημικά και Βιοφαρμακευτικά Εργαστήρια) με υπεύθυνο την κ. Χ. Τζαβάρα.

ΔΙΔΑΚΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

19/02/2014 – 30/05/2014

Εργαστηριακός βοηθός στα προπτυχιακά Εργαστήρια Αναλυτικής Χημείας Ι του Τμήματος Χημείας, του Πανεπιστημίου Κρήτης.

7/10/2013-30/01/2014

Βοηθός στο προπτυχιακό μάθημα 'Αναλυτική Χημεία Ι' με επιβλέποντα καθηγητή τον κ. Νικόλαο Χανιωτάκη.

1/02/2013 -30/05/2013

Εργαστηριακός βοηθός στα προπτυχιακά Εργαστήρια Αναλυτικής Χημείας Ι του Τμήματος Χημείας, του Πανεπιστημίου Κρήτης.

ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΓΝΩΣΕΙΣ

- Ηλεκτροαναλυτικές τεχνικές (ποτενσιομετρία, αμπερομετρία, κατασκευή και ανάπτυξη βιοαισθητήρων και επιλεκτικών ηλεκτροδίων)
- Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC)
- Αέρια Χρωματογραφία (GC)
- Φασματοσκοπία IR
- Φασματοσκοπία RAMAN

ΓΕΝΙΚΕΣ ΓΝΩΣΕΙΣ

- **2005**:Diplôme d' Études en Langue Française (DELF), 1er Degré
- Καλή γνώση της αγγλικής γλώσσας.
- Πολύ καλή χρήση Η/Υ.

ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ

Νοέμβριος 2012

Σεμινάριο Μετρολογίας στη Χημεία στα πλαίσια του Ευρωπαϊκού Προγράμματος Trainmic για την επικύρωση αναλυτικών μεθόδων κατά ISO 17025.

Απρίλιος 2013

Σεμινάριο Αέριας Χρωματογραφίας-Φασματοσκοπία Μάζας της Ένωσης Ελλήνων Χημικών Περιφερειακού Τμήματος Κρήτης

Tsemperouli Maria

Chemist

Laboratory of Analytical Chemistry, Department of Chemistry, University of Crete, Greece

Address: Vassilika Vouton 71003, Heraklion – Crete Greece

Tel: +30 2810 545016, Fax: +30 2810 545165

Mobile: +306939428143

e-mail address: mtsemperouli@gmail.com

Professional Education

Department of Chemistry, University of Crete, Iraklion Crete, Greece

Advisor: Professor Nikolaos Chaniotakis

Master of Science in Analytical Chemistry (November 2012- present). Thesis Title: '*Development of Amperometric Reagentless Biosensors Based on Hinge- Motion Binding Proteins'*. Research focuses on the development of new reagentless electrochemical hybrid interfaces based on ligand binding proteins and carbon nanostructures in order to study the interactions upon the addition of their specific ligand.

Courses Completed: Analytical Environmental Chemistry I, Spectroscopy, Computational Study of Molecules and Nano-materials, Infra Red and Raman Spectroscopy, Electrochemistry, Biological Membrane Systems- Applications in Pharmaceutical Chemistry.

Department of Chemistry, University of Crete, Iraklion Crete, Greece

Bachelor of Science in Chemistry, November 2012. Diploma thesis in the Laboratory of Analytical Chemistry under the supervision of Professor Nikolaos Chaniotakis. Diploma thesis title: "Carbon Nanofibers as Packing Material in HPLC columns for the Separation of Carbon Nanodots (C-dots).

GPA: 6.94 (out of 10.0)

Work Experience

Department of Chemistry, University of Crete, Iraklion Crete, Greece

Researcher in INTERREG Development Programm. (January 2013- present)

Programm Title: '*Rational Management of Biotic and Abiotic Parameters in Hydroponic Cultivation of Tomato and Lettuce' (*K3_01_03 on 15/10/2012 at Inter-Border Cooperation Programme between Greece- Cyprus 2007-2013).

Department of Chemistry, University of Crete, Iraklion Crete, Greece

Participation as Researcher in BILATERAL Research Programm. (March 2013 – March 2014) Programm Title: '*Development of implantable bio-sensors for neurotransmitters evaluation, based on electrochemically coated conjugated polymer composites on carbon nano-porous structures / CarPolsens'.*

CBL Patras S.A (Chemical and Biopharmaceutical Laboratories), Patras, Greece

Chemist in the Laboratory of Quality Control, as part of Industrial Training Placement. (July-September 2011)

Duties included daily testing of pharmaceutical products (resins, aminoacids, etc.) and recording results for Quality Control via HPLC, GC, IR spectroscopy, Karl Fischer and other analytical techniques.

Teaching Experience

Department of Chemistry, University of Crete, Iraklion Crete, Greece

Analytical Chemistry I. Teaching Assistant.

Prepared teaching materials including problem sets and exams. Assisted udergraduated students with home-work problems or material they found difficult to understand. (October 2013- January 2014)

Department of Chemistry, University of Crete, Iraklion Crete, Greece

Laboratory of Analytical Chemistry I. Teaching Assistant.

Supervised and assisted undergraduated students in electrochemical techniques including polarography method, ion selective electrodes, etc. (February- May 2013, February- May 2014

Technical Skills and Qualifications

- Familiar with a lot analytical systems, procedures and instruments, including NMR spectroscopy, RAMAN microscopy, FTIR Spectroscopy, UV-Vis and fluorescence spectroscopy, ICP-MS, HPLC, GC.
- Specialized at electroanalytical techniques, biosensors design and development.
- Computer Software: Windows 7, 8, Microsoft office, Omnic

Languages

- French: Speaking and writting (**2005:** Diplôme D' Ètudes en Langue Française (DELF), 1er Degreé)
- English: Speaking and writing

Seminars

- Metrology Seminar in Chemistry in the framework of the European Program "Trainmic" for the validation of analytical methods, ISO 17025
- Seminar in Gas Chromatography- Mass Spectroscopy of the Association of Greek Chemist.