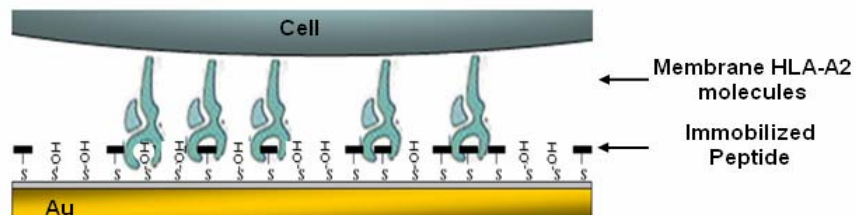


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ – ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΩΝ



Ακίνητοποίηση καρκινικών πεπτιδικών
επίτοπων σε επιφάνεια βιοαισθητήρα:
μελέτη της αλληλεπίδρασης των HLA-A2
μορίων με το ακίνητοποιημένο στην
επιφάνεια πεπτίδιο χρησιμοποιώντας
ολόκληρα κύτταρα



ΕΥΘΥΜΙΟΣ ΚΑΠΕΛΛΙΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΓΚΙΖΕΛΗ ΗΛΕΚΤΡΑ

Διμελής επιτροπή : Γκιζελή Η.
Χανιωτάκης Ν.

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2007

ΕΧΘΡΟΣ ΤΟΥ ΚΑΛΟΥ ΕΙΝΑΙ ΤΟ ΚΑΛΥΤΕΡΟ

**Στην οικογένεια μου
και την Σόνια**

ABSTRACT:

The focus of this work was the development of a peptide-specific biorecognition surface based on self-assemble monolayers (SAMs) on gold containing mixtures of hydroxyl and carboxyl terminated alkanethiols. This surface was used for the detection of whole cell bound receptor/peptide interaction. The receptor/peptide pair was the membrane-bound HLA-A2 molecule and the antigenic nine amino-acid peptide (RLLCETELV), respectively. The detection of the binding was measured with different types of biosensors based on optical and acoustic waves. Results demonstrated specific interaction between HLA-A2 molecules/surface-immobilized peptide, and some degree of no specific binding of the cells to the surface.

Biosensors are devices that combine a biochemical recognition element (ligand) with a signal conversion unit (transducer). Biosensors are mostly designed for routine analysis, such as clinical diagnosis, quality control of food, in-process control of fermentations, in environmental analysis and pharmaceuticals industry. Biosensors are used for the investigation of the interaction between proteins and biological elements in a routine basis. However, there are only few references about biosensors that can detect whole cells/ligand interactions. In this study, we tried to develop a biorecognition surface for the investigation of the interaction between HLA-A2 molecules attached on whole cells membrane, and the nine amino-acid peptide RLLCETELV, a tumor peptide epitope with an amino acid substitution (Q to C) to allow immobilization via the cysteine residue. HLA-A2 molecules belong to Class I major histocompatibility Complex (MHC) proteins which play a major role in antigen presentation and regulation of immune responses. Their function is to present short antigenic peptides (8-11 residues), derived from viral or altered proteins, to T lymphocytes. Two types of biosensors were used for detecting cells binding; one optical system based on surface plasmon resonance (SPR) and two acoustic biosensors (SAW, QCM). These techniques can measure biomolecular interactions in real-time in a label free environment. SPR direct detection is based on the difference in refractive index between water and biological molecules. The detection of acoustic biosensors is related to the velocity and energy of the wave in the sensing

medium. In the case of Surface Acoustic Device (SAW), velocity and energy changes are measured as phase and amplitude, respectively⁴. In the case of Quartz Crystal Microbalance (QCM) the above are recorded as frequency and dissipation. Self-assembled monolayers (SAMs) containing mixtures of hydroxyl and carboxyl terminated alkanethiols were deposited on the gold-coated sensors surface and subsequently were used to produce an active surface for the covalent immobilization of the peptides⁶. Cells were added under flow above the surface and the interaction between HLA-A2 molecules and peptide was measured in real time through monitoring of the biosensor signal.

SPR experiments demonstrated that the cells caused large changes in the refractive index in positive as well as in negative experiments. This did not allow the estimation of the interaction of HLA-A2 molecules with the peptide because of the bulk effect of the cell mass. QCM positives and negatives experiments, displayed similar kinetic pattern. However the negatives caused lower signal change (50%). This difference could be correlated with the HLA-A2 molecules/peptide interaction. In addition, at negative control experiments, there is no further change in frequency and in dissipation energy after the injection of the loading buffer, indicating that the interaction of HLA-A2 molecules with the peptides could lead to cell adhesion. The SAW device, could be appropriate for the detection due to the fact that it could sense changes occurring in a distance 50nm from the device surface. Thus the mass of the cells doesn't affect the signal. Unfortunately, the potential of this biosensor, did not give the desired results. The composition of the surface and wettability were an important aspect in this study. In every case and in every biosensor system the cells were found to interact non specifically with the surface. This fact represented a major problem at the data analysis. So, it is important to investigate the affinity of the cells for different surfaces in order to optimize the biosensor device. Changing of composition of the alkanethiols of SAMs may be the solution.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

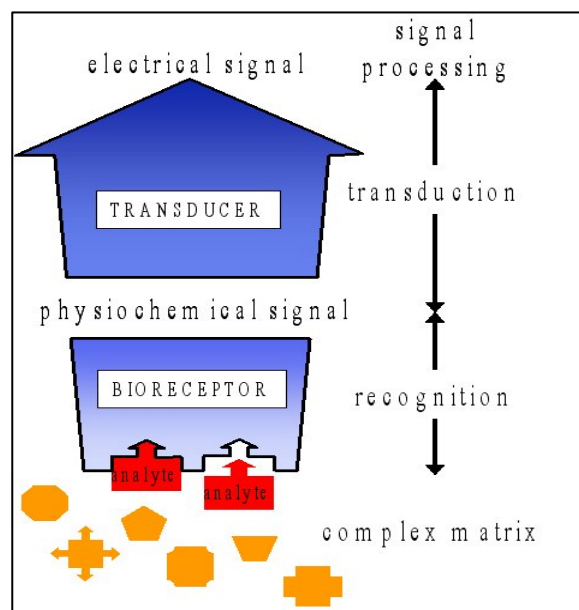
<u>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</u>	7
<u>1 Οπτικοί βιοαισθητήρες</u>	9
1.1 SPR βιοαισθητήρες	9
1.1.1 Ολική εσωτερική ανάκλαση	10
1.1.2 Επιφανειακά πλασμόνια (Surface plasmons)	10
1.1.3 Συντονισμός ορμής (Momentum resonance)	11
1.1.4 Αποσβένον κύμα (Evanescent wave)	12
1.1.5 Ποσοτικοποίηση των μετρήσεων	14
1.1.6 Διατάξεις SPR	15
<u>2 Ακουστικοί βιοαισθητήρες</u>	16
2.1 Βιοαισθητήρας Q-Sense	17
2.2 Ακουστικός βιοαισθητήρας τύπου Love	19
<u>3 Self Assembled Monolayers για ακινητοποίηση βιομορίων</u>	21
3.1 Self-Assembled Monolayers θειολών στο χρυσό	23
3.2 The Self-Assembly Process	24
3.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την διάταξη ενός monolayer	27
3.3.1 Καθαρότητα του χρυσού	27
3.3.2 Καθαρότητα αλκανοθιολών	28
3.3.3 Το μήκος της υδρογονανθρακικής αλυσίδας	28
3.3.4 Τύπος ω-ομάδας	28
3.4 Κινητική σχηματισμού Monolayer	29
3.5 Συνήθεις χρήσεις των SAMs	30
3.5.1 Μικτά monolayers	30
3.5.2 Patterning	31
3.6 Είδη θιολών- εφαρμογές	31
3.6.1 Αμινο-αλκανο-θειόλες (Aminoalkanethiols)	31
3.6.2 N-Fmoc αμινο-αλκανο-θειόλες	32
3.6.3 Καρβόξυ-αλκανο-θειόλες (Carboxyalkanethiols)	33
3.6.4 Καρβόξυ- αλκυλο-δισουλφίδια (Carboxyalkyldisulfides)	34
3.6.5 Succinimidylester-terminated alkylidisulfides	35
3.6.6 Ferrocenylalkanethiols	35
3.6.7 Υδρόξυ-αλκανο-θειόλες (Hydroxyalkanethiols)	36
3.7 Χημικές αντιδράσεις σε Self-Assembled Monolayers	37

<u>4 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....</u>	<u>39</u>
<u>5 ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ.....</u>	<u>40</u>
5.1 Προετοιμασία των υποστρωμάτων χρυσού (SPR/QCM/SAW devices).....	40
5.2 Κατασκευή monolayer	41
5.3 Κυτταρικές σειρές και καλλιέργειες	42
5.4 Πειράματα με αισθητήρα SPR	42
5.5 Πειράματα με βιοαισθητήρα Q-sence	43
5.6 Πειράματα με αισθητήρα SAW	44
<u>6 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</u>	<u>46</u>
6.1 Κατασκευή του monolayer	46
6.2 Οργανική σύνθεση	48
6.3 Πειράματα SPR για τον έλεγχο της ακινητοποίησης του πεπτιδίου-μελέτη της αλληλεπίδρασης των HLA μορίων καρκινικών κυτταρων με το πεπτιδίο	54
6.4 Ανίχνευση της αλληλεπίδρασης μεταξύ των HLA μορίων καρκινικώνκύτταρων και πεπτιδίων με Q-sence βιοαισθητήρα.....	60
6.5 Πειράματα SAW	70
<u>7 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....</u>	<u>71</u>
<u>8 ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ.....</u>	<u>71</u>
<u>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</u>	<u>72</u>
<u>ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....</u>	<u>77</u>

ΕΙΣΑΓΩΓΗ:

Τις τελευταίες δεκαετίες, οι προσπάθειες ενός μεγάλου μέρους της επιστημονικής κοινότητας, επικεντρώθηκαν στην ανάπτυξη τεχνικών που είναι απαραίτητες για την αλληλούχιση του γονιδιώματος του ανθρώπου, καθώς και άλλων οργανισμών. Το εγχείρημα αυτό στέφθηκε με επιτυχία αν αναλογιστούμε ότι το ανθρώπινο γονιδίωμα είναι ήδη γνωστό από το 2001, ενώ παράλληλα, μέχρι σήμερα έχει γνωστοποιηθεί το γονιδίωμα 332 οργανισμών (βακτηρίων, αρχαίων, ευκαρυωτικών). Ο προσδιορισμός των γονιδιωμάτων και άλλων οργανισμών βρίσκεται σε εξέλιξη, παρόλα αυτά η προσοχή των ερευνητών έχει πλέον στραφεί στην ανάπτυξη πειραματικών προσεγγίσεων γονιδιωματικής - πρωτεϊνοματικής με σκοπό την απάντηση στο ευρύ και βασικό ερώτημα: 'πώς ο γονότυπος καθορίζει τον φαινότυπο' (πώς μετατρέπεται η γονιδιακή πληροφορία σε φαινότυπο).

Αναλογιζόμενοι ότι ο φαινότυπος μιας βιολογικής διεργασίας, τις περισσότερες φορές, περιγράφεται μέσω αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών, μπορούμε να αντιληφθούμε την σημαντικότητα, ανάπτυξης τεχνικών προς αυτήν την κατεύθυνση. Τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιείται ευρέως, η τεχνολογία των βιοαισθητήρων. Ο βιοαισθητήρας είναι μια αναλυτική συσκευή που μπορεί να μετατρέψει μια βιολογική απόκριση σε ηλεκτρικό σήμα. Συγκεκριμένα επιτρέπουν την ανίχνευση και την παρακολούθηση, σε πραγματικό χρόνο, βιολογικών διεργασιών και παρέχουν ποσοτική πληροφορία όσον αφορά την ειδικότητα (πόσο ειδικά αλληλεπιδρούν δυο μόρια), την συγκέντρωση, την κινητική, και την συγγένεια αλληλεπιδράσεων μορίων. Αποτελείται από τρία μέρη: τον βίο-υποδοχέα, που είναι συνήθως ένα βιολογικό μόριο (bioreceptor), το μεταγωγέα (transducer), που βρίσκεται σε επαφή με τον υποδοχέα, και το ηλεκτρονικό κομμάτι.(εικόνα 1).



Εικόνα 1. Αρχή λειτουργίας του βιοαισθητήρα. Ο αναλύτης δεσμεύεται ειδικά με τον υποδοχέα. Η σύνδεση αυτή προκαλεί την παραγωγή ενός φυσικοχημικού σήματος που μέσω του μεταγωγέα μετατρέπεται σε ηλεκτρικό.

Οι βιο-υποδοχείς είναι συνήθως ένζυμα ή πρωτεΐνες, όπως αντισώματα, ακινητοποιημένα στην επιφάνεια ενός φυσικοχημικού μεταγωγέα. Οι ειδικές αλληλεπιδράσεις, μεταξύ του μορίου αναλυτή και του βίο-υποδοχέα, επιφέρουν μια φυσικοχημική αλλαγή, η οποία μπορεί να ανιχνευτεί και να μετρηθεί από τον μεταγωγέα. Γενικά κάθε βιομόριο ή μόριο που μπορεί να αναγνωρίσει και να συνδεθεί με τον αναλυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν βίο-υποδοχέας. Ο πίνακας 1 παρουσιάζει συνοπτικά τους πιο διαδεδομένους, βιουποδοχείς καθώς επίσης και τα κύρια χαρακτηριστικά που πρέπει να έχει το περιβάλλον, ώστε να διατηρείτε η δομική ακεραιότητα τους και κατ' επέκταση η λειτουργικότητά τους.

Complexity hierarchy	Bilayer type	Main needs for structural integrity	Typical signal generated
	End of organ (eg. Olfactory) Tissue	Intact Tissue Architecture	Action potential
Whole Cell	Nutrient/ Oxygen supply	Metabolic and product	
Cell Organelle (eg. Mitochondrion)	Osmotic/ pH stability	Product of electron chain	
Biomembrane (eg. Receptor)	Mechanic protection	Released contents	
Enzyme	pH/ electrolyte stability	Reaction product	
Antibody	pH stability	Antigen uptake mass change	
Ionophore	Adequate retention	EMF/ absorbance change(chromionphore)	

Πίνακας 1. Βιο-υποδοχείς και τα κύρια χαρακτηριστικά που πρέπει να έχει το περιβάλλον, ώστε να διατηρείτε η δομική ακεραιότητα τους και κατ' επέκταση η λειτουργικότητά τους. Σήμα που παράγεται.

Οι μεταγωγείς μετατρέπουν την αλληλεπίδραση σε μετρήσιμο σήμα και διακρίνονται σε διάφορα είδη, ανάλογα με τις παραμέτρους που μετρούν. Συνήθως μετρούν, ηλεκτροχημικές, οπτικές, θερμικές αλλαγές καθώς και αλλαγές μάζας. Το σήμα που παράγουν δεν είναι αναγκαία ηλεκτρικό, αλλά εξαρτάται από τον τύπο και την εφαρμογή του αισθητήρα. Οι κυριότεροι μεταγωγείς είναι οι αμπερομετρικοί, αγωγιμομετρικοί, ποντεσιομετρικοί, χωρητικοί (conductive), οι οπτικοί (intrinsic, extrinsic), πιεζοηλεκτρικοί και οι θερμικοί.

Οι βιοαισθητήρες μπορούν να διαχωριστούν σε δύο κύριες κατηγορίες ανάλογα με την αλληλεπίδραση βίουποδοχέα / μορίου αναλυτή. Σύμφωνα με αυτόν τον διαχωρισμό υπάρχουν οι βιοκαταλυτικοί (biocatalysis) και οι

βιοσυγγενικοί (bioaffinity). Στους βιοκατακυλικούς ανιχνεύεται το προϊόν μιας καταλυτικής αντίδρασης. Στην κατηγορία αυτή χρησιμοποιούνται ως βιοϋποδοχείς ένζυμα, κύτταρα, ιστοί και μικροοργανισμοί. Αντίθετα στους βιοσυγγενικούς, χρησιμοποιούνται βιομόρια (πρωτεΐνες, πεπτιδία, νουκλεϊνικά οξέα) και μετράτε η συγγένεια τους για κάποιο μόριο αναλυτή, ανιχνεύοντας αλλαγές στη μάζα (Scheller et al., 2001; D'Orazio, 2003).

Οι βιοαισθητήρες μπορούν επίσης να διαχωριστούν και ανάλογα με το είδος του μεταγωγέα που φέρουν. Υπάρχουν τρεις κατηγορίες: α) οι ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες, που ανιχνεύουν αλλαγές σχετιζόμενες με την παραγωγή ή κατανάλωση ηλεκτρονίων και χρησιμοποιούνται κυρίως με ένζυμα ως υποδοχείς, β) οι οπτικοί βιοαισθητήρες και γ) οι ακουστικοί βιοαισθητήρες. Οι δύο τελευταίες κατηγορίες χρησιμοποιούνται για τη μελέτη αλληλεπιδράσεων συγγένειας (Scheller et al., 2001). Για την συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκαν τόσο οπτικοί (surface plasmon resonance, SPR) όσο και ακουστικοί (Q-sense, SAW). Καλό θα ήταν λοιπόν, να αναφερθούν οι γενικές ιδιότητες, και τα χαρακτηριστικά τους.

1) Οπτικοί βιοαισθητήρες:

Οι βιοαισθητήρες που χρησιμοποιούν οπτική μεταγωγή σήματος τα τελευταία χρόνια έχουν φθάσει σε σημαντική ανάπτυξη. Σε αυτό βοήθησαν και τα αρκετά πλεονεκτήματα που προσφέρουν, όπως μεγάλη ευαισθησία, άμεση ακινητοποίηση των βιοϋποδοχέων στον μεταγωγέα, χρησιμοποίηση μη υδατικών διαλυμάτων όπου είναι αναγκαίο κ.λ.π.

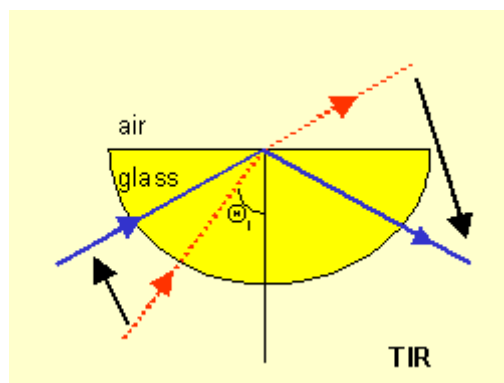
Οι οπτικοί βιοαισθητήρες, χαρακτηρίζονται από την χρήση οπτικών μεταγωγέων και ανάλογα με το είδος τους μπορούν να καταταχθούν σε βιοαισθητήρες άμεσης ανίχνευσης, οπτικής απορρόφησης ή ηλεκτροχημειοφωταύγειας και ανίχνευσης φθορισμού. Στην συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκε αισθητήρας άμεσης ανίχνευσης, η λειτουργία του οποίου στηρίζεται στην μέτρηση της αλλαγής του δείκτη διάθλασης μεταξύ νερού και βιολογικών μορίων. Δέσμευση του μορίου αναλυτή στην επιφάνεια του μεταγωγέα, έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή του δείκτη διάθλασης της επιφάνειας, κάτι που μπορεί να ανιχνευτεί με τεχνικές αποσβένοντων κυμάτων (evanescent wave), όπως φασματοσκοπία επιφανειακού συντονισμού πλάσματος (SPR), ή τεχνικές ανάκλασης/ συμβολής όπως η ελεισομετρία.

1.1) SPR βιοαισθητήρες:

Ο επιφανειακός συντονισμός πλάσματος (SPR) είναι μια φυσική διαδικασία που μπορεί να υπάρξει όταν επίπεδα πολωμένο φως χτυπά ένα λεπτό μεταλλικό στρώμα (φιλμ) υπό συνθήκες ολικής εσωτερικής ανάκλασης.

1.1.1) Ολική εσωτερική ανάκλαση:

Όταν μια ακτίνα φωτός χτυπά ένα μισό-κυκλικό πρίσμα, το φως κάμπτεται προς το επίπεδο της μεσεπιφάνειας, όταν περνά από ένα πυκνότερο μέσο σε ένα λιγότερο πυκνό. Η αλλαγή της γωνίας πρόσπτωσης, αλλάζει επίσης την γωνία εξόδου της ακτίνας έως ότου επιτυγχάνεται μια κρίσιμη γωνία. Σε αυτήν την γωνία, η εισερχόμενη ακτίνα φως ανακλάτε μέσα στο κυκλικό πρίσμα. Αυτό καλείται ολική εσωτερική ανάκλαση (TIR). Αν και η ακτίνα δεν βγαίνει από το πρίσμα κατά την ολική εσωτερική ανάκλαση, ο ηλεκτρικό πεδίο των φωτονίων της επεκτείνεται για ένα τέταρτο του μήκους κύματος πέρα από την επιφάνεια ανάκλασης (εικόνα 2).



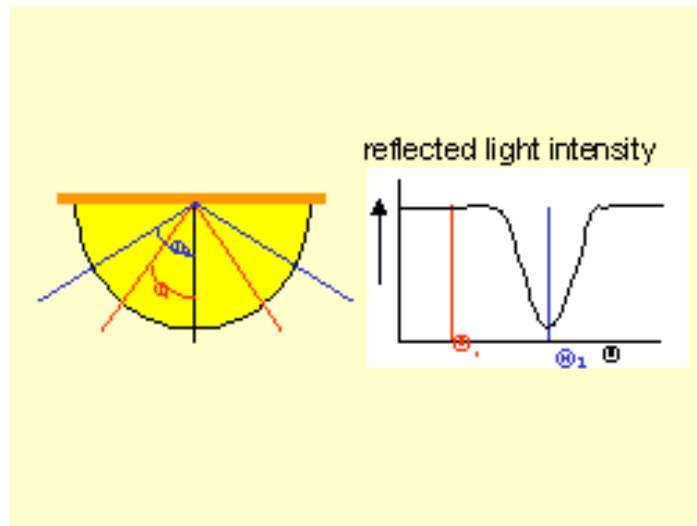
Εικόνα 2: ολική εσωτερική ανάκλαση

1.1.2) Επιφανειακά πλάσμονια (Surface plasmons):

Αν το πρίσμα καλύπτεται με ένα λεπτό μεταλλικό στρώμα (φιλμ), ενός ευγενούς μετάλλου στην περιοχή ανάκλασης, τότε όταν η ενέργεια του ηλεκτρικού πεδίου του φωτονίου είναι ακριβώς σωστή μπορεί να αλληλεπιδράσει με τους ελεύθερα ηλεκτρόνια της επιφάνειας. Έτσι τα φωτόνια της ακτινοβολίας απορροφώνται και μετατρέπονται σε επιφανειακά πλάσμονια (surface plasmons). Στις περισσότερες περιπτώσεις ως μέταλλο χρησιμοποιείται ο χρυσός επειδή δίνει σήμα SPR σε κατάλληλους συνδυασμούς γωνίας ανάκλασης και μήκους κύματος. Επιπλέον, ο χρυσός είναι χημικά αδρανής στα διαλύματα και τους διαλυτές που χρησιμοποιούνται στις βιοχημικές εφαρμογές.

Η συμπεριφορά των φωτονίων και των ηλεκτρονίων μπορούν να περιγραφούν λαμβάνοντας υπ' όψιν τόσο την κυματική όσο και την σωματιδιακή τους φύση. Σύμφωνα με την κβαντική θεωρία, το πλάσμονιο είναι η σωματιδιακή φύση της ηλεκτρονικής πυκνότητας των κυμάτων.

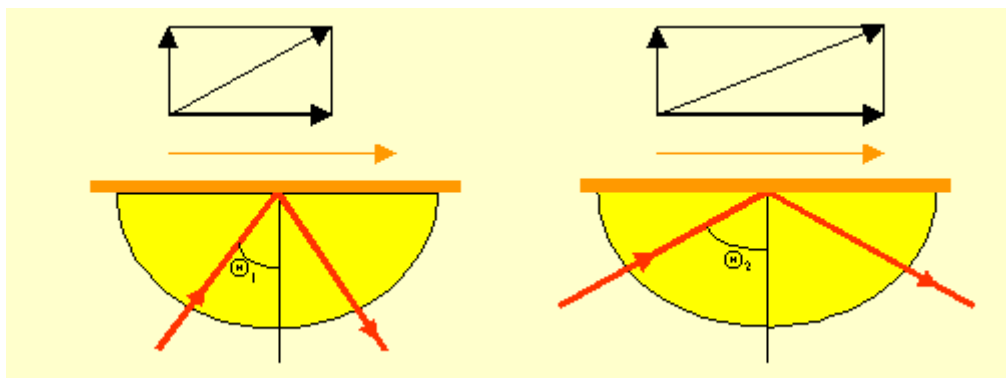
Επομένως, όταν σε μια ολικής ανάκλασης κατάσταση η κβαντική ενέργεια των φωτονίων είναι σωστή, τα φωτόνια μετατρέπονται σε πλάσμονια αφήνοντας ένα "κενό" στην ένταση της ανακλώμενης ακτινοβολίας (εικόνα 3).



Εικόνα 3: τα φωτόνια μετατρέπονται σε πλάσμονια αφήνοντας ένα "κενό" στην ένταση της ανακλώμενης ακτινοβολίας

1.1.3) Συντονισμός ορμής (Momentum resonance):

Όπως σε όλες τις μετατροπές, έτσι και στην μετατροπή του φωτονίου σε πλάσμονιο πρέπει να συντηρηθεί η συνολική ορμή και ενέργεια του συστήματος. Τα πλάσμονια έχουν μια χαρακτηριστική ορμή η οποία ορίζεται από παράγοντες που περιλαμβάνουν, τη φύση της επιφάνειας επαφής και τις ιδιότητες του μέσου σε κάθε πλευρά της. Ο συντονισμός συμβαίνει όταν η ορμή του εισερχόμενου φωτός είναι ίση με την ορμή των πλάσμονιων. (συντονισμός ορμής). Η ορμή των φωτονίων και των πλάσμονιων μπορεί να περιγραφεί από μια διανυσματική συνάρτηση του μέτρου και της κατεύθυνσης της. Το σχετικό μέτρο αλλάζει, όταν αλλάζει η γωνία ή το μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Εντούτοις, τα πλάσμονια είναι περιορισμένα στο επίπεδο της επιφάνειας χρυσού, έτσι για το SPR σημαντικό είναι μόνο το διάνυσμα που είναι παράλληλο στην επιφάνεια. Κατά συνέπεια, η ενέργεια και η γωνία της προσπίπτουσας ακτινοβολίας πρέπει να είναι σωστές για να επιφέρουν συντονισμό πλάσμονιων (εικόνα 4).



Εικόνα 4: Συντονισμός ορμής. Η ορμή των φωτονίων και των πλασμονίων μπορεί να περιγραφεί από μια διανυσματική συνάρτηση του μέτρου και της κατεύθυνσης της.

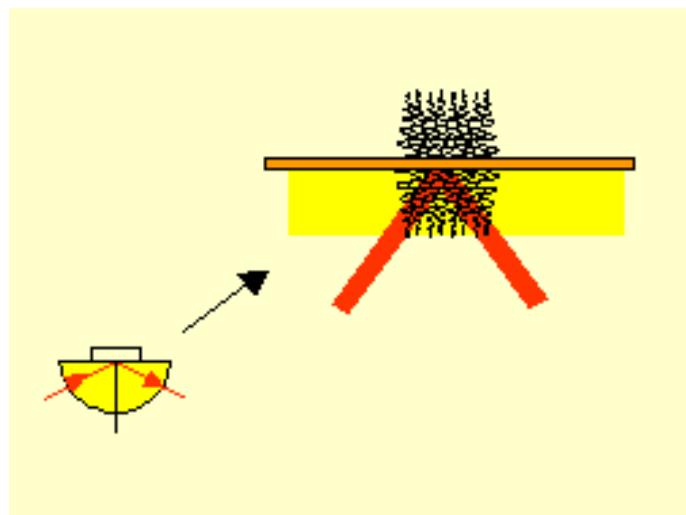
1.1.4) Αποσβένον κύμα (Evanescent wave):

Στην ολική εσωτερική ανάκλαση, τα ανακλώμενα φωτόνια δημιουργούν ένα ηλεκτρικό πεδίο στην αντίθετη περιοχή της μεσεπιφάνειας. Τα πλασμόνια δημιουργούν ένα συγκρίσιμο πεδίο που επεκτείνεται στο μέσο σε κάθε πλευρά της επιφάνειας. Αυτό το πεδίο καλείται αποσβένον κύμα επειδή το πλάτος του μειώνεται εκθετικά με την αυξανόμενη απόσταση από την επιφάνεια μεσεπιφάνειας, και εξασθενεί τελείως, πέρα από μια απόσταση περίπου ενός μήκους κύματος της ακτινοβολίας. Το βάθος του αποσβένοντος κύματος που είναι χρήσιμο για τις μετρήσεις είναι εντός περίπου ~ 300 nm, από την επιφάνεια του αισθητήρα. Το μήκος κύματος του πεδίου του αποσβένον κύματος είναι το ίδιο με αυτό της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Η ενέργεια του εξασθενεί από τη θερμότητα.

Εξισώσεις, οι οποίες περιγράφουν πώς τα ηλεκτρικά πεδία μεταφέρονται μέσω ενός μέσου, περιλαμβάνουν έναν όρο για τις ιδιότητες του μέσου. Για το φως, αυτός ο όρος είναι ο δείκτης διάθλασης. Η ακτινοβολία διαθλάται επειδή τα φωτόνια έχουν διαφορετική ταχύτητα σε διαφορετικά μέσα. Με τον ίδιο τρόπο, η ταχύτητα (και επομένως η ορμή) των πλασμονίων αλλάζουν όταν η σύσταση του μέσου αλλάζει (εικόνα 5). Λόγω της αλλαγής της ορμής, η γωνία της προσπίπτουσας ακτινοβολίας στην οποία υπάρχει συντονισμός είναι διαφορετική. Αυτή η αλλαγή μπορεί να μετρηθεί με μεγάλη ακρίβεια. Ο τύπος του SPR που ακολουθεί την παραπάνω διαδικασία ονομάζεται, SPR γωνίας συντονισμού ή γωνιακό SPR (resonant angle or angular SPR). Αφ' ετέρου, υπάρχει και το SPR συντονισμού μήκους κύματος (resonant wavelength SPR) στο οποίο διατηρείται σταθερή η γωνία της

προσπίπτουσας ακτινοβολίας, ενώ το μήκος κύματος μπορεί να διαφοροποιείται έως ότου επέλθει συντονισμός.

Η καλύτερη ακρίβεια του γωνιόμετρου στο γωνιακό SPR είναι 0.001° , το οποίο αντιστοιχεί σε μια οπτική μετατόπιση του μήκους κύματος κατά $0,6 \text{ nm}$. Ένα φασματοφωτόμετρο μεγάλου εύρους μηκών κύματος, μπορεί ταυτόχρονα να παρατηρήσει μήκη κύματος από $400 - 800 \text{ nm}$ και είναι ακριβέστερο από τις μετρήσεις γωνιών.

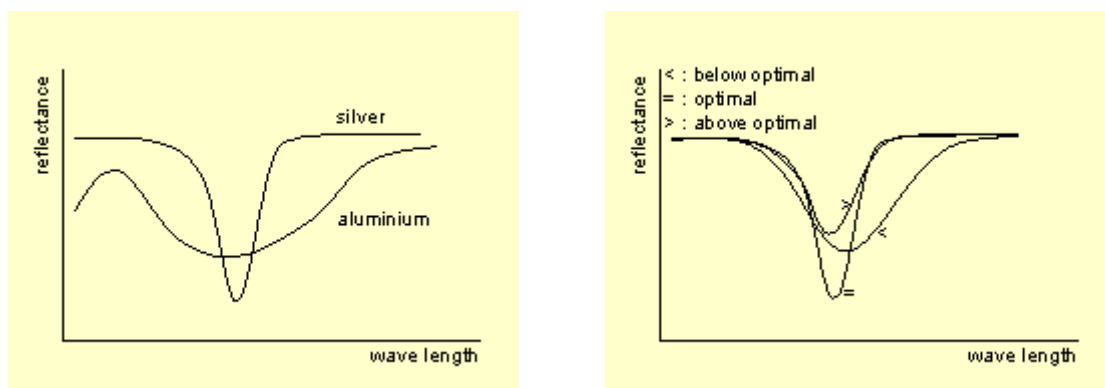


Εικόνα 5: η ταχύτητα (και επομένως η ορμή) των πλασμονίων αλλάζουν όταν η σύσταση του μέσου αλλάζει. Λόγω της αλλαγής της ορμής, η γωνία της προσπίπτουσας ακτινοβολίας στην οποία υπάρχει συντονισμός είναι διαφορετική.

Η γωνία στην οποία επέρχεται επιφανειακός συντονισμός πλάσματος εξαρτάται κυρίως από τις ιδιότητες του μεταλλικού φιλμ, το μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας και το δείκτη διάθλασης του μέσου που υπάρχει σε κάθε μια από τις πλευρές του φιλμ. Επειδή ο δείκτης διάθλασης είναι ευαίσθητος στη θερμοκρασία, είναι σημαντικό οι μετρήσεις να εκτελεστούν σε καθορισμένες θερμοκρασίες. Το μέταλλο πρέπει να έχει αγωγίμες ζώνες ηλεκτρονίων ικανές να συντονίζονται με την εισερχόμενη ακτινοβολία σε ένα κατάλληλο μήκος κύματος. Τα μέταλλα που ικανοποιούν αυτόν τον όρο είναι το ασήμι, ο χρυσός, ο χαλκός, το αλουμίνιο, το νάτριο και το ίνδιο. Επιπλέον, το μέταλλο στην επιφάνεια των αισθητήρων πρέπει να μην περιέχει οξειδία, σουλφίδια και να μην αντιδρά με άλλα μόρια, όταν εκτίθεται στην ατμόσφαιρα ή σε υγρό διάλυμα.

Από τα παραπάνω μέταλλα, το ίνδιο είναι ακριβό, το νάτριο πολύ ενεργό, ο χαλκός και το αργίλιο εμφανίζουν μεγάλη απόκριση SPR και το ασήμι είναι πάρα πολύ ευαίσθητο στην οξείδωση. Έτσι ο χρυσός φαίνεται να είναι το καταλληλότερο μέταλλο. Ο χρυσός είναι πολύ ανθεκτικός στην οξείδωση και

άλλους ατμοσφαιρικούς μολυσματικούς παράγοντες αλλά είναι συμβατός με πολλά χημικά συστήματα. Το πάχος του χρυσού πρέπει να είναι ~ 50 nm. Το πάχος του μεταλλικού στρώματος είναι σημαντικό, διότι επάνω από ένα βέλτιστο η πτώση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας γίνεται μικρή, ενώ κάτω από το βέλτιστο πλαταίνει (εικόνα 6) . Η πηγή φωτός πρέπει να είναι μονοχρωματική και π-πολωμένη (πολωμένη στο επίπεδο της επιφάνειας) για να λάβουμε μια έντονη πτώση. Το φως που δεν είναι π-πολωμένο δεν θα συμβάλει στο SPR και θα αυξήσει την ένταση του θορύβου (background) της ανακλώμενης ακτινοβολίας.



Εικόνα 6: επίδραση του είδους και του πάχους του μετάλλου στον επιφανειακό συντονισμό πλάσματος

Επομένως αν στα διάφορα πειράματα κρατηθούν σταθερά το είδος του μετάλλου, η προσπίπτουσα ακτινοβολία, και η θερμοκρασία, το σήμα SPR εξαρτάται μόνο από την αλλαγή του δείκτη διάθλασης, του μέσου στην επιφάνεια του αισθητήρα.

1.1.5) Ποσοτικοποίηση των μετρήσεων:

Η δέσμευση βιομορίων οδηγεί στην αλλαγή του δείκτη διάθλασης της επιφάνειας του αισθητήρα, η οποία μετρείται ως αλλαγή στη γωνία συντονισμού ή το μήκος κύματος συντονισμού. Η αλλαγή στο δείκτη διάθλασης ακολουθεί γραμμική σχέση με το ποσό την ποσότητα των μορίων που δεσμεύτηκε. Εντούτοις, αυτό ισχύει κυρίως για τις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις που εμφανίζουν μια αύξηση στο δείκτη διάθλασης γύρω στα 0.18-0.19 ml/g . Για άλλα βιομόρια, κάποια βαθμολόγηση μπορεί να είναι απαραίτητη. Οι περισσότερες από τις SPR-συσκευές μετατρέπουν τις πραγματικές μετρημένες τιμές (μήκος γωνίας ή κυμάτων) σε μια αυθαίρετη μονάδα, η οποία είναι εύκολο να ερμηνευτεί. Η συσκευή της BIACORE χρησιμοποιεί, παραδείγματος χάριν τη μονάδα συντονισμού (Resonance Unit, RU) που προκύπτει από την πραγματική γωνιακή μετατόπιση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Η γνώση της αύξησης του δείκτη διάθλασης (RII) είναι σημαντική για πολλές ποσοτικές και συγκριτικές εφαρμογές του SPR, ειδικά για μικρά μόρια. Για την συσκευή που χρησιμοποιήθηκε στην συγκεκριμένη εργασία, η σχέση μεταξύ αλλαγής στο δείκτη διάθλασης και

μάζας που εναποτίθεται στην επιφάνεια ορίζεται από τον κατασκευαστή ως εξής:

$$1.6145 \mu\text{RIUs (micro refractive index units)} = 1 \text{ pg/mm}^2$$

Η σχέση μεταξύ RU (Biacore) και μRIU (Reichert) είναι η εξής:

$$1\text{RU} = 1.6145\mu\text{RIU}$$

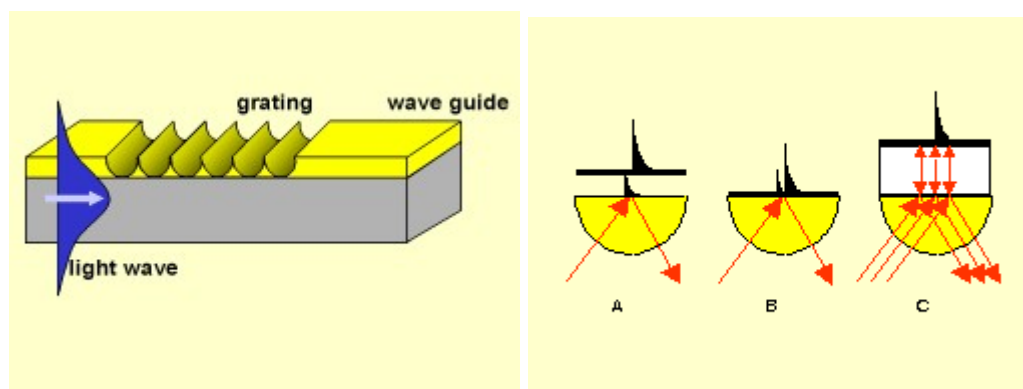
1.1.6) Διατάξεις SPR:

Υπάρχουν τρεις γενικές διατάξεις των SPR devices που είναι ικανές να παραγάγουν και να μετρήσουν επιφανειακό συντονισμό πλάσματος (εικόνα 7):

α) συστήματα συνδεδεμένα με σχάρα διάθλασης (grating coupled systems)

β) οπτικά συστήματα κυματοδηγού (optical waveguide systems)

γ) συστήματα ολικής ανάκλασης συνδεδεμένα με πρίσμα (prism coupled attenuated total reflection systems)



Εικόνα 7: γενικές διατάξεις των SPR devices.

Για τα συστήματα συνδεδεμένα με σχάρα διάθλασης, η ημιτονοειδής σχάρα (resonance waveguide grating) είναι η βέλτιστη. Η περίοδος και το πλάτος της θα καθορίσουν το μήκος κύματος του συντονισμού.

Τα οπτικά συστήματα κυματοδηγού έχουν μερικά ελκυστικά χαρακτηριστικά γνωρίσματα, όπως ο απλός τρόπος ελέγχου της οπτικής διαδρομής, το μικρό μέγεθος και η τραχύτητα. Διαφοροποιώντας την γωνία πρόσπτωσης της ακτινοβολίας, το κύμα καθοδηγείται από τον κυματοδηγό ώστε να μπει σε μια σχάρα (2400 γραμμές / χιλ.) και σε μια λεπτή μεταλλική επικάλυψη, διαπερνώντας έτσι παροδικά το του μεταλλικό στρώμα. Στο τέλος του κυματοδηγού η εξερχόμενη ακτινοβολία ανιχνεύεται από φωτοδιόδους.

Το συνδεδεμένο με πρίσμα SPR σύστημα μπορεί να εφαρμοστεί με διαφορετικές διατάξεις. Στη διάταξη Otto, υπάρχει μια απόσταση μεταξύ του μετάλλου και της επιφάνειας ολικής ανάκλασης (εικόνα 7a). Ο χώρος μεταξύ τους γεμίζει με ένα μέσο χαμηλότερου δείκτη διάθλασης. Αυτή η διαμόρφωση είναι χρήσιμη στη μελέτη μέσων στερεάς φάσης. Εντούτοις η απόσταση μεταξύ του μετάλλου και της επιφάνειας ολικής ανάκλασης μειώνει την αποδοτικότητα SPR και είναι λιγότερο χρήσιμη για εφαρμογές που περιλαμβάνουν διαλύματα.

Στη διάταξη Kretchman το μεταλλικό στρώμα είναι άμεσα συνδεδεμένο πάνω στην επιφάνεια που επιτρέπει μια αποδοτικότερη παραγωγή πλασμονίων (εικόνα 7b). Μια τρίτη διάταξη μοιάζει με τη διάταξη Otto αλλά χρησιμοποιεί ένα ειδικό στρώμα για να ενισχύσει την ολική ανάκλαση (εικόνα 7c). Στην συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκε συσκευή SPR που ακολουθεί την διάταξη Kretchman.

2) Ακουστικοί βιοαισθητήρες

Τα ακουστικά κύματα είναι αρμονικές ελαστικές παραμορφώσεις που μπορούν να παραχθούν σε στερεά. Παραμόρφωση σε στερεό συμβαίνει όταν οι αποστάσεις μεταξύ των ατόμων μεταβάλλονται εξαιτίας της άσκησης μιας εξωτερικής δύναμης. Αν η δύναμη αυτή παύσει, οι δυνάμεις επαναφοράς επαναφέρουν τα άτομα στην αρχική τους θέση. Αν η εφαρμοζόμενη δύναμη εμφανίζει περιοδικότητα τότε μπορεί να παραχθεί μια κυματοειδής παραμόρφωση ή ταλάντωση που ονομάζεται ακουστικό κύμα (Morgan, 1985).

Οι ακουστικοί βιοαισθητήρες ως μεταγωγέα χρησιμοποιούν ένα πιεζοηλεκτρικό υλικό όπως ο χαλαζίας (quartz), από τον οποίο είναι κατασκευασμένος ο βιοαισθητήρας που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία. Πιεζοηλεκτρικά ονομάζονται τα υλικά που εμφανίζουν παραμόρφωση αν εφαρμοστεί σε αυτά ένα ηλεκτρικό πεδίο. Τέτοια παραμόρφωση είναι ένα ακουστικό κύμα (Cady, 1964). Στον βιοαισθητήρα, η διάταξη περιλαμβάνει το πιεζοηλεκτρικό υλικό και ηλεκτρόδια. Τα ηλεκτρόδια εφαρμόζουν ένα ηλεκτρικό πεδίο για την παραγωγή του ακουστικού κύματος ενώ ταυτόχρονα χρησιμεύουν και στην ανίχνευση του (White, 1970).

Το ακουστικό κύμα μπορεί να διαδίδεται στο χαλαζία του βιοαισθητήρα με διάφορους τρόπους. Οι δύο κύριες κατηγορίες ακουστικών βιοαισθητήρων χρησιμοποιούν, επιφανειακό ακουστικό κύμα (surface acoustic wave, SAW) και το ακουστικό κύμα όγκου (bulk acoustic wave, BAW) αντίστοιχα. Στην πρώτη περίπτωση, το ακουστικό κύμα διαδίδεται στην επιφάνεια του αισθητήρα (Dieulesaint and Royer, 1980), ενώ στη δεύτερη περίπτωση, το ακουστικό κύμα διαδίδεται σε όλο τον όγκο του πιεζοηλεκτρικού υλικού (Cady, 1924). Οι βιοαισθητήρες που λειτουργούν με SAW είναι πολύ πιο ευαίσθητοι από εκείνους που λειτουργούν με BAW καθώς χρησιμοποιούν υψηλότερης συχνότητας κύμα για να ανιχνεύσουν αλλαγές μάζας στην επιφάνεια του αισθητήρα (Gizeli et al, 1992a). Ο βιοαισθητήρας που χρησιμοποιήθηκε στην συγκεκριμένη εργασία είναι βιοαισθητήρας με BAW Q-Sense.

2.1) Βιοισθητήρας Q-Sense:

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιεί AT ή BT κρυστάλλους χαλαζία (εικόνα 8), οι οποίοι έχουν ηλεκτρόδια και στις δυο πλευρές.



Εικόνα 8: κρύσταλλοι χαλαζία για Q-sense βιοισθητήρα

Όταν εφαρμοστεί τάση, οι κρύσταλλοι παραμορφώνονται λόγω του πιεζοηλεκτρικού φαινομένου, έτσι ώστε η μια πλευρά να κινείται με επίπεδο τρόπο σε σχέση με την άλλη. Σταματώντας την εφαρμογή τάσης ο κρύσταλλος χαλαρώνει και ταλαντώνεται με την φυσική του συχνότητα. Η ταλάντωση αυτή, μπορεί να διατηρηθεί από ένα ηλεκτρονικό κύκλωμα. Μια εναλλακτική εξήγηση είναι, ότι ένα επίπεδο κύμα που διαδίδεται στην επιφάνεια, και αντανακλάτε μεταξύ των δυο επιφανειών, σχηματίζοντας ένα στατικό κύμα. Η ταχύτητα αυτού του κύματος στον κρύσταλλο δίνεται από την εξίσωση:

$$v = \left[\frac{\mu}{\rho_Q} \right]^{1/2}$$

όπου μ είναι μια σταθερά ακαμψίας (rigidity modules), και ρ_Q η πυκνότητα του κρυστάλλου.

Οι τυπικοί QCM κρύσταλλοι έχουν λιγότερο από 200 μM πάχος και λειτουργούν σε συχνότητες μεταξύ 10-50 MHz. Με προσθήκη μικρής ποσότητας μάζας που δεσμεύεται στην επιφάνεια, η συχνότητα ταλάντωσης όταν εφαρμόζεται στον αέρα, αυξάνεται σύμφωνα με την εξίσωση Saurbrey:

$$\Delta f / f = -\Delta m / m$$

κατά την οποία η κλασματική αλλαγή στην συχνότητα είναι ίση με την κλασματική αλλαγή που προκαλείται από την εναπόθεση μάζας, στην επιφανειακή πυκνότητα (m) του κρυστάλλου που εκφράζεται σε g/cm^2 .

Σε κάθε περίπτωση μας ενδιαφέρει η χρήση των QCM κρυστάλλων για μετρήσεις σε υδατικά διαλύματα και όχι στον αέρα. Όταν η δονούμενη επιφάνεια είναι σε επαφή με υγρό, ένα μέρος του υγρού, λόγω ιξώδους δύναμης, αναγκάζεται να ταλαντωθεί εξίσου. Το αποτελεσματικό πάχος αυτού του δεσμευμένου στρώματος υπολογίστηκε από τον Martin *et al.* Και δίνεται από την εξίσωση:

$$\delta = [\eta / \pi \rho f]^{1/2}$$

όπου η , ρ είναι το ιξώδες και η πυκνότητα του υγρού αντίστοιχα και f η συχνότητα ταλάντωσης του κρυστάλλου. Για κρυστάλλους που λειτουργούν σε συχνότητες μεταξύ 10-50 MHz το αποτελεσματικό πάχος κυμαίνεται από 125-250 nm.

Η επίδραση αυτού του αποτελεσματικού πάχους μελετήθηκε από τον Kanazawa & Gordon, οι οποίοι εξήγαγαν την παρακάτω εξίσωση, για την κλασματική αλλαγή της συχνότητας ταλάντωσης.

$$\Delta f / f = -[f \eta \rho / \pi m \rho_0]^{1/2}$$

Από την εξίσωση αυτή παρατηρούμε ότι η αλλαγή στην συχνότητα εξαρτάτε από το ιξώδες και την πυκνότητα του στρώματος του υγρού που ταλαντώνεται με τον κρύσταλλο. Έτσι η συσκευή εκτός από τις αλλαγές στην μάζα είναι και ευαίσθητη σε αλλαγές στην πυκνότητα και το ιξώδες του αποτελεσματικού πάχους στρώματος υγρού.

Γενικά υπολογίζοντας την αποσβάνουσα ενέργεια (dissipation energy) και την συχνότητα συντονισμού ενός κρυστάλλου χαλαζία, η Q-Sense έχει αναπτύξει μια τεχνολογία που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να μελετήσει το σχηματισμό των λεπτών φιλμς, πρωτεϊνών, πολυμερών, κυττάρων επάνω σε επιφάνειες που βρίσκονται σε επαφή με υγρό. Στην συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκε η τεχνική αυτή (QCM-D, Quartz Crystal Microbalance with Dissipation monitoring).

Σε υγρά, ένα προσροφημένο στρώμα μπορεί να αποτελείται από ένα αρκετά υψηλό ποσό ύδατος, το οποίο ανιχνεύεται από τα συστήματα QCM. Με τη μέτρηση σε διαφορετικές συχνότητες και της αποσβάνουσας ενέργειας είναι δυνατό να καθοριστεί τότε το προσροφημένο στρώμα είναι άκαμπτο πλούσιο σε νερό (μαλακό) που δεν είναι δυνατό με την εξέταση μόνο της συχνότητας. Το ποσό ύδατος μπορεί να είναι 90% ή 10% ανάλογα με το είδος μορίου και τον τύπο επιφάνειας που μελετάτε. Με το QCM-D η κινητική τόσο των δομικών όσο και των μαζικών αλλαγών μπορούν να μελετηθούν.

Η συχνότητα συντονισμού του κρυστάλλου εξαρτάται από τη συνολική μάζα ταλάντωσης, συμπεριλαμβανομένου του ύδατος που συνδέεται με την ταλάντωση. Όταν ένα λεπτό φιλμ συνδέεται με τον κρύσταλλο η συχνότητα

μειώνεται. Εάν το φιλμ είναι λεπτό και άκαμπτο η μείωση στη συχνότητα είναι ανάλογη προς τη μάζα του φιλμ. Κατ' αυτό τον τρόπο, το QCM λειτουργεί ως μια πολύ ευαίσθητη ζυγαριά. Η μάζα του στρώματος για την συσκευή που χρησιμοποιήθηκε υπολογίζεται με τη χρησιμοποίηση της σχέσης Sauerbrey:

$$\Delta m = -\frac{C \cdot \Delta f}{n}$$

C = 17.7 ng Hz⁻¹ cm⁻² για κρύσταλλο
χαλαζία 5 MHz
n = 1,3,5,7 είναι ο αριθμός των αρμονικών.

Είναι επίσης δυνατό να έχουμε μια εκτίμηση του πάχους (d) του στρώματος που προσροφάται:

$$d_{\text{eff}} = \frac{\Delta m}{\rho_{\text{eff}}}$$

Όπου ρ_{eff} είναι η αποτελεσματική πυκνότητα του στρώματος που προσκολλάται.

Παρόλα αυτά σε πολλές περιπτώσεις το προσροφημένο φιλμ δεν είναι άκαμπτο και η σχέση Sauerbrey δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί. Ένα φιλμ που είναι "μαλακό" (viscoelastic) δεν θα συζευχθεί πλήρως με την ταλάντωση του κρυστάλλου. Το dissipation (d) της ταλάντωσης του κρυστάλλου είναι ένα μέτρο της "μαλακότητας" του φιλμ (viscoelasticity). Το d ορίζεται ως:

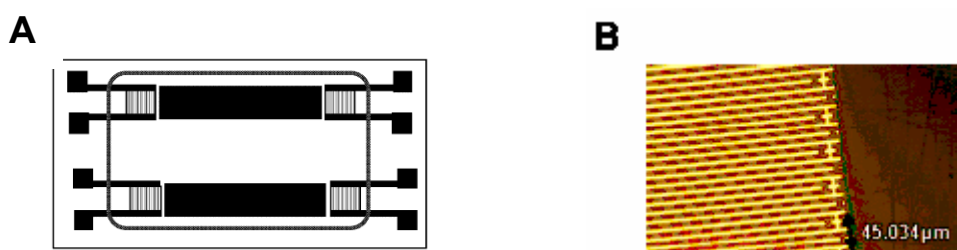
$$D = \frac{E_{\text{lost}}}{2\pi E_{\text{stored}}}$$

όπου E_{lost} είναι η ενέργεια που χάνεται (dissipated) κατά την διάρκεια ενός και κύκλου ταλάντωσης E_{stored} είναι η ολική ενέργεια που είναι αποθηκευμένη στον ταλαντωτή.

2.2) Ακουστικός βιοαισθητήρας τύπου Love

Ο ακουστικός βιοαισθητήρας αυτού του τύπου λειτουργεί με εγκάρσιο οριζόντιο επιφανειακό κύμα (shear horizontal SAW), το οποίο προκαλεί στα στοιχειώδη σωματίδια του στερεού μετατόπιση παράλληλη με την επιφάνεια του βιοαισθητήρα και κάθετη στη διεύθυνση διάδοσης. Ο πιο ευαίσθητος τύπος τέτοιου βιοαισθητήρα είναι εκείνος που λειτουργεί με κύματα Love. Το κύμα Love περιορίζεται στην επιφάνεια του βιοαισθητήρα χρησιμοποιώντας στρώμα κυματοδηγού που εναποτίθεται στην επιφάνεια. Ως κυματοδηγός χρησιμοποιούνται διάφορα υλικά όπως το polymethylmethacrylate (PMMA) (Gizeli et al., 1992b)

Ο Love-mode ακουστικός βιοαισθητήρας είναι μια μικροσυσκευή που αποτελείται από ένα κομμάτι χαλαζία ή LiTaO_3 (στην περίπτωση της παρούσας μελέτης) πάνω στο οποίο εναποτίθενται ηλεκτρόδια από χρυσό. Κάθε ηλεκτρόδιο αποτελείται από ένα σύμπλεγμα δύο πανομοιότυπων σχηματομορφών και κάθε σχηματομορφή περιλαμβάνει μία πλάκα χρυσού από την οποία ξεκινούν ράβδοι χρυσού σε καθορισμένη απόσταση μεταξύ τους και σχηματίζουν ένα πλέγμα με τις ράβδους από την απέναντι σχηματομορφή (εικόνα 9 Β). Τα ηλεκτρόδια αυτά ονομάζονται αλληλοδιαπλεκόμενοι μεταγωγείς (interdigitated transducers, IDTs). Το ακουστικό κύμα παράγεται στο χαλαζία από την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου λόγω της πιεζοηλεκτρικής φύσης του υποστρώματος. Ηλεκτρόδια IDTs τοποθετούνται πάνω στις πλάκες από χρυσό και εφαρμόζεται διαφορά δυναμικού ανάμεσα στα άκρα τους. Τα ηλεκτρόδια από την άλλη μεριά χρησιμεύουν για την ανίχνευση του κύματος. Η απόσταση μεταξύ των IDTs ταυτίζεται με το μήκος κύματος του ακουστικού κύματος ενώ η συχνότητα εξαρτάται από το μήκος κύματος και την ταχύτητα διάδοσης. Πάνω στο χαλαζία γίνεται η εναπόθεση του κυματοδηγού. Το πάχος του κυματοδηγού είναι πολύ σημαντικό γιατί καθορίζει την ευαισθησία του βιοαισθητήρα αφού συμβάλλει στη μετάδοση του κύματος στην επιφάνεια (Gizeli et al., 2003).



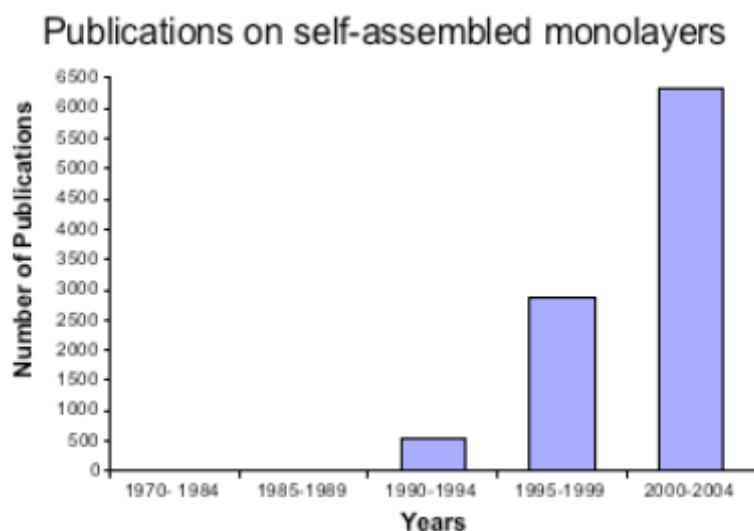
Εικόνα 9. Σχήμα του ακουστικού βιοαισθητήρα LiTaO_3 τύπου Love (A). Μικροφωτογραφία των αλληλοδιαπλεκόμενων μεταγωγών (IDTs) στον αισθητήρα B

Όταν διεξάγονται πειράματα με τον ακουστικό βιοαισθητήρα παρουσία υγρού μέσου, το ακουστικό κύμα που διαδίδεται στην επιφάνεια του βιοαισθητήρα έρχεται σε επαφή με το υγρό στη μεσεπιφάνεια υγρού – στερεού και προκαλεί την ταλάντωση στο σώμα του υγρού. Έτσι, δημιουργείται ένα αποσβένον πεδίο (evanescent acoustic field), το οποίο εξαρτάται από τη συχνότητα του ακουστικού κύματος και από το ιξώδες και την πυκνότητα του διαλύματος.

Οι μετρήσεις του ακουστικού βιοαισθητήρα αφορούν την ταχύτητα διάδοσης και την ενέργεια του κύματος στο υλικό. Η μεταβολή στην ταχύτητα διάδοσης μετρείται ως μεταβολή στη φάση του κύματος (σε deg) και είναι ευαίσθητη σε μεταβολές της μάζας, της ιξωδοελαστικότητας και των ηλεκτρικών ιδιοτήτων της μεσεπιφάνειας υγρού – στερεού. Η μεταβολή στην ενέργεια του κύματος μετρείται ως μεταβολή στο πλάτος του κύματος (σε dB) και είναι ευαίσθητη σε μεταβολές των ιξωδοελαστικών και ηλεκτρικών ιδιοτήτων της μεσεπιφάνειας. Επομένως, αύξηση στη μάζα που εναποτίθεται στην επιφάνεια του βιοαισθητήρα έχει ως αποτέλεσμα πτώση στη φάση, ενώ αύξηση του ιξώδους πάνω από την επιφάνεια οδηγεί σε πτώση του πλάτους και της φάσης (Ballantine et al., 1997).

3)SELF- ASSEMBLED MONOLAYERS ΓΙΑ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΒΙΟΜΟΡΙΩΝ

Η επιτυχία πολλών εφαρμογών στην μηχανική και την επιστήμη απαιτεί το συγκεκριμένο έλεγχο των ιδιοτήτων επιφάνειας ώστε να εξασφαλιστεί η κατάλληλη απόδοση. Η αλληλεπίδραση του περιβάλλοντος με την επιφάνεια (biointerface) καθορίζει συνήθως την απόδοση μιας αντίδρασης. Η φύση εκμεταλλεύεται το γεγονός αυτό και χρησιμοποιεί επιφάνειες σε αμέτρητες βιολογικές διαδικασίες όπως οι αλληλεπιδράσεις κυττάρων-κυττάρων, υποδοχέα- υποστρώματος (receptor-ligand) κ.λ.π. Το επίπεδο ελέγχου επιφάνειας που συντελείται στα βιολογικά συστήματα, δεν έχει μιμηθεί πλήρως εργαστηριακά. Παρόλα αυτά έχουν αναπτυχθεί διάφορες μεθοδολογίες με σκοπό τον έλεγχο των ιδιοτήτων και των αλληλεπιδράσεων των επιφανειών, σε ηλεκτρονικές και οπτικές συσκευές, βιολογικά υλικά, βιοαισθητήρες κ.λπ. Οι τροποποιήσεις επιφανειών περιλαμβάνουν μεθόδους όπως τη μοριακή επιταξία ακτίνων (molecular beam epitaxy, MBE), την chemical vapor deposition, cvd, την επικάλυψη επιφάνειας με πολυμερή έπειτα από φυγοκέντρηση (spin-coating), την άμεση ομοιοπολική ακινητοποίηση, την προσρόφηση επιφάνειας, τις διεργασίες πλάσματος, και τη χρήση αυτοσυγκροτούμενων μονοστοιβάδων (self-assembled monolayers, SAMs). Από τις μεθόδους αυτές, τα SAMs παρέχουν διάφορα πλεονεκτήματα συμπεριλαμβανομένης της εύκολης προετοιμασίας, του ελέγχου της επιφάνειας με ακρίβεια και πολλών χημικών αντιδράσεων επιφάνειας (Ulman 1996). Αυτά και άλλα πλεονεκτήματα έχουν οδηγήσει σε σχεδιασμό και χρήση των SAMs σε πολλές εφαρμογές συμπεριλαμβανομένης της μοριακής ηλεκτρονικής, των προστατευτικών επιστρωμάτων, και των βιολογικών υλικών. Η χρησιμότητά τους αντανάκλασε στον αριθμό των δημοσιεύσεων που αναφέρονται στα SAMs και στις εφαρμογές τους (εικόνα 10).



Εικόνα 10 . Ο αριθμός των δημοσιεύσεων με θέμα SAMs αλκανοθιολίων σε χρυσό μετά από την ανακάλυψή τους το 1983.

Η αυτοσυγκρότηση, χαρακτηρίζεται από την αυθόρμητη οργάνωση μορίων σε συγκεκριμένες αναπαραγώγιμες διατάξεις. Η αυτοσυγκρότηση, είναι ένας κοινός μηχανισμός στη φύση. Πεπτιδικές αλυσίδες διπλώνονται για να σχηματίσουν πρωτεΐνες και ένζυμα, μονόκλωνο DNA βρίσκει τη συμπληρωματική του αλυσίδα και σχηματίζει μια διπλή έλικα, και φωσφολιπίδια ευθυγραμμίζονται προκειμένου δημιουργήσουν κυτταρικά τοιχώματα και μεμβράνες. Η διαδικασία της αυτοσυγκρότησης επάγεται από ειδικές μοριακές αλληλεπιδράσεις και από την ανάγκη για ελαχιστοποίηση της ενέργειας της αλληλεπίδρασης μεταξύ των μορίων. Η αυτοσυγκρότηση αλκανοθιολών, στο χρυσό αναφέρθηκε αρχικά το 1983 από τους Nuzzo και Allara (Allara 1983) οι οποίοι ανακάλυψαν ότι τα άλκυλο δισουλφύδια και οι αλκανοθιόλες οργανώνονταν αυθόρμητα σε μονοστοιβάδες (monolayers) στο χρυσό. Από τότε, τα SAMs τείνουν να γίνουν ένα ισχυρό ερευνητικό εργαλείο. Η χρησιμότητα των SAMs προέρχεται εν μέρει από τη δυνατότητά τους να δημιουργούν ελεγχόμενη χημεία επιφάνειας, με υψηλή μοριακή οργάνωση και καθορισμένη στοιχειομετρία σε σχετικά μεγάλες περιοχές. Αυτό είναι ένα ιδανικό σύνολο χαρακτηριστικών για ένα πρότυπο σύστημα ή ένα εμπορικό προϊόν. Τα SAMs έχουν διευκολύνει τη μελέτη μοριακών και κυτταρικών αλληλεπιδράσεων, χρησιμοποιώντας συγκεκριμένες λειτουργικές ομάδες, ενέργειες επιφάνειας, επιφανειακά φορτία, ή άλλες διεπιφανειακές ιδιότητες. Εκτός από την δυνατότητα να δημιουργούν ομοιόμορφη και καθορισμένη χημεία, τα SAMs μπορούν να εμφανίζουν συγκεκριμένη λειτουργικότητα ή υποδοχείς ώστε να μελετηθούν βιολογικές αλληλεπιδράσεις, όπως η κυτταρική σηματοδότηση (cell signalling), η κυτταρική προσκόλληση (Allara 1997), και οι πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις (Whitesides 2001). SAMs έχουν χρησιμοποιηθεί επίσης για την κατασκευή των μοριακών διακοπών, βιοαισθητήρων και μικροσυστοιχιών (microarrays).

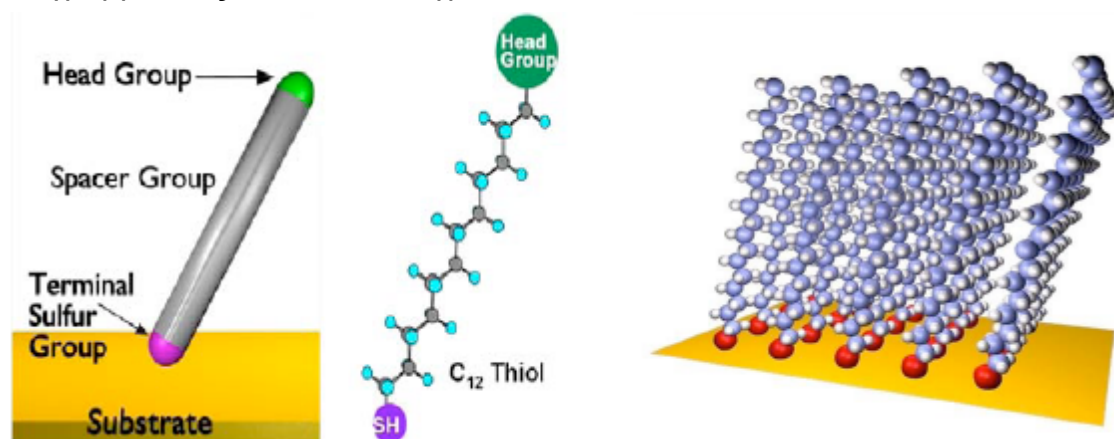
Τα κυριότερα πλεονεκτήματα των αλκανοθιολικών SAMs στο χρυσό συνοψίζονται παρακάτω:

1. Ο χρυσός είναι ένα σχετικά αδρανές μέταλλο, που δύσκολα οξειδώνετε.
2. Ο χρυσός αλληλεπιδρά ισχυρά με το θείο (Allara 1987), κάτι που επιτρέπει το σχηματισμό monolayers παρουσία άλλων λειτουργικών ομάδων. Παραδείγματος χάριν, η δύναμη των ομολυτικών δεσμών των μεθανοθιολών στο Au (111) είναι ~ 45 kcal/mol (Nuzzo 1992).
3. Αλκανοθιόλες μακριάς αλυσίδας σχηματίζουν πυκνά συσκευασμένα, κρυσταλλικά ή ημικρυσταλλικά monolayers στο χρυσό λόγω των δυνάμεων van der Waals μεταξύ των αλυσίδων άνθρακα (Whitesides 1988).
4. Οι μακροσκοπικές ιδιότητες της επιφάνειας μπορούν να αλλάξουν εντυπωσιακά με την αλλαγή της τελικής ω-ομάδας των θιολών. Οι ιδιότητες επιφάνειας περιλαμβάνουν την διαβρεξιμότητα (wettability), την πρωτεϊνική/κυτταρική προσκόλληση και τη κατανομή φορτίων.
5. Η προετοιμασία των SAMs είναι μια απλή διαδικασία που δεν απαιτεί περίπλοκο και ακριβό εξοπλισμό, καθώς και εκτενή εμπειρία για να εκτελεσθεί επιτυχώς.

3.1) Self-Assembled Monolayers θειολών στο χρυσό:

SAMs στο χρυσό έχουν δημιουργηθεί από πολλά μόρια που περιέχουν θείο, συμπεριλαμβανομένων αλκανοθιολών, διάλυτο δισουλφιδίων, και διάλυτο σουλφιδίων. Σε αυτή την εργασία χρησιμοποιήθηκαν SAM αλκανοθιολών στο χρυσό και για αυτό είναι αναγκαίο να αναφερθούμε λεπτομερέστερα.

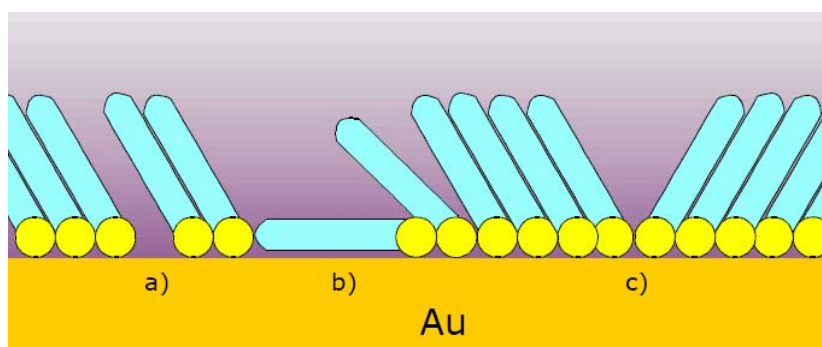
Στην εικόνα 11 παρουσιάζεται μια μακράς αλυσίδας n- αλκανοθιόλη. Το μόριο της αλκανοθιόλης αποτελείται από τρία μέρη, κάθε ένα από τα οποία δραματίζει έναν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της αυτοσυγκρότησης. Κατ' αρχάς, υπάρχει ένα άτομο θείου, το οποίο ενεργεί ως αρχική κατευθυντήρια δύναμη για τη δημιουργία ικανής συγκέντρωσης επιφάνειας θιολών, που οδηγεί σε αυτοσυγκρότηση λόγω της μέσης δύναμης αλληλεπίδρασης του θείου με το χρυσό (~ 45 kcal/mol) (Nuzzo 1992). Υπάρχει το κύριο τμήμα που είναι μια αλυσίδα ανθράκων μεθυλενίου (αλλά μπορεί επίσης να περιέχει διπλούς δεσμούς ή μονάδες perfluoro). Οι δυνάμεις van der Waals μεταξύ αυτών των ανθράκων μεθυλενίου παρέχουν μια κατευθυντήρια δύναμη αυτοσυγκρότησης (Nuzzo 1992). Το τρίτο τμήμα μιας αλκανοθιόλης είναι η τελική λειτουργική ω-ομάδα (head group). Η ω-ομάδα μπορεί να έχει οποιαδήποτε επιθυμητή λειτουργικότητα. Οι ιδιότητες της ω-ομάδας καθορίζουν τις ιδιότητες της επιφάνειας του monolayer δεδομένου ότι είναι η ομάδα που είναι εκτεθειμένη στην εξωτερική επιφάνεια του. Ανάλογα με τις ιδιότητες και το μέγεθος της, μπορεί να ενεργήσει ως περαιτέρω κατευθυντήρια δύναμη για την αυτοσυγκρότηση (π.χ. δεσμοί υδρογόνου μεταξύ ω-ομάδα- ω-ομάδα μπορεί να σταθεροποιήσει το monolayer), ή μπορεί να ενεργήσει ως καταστρεπτική δύναμη διακόπτοντας την αυτοσυγκρότηση (π.χ. εάν η ω- ομάδα είναι ογκώδης ή προκαλεί ηλεκτρονικές απώσεις). Η αλληλεπίδραση μεταξύ των τριών, διαφορετικών χημικά τμημάτων μέσα στο μόριο της αλκανοθιόλης καθορίζει την διάταξη και τη σταθερότητα του τελικού monolayer. Η εικόνα 12 παρουσιάζει το σχηματικό διάγραμμα ενός τέλεια διατεταγμένου SAM αλκανοθιολών.



Εικόνα11 . αλκανοθιόλες που μπορούν να σχηματίσουν SAM

Εικόνα 12 . τέλεια διατεταγμένο SAM αλκανοθιολών.

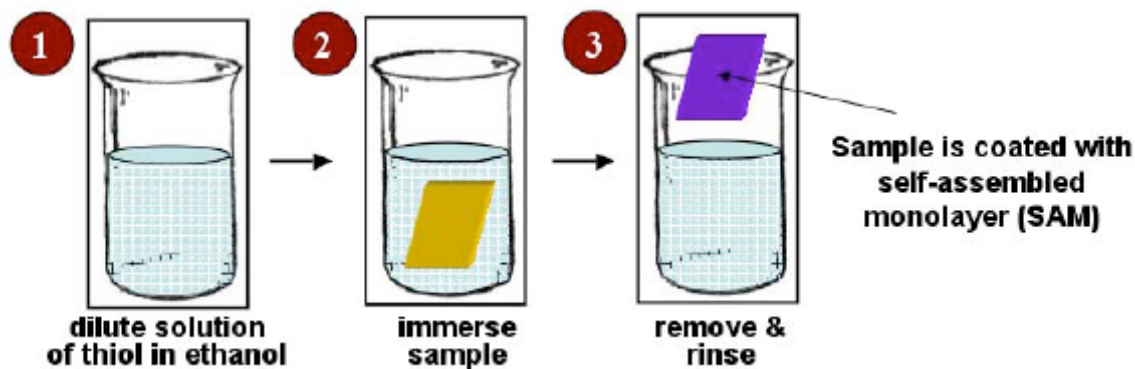
Τα monolayer, παρόλα αυτά, παρουσιάζουν και ατέλειες. Οι κύριες ατέλειες που εμφανίζονται είναι τρεις: α) μικρές τρύπες (pinholes), β) περιοχές όπου το monolayer έχει καταρρεύσει (collapse sites), και γ) περιοχές όπου κομμάτια θειολών έχουν διαφορετική κατεύθυνση (εικόνα 13). Ουσιαστικά τα SAMs θεωρούνται, ότι δεν περιέχουν τρύπες. Στα σημεία όπου εμφανίζονται, τα μόρια των θειολών που βρίσκονται κοντά, λυγίζουν αρκετά και "καταρρέουν". Με τον τρόπο αυτό οι τρύπες καλύπτονται. Το τρίτο είδος ατέλειας που εμφανίζεται στα monolayer, οφείλεται σε διαφορετική κατεύθυνση τμημάτων (domains) θειολών. Σχηματίζονται, έτσι, κενά μεταξύ των τμημάτων αυτών, που επιτρέπουν σε ιόντα να πλησιάσουν την επιφάνεια του χρυσού. Το αποτέλεσμα αυτού του φαινομένου είναι η μείωση του πάχους του monolayer.



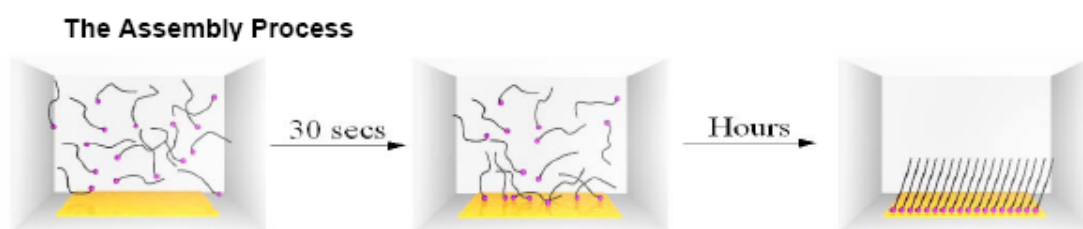
Εικόνα 13. ατέλειες που εμφανίζονται στα monolayers . a) pinholes, b) collapse sites, c) boundaries of different oriented domains

3.2) The Self-Assembly Process

Η προετοιμασία SAMs περιλαμβάνει τη βύθιση ενός υποστρώματος καλυμμένου με χρυσό σε ένα αραιό αιθανολικό διάλυμα αλκανοθιολών (εικόνα 14). Το Monolayer σχηματίζεται αυθόρμητα στην επιφάνεια του υποστρώματος κατά τη διάρκεια των επόμενων μιας έως εικοσιπενσσάρων ωρών. Αρχικά, μέσα σε μερικά δευτερόλεπτα ως λεπτά, διαμορφώνεται ένα όχι καλά διατεταγμένο monolayer. Μέσα σε αυτό το πρόωρο χρονικό διάστημα, το πάχος φθάνει στο 80 - 90% της τελικής του τιμής. Όσο το monolayer συνεχίζει να διαμορφώνεται, οι δυνάμεις van der Waals μεταξύ των υδρογονανθρακικών αλυσίδων βοηθούν τα μόρια να συσκευαστούν σε ένα καλά-διατεταγμένο, κρυσταλλικό monolayer. Κατά τη διάρκεια αυτής της φάσης, εκτοπίζονται οι μολυσματικοί παράγοντες (π.χ. τυχαίο υδρογονάνθρακες στο χρυσό), οι διαλύτες αποβάλλονται από το monolayer, και οι ατέλειες μειώνονται, ενώ το πακετάρισμα ενισχύεται από την αυξανόμενη αλληλεπίδραση των αλκανοθιολών.

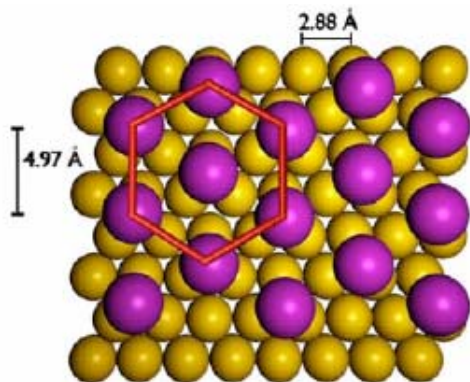


Εικόνα 14 . σχηματική αναπαράσταση της εργαστηριακής διεργασίας σχηματισμού SAM

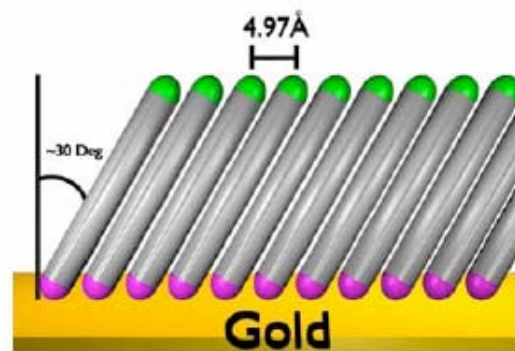


Εικόνα15 . Σχηματική αναπαράσταση της εργαστηριακής διεργασίας σχηματισμού SAM

Ο ρυθμός σχηματισμού monolayer και η δύναμη προσρόφησης διαφέρουν ελαφρώς μεταξύ αλκανοθειολών ή δι-*n*-διάλυτο δισουλφίδια. Πειράματα, ανταγωνιστικής προσρόφησης που εκτελούνται με $\text{HS}(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3 + (\text{HO}(\text{CH}_2)_{11}\text{S})_2$ και $\text{HS}(\text{CH}_2)_{10}\text{OH} + (\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{S})_2$ σε ποικίλες συγκεντρώσεις, φανερώνουν ότι η προσρόφηση των θιολικών ομάδων υπερισχύει έναντι των δισουλφιδικών (Whitesides 1994). Επιπλέον, ο ρυθμός εκτόπισης των διάφορων μορίων, λόγω του σχηματισμού SAMs από τις θιόλες ήταν γρηγορότερος από τον αντίστοιχο που προκαλούν τα δισουλφίδια. Τα καλά διατεταγμένα SAMs περιέχουν αλκανοθιόλες σε ένα εξαγωνικό κρυσταλλικό πλέγμα με διάταξη $(\sqrt{3} \times \sqrt{3})R30^\circ$. Η απόσταση των αλκαλικών αλυσίδων είναι 4.97 Å, όπως καθορίζεται από τη χαμηλής ενέργειας διάθλαση ηλεκτρονίων (LEED) (εικόνα 16) . (Whitesides 1988)



Εικόνα 16. Κρυσταλλικό πλέγμα Au(111)(κίτρινοι κύκλοι), με κρυσταλλικό πλέγμα θειολών (μοβ κύκλοι) σε διάταξη $(\sqrt{3} \times \sqrt{3})R30^\circ$. Η απόσταση μεταξύ των ατόμων θείου είναι 4.99 Å



Εικόνα 17. Καλά διατεταγμένο monolayer ακλανοθιολών. Προκειμένου να μεγιστοποιηθούν οι δυνάμεις van der Waals μεταξύ των υδρογονανθρακικών αλυσίδων, οι θειόλες στρέφονται $\sim 30^\circ$ από το επίπεδο της επιφάνειας.

Η απόσταση μεταξύ των υδρογονανθρακικών αλυσίδων είναι περίπου ίδια με την απόσταση μεταξύ γειτονικών ατόμων θείου, 4.99 Å. Αυτή η απόσταση είναι σχεδόν τρεις φορές μεγαλύτερη της διαμέτρου van der Waals ενός ατόμου θείου (1.85 Å) κάτι που φανερώνει ελάχιστες S-S αλληλεπιδράσεις. Αυτή η απόσταση είναι επίσης μεγαλύτερη από την μικρότερη δυνατή απόσταση των αλκυλικών αλυσίδων (4.24 Å). Λόγο αυτής της διαφοράς, οι υδρογονανθρακικές αλυσίδες τοποθετούνται με κλίση 30° ως προς την επιφάνεια, ώστε να μεγιστοποιηθούν οι αλληλεπιδράσεις van der Waals (εικόνα 17). Η γωνία της κλίσης είναι ουσιαστικά ανεξάρτητη από τις χημικές ιδιότητες της ω-ομάδας, με μοναδικό περιορισμό η ω-ομάδα να μην είναι μεγαλύτερη από την απόσταση μεταξύ των αλκανικών αλυσίδων ($\sim 5\text{Å}$). Η επιφάνεια που καλύπτεται από τις θειόλες, έχει αναφερθεί ότι είναι $18 \text{ \AA}^0(2)$ (Finklea,1996). Λαμβάνοντας υπ' όψιν ότι τα monolayers οργανώνονται σε εξαγωνικά κρυσταλλικά πλέγματα με διάταξη $(\sqrt{3} \times \sqrt{3})R30^\circ$, για μακριάς αλυσίδας θιόλες, η πυκνότητα επιφανείας είναι $7.6 \cdot 10^{-10} \text{ mol/cm}^2$ ή $4.6 \cdot 10^{14} \text{ molecules/cm}^2$.(Ning Gu,2005)

Η σημασία των αλληλεπιδράσεων van der Waals μεταξύ των αλυσίδων μεθυλενίου μπορεί εξεταστεί με αλλαγές στο μήκος των αλυσίδων. Γενικά, όσο μακρύτερη είναι η αλυσίδα, τόσο πιο καλά διατεταγμένο monolayer σχηματίζεται (Whitesides 1989). Έχει αναφερθεί αξιοπρόσεχτη πτώση στο ελλειψομετρικό πάχος των monolayers που διαμορφώνονται από αλκανοθιόλες με αλυσίδες με λιγότερα από $n = 8$ άτομα άνθρακα (chidsey 1987). Επίσης ο Bain et al, ανέφεραν γωνίες επαφών $\theta_{\text{air}}(\text{water}) = 111 - 114^\circ$ and $\theta_{\text{air}}(\text{hexadecane}) = 45 - 48^\circ$ για αλυσίδες με $n > 10$ άτομα άνθρακα, αλλά χαμηλότερες γωνίες επαφών για αλυσίδες $n < 10$. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα monolayers με κοντύτερες αλυσίδες είναι λιγότερο καλά διαταγμένα (Whitesides 2001, Chidsey 1987).

3.3) Παράγοντες που επηρεάζουν την διάταξη ενός monolayer:

Η τελική διάταξη και η ποιότητα του monolayer εξαρτώνται από διάφορους παράγοντες όπως:

1. την καθαρότητα της αρχικής χρυσής επιφάνειας
2. την καθαρότητα των αλκανοθιολών και του διαλύτη που χρησιμοποιείτε
3. Το μήκος και την σύνθεση της υδρογονανθρακικής αλυσίδας
4. Ο τύπος ω- ομάδας (μέγεθος και ιδιότητες)
5. Το χρονικό διάστημα αφήνεται το monolayer να σχηματιστεί

3.3.1) Καθαρότητα του χρυσού:

Λόγω της υψηλής ενέργειας επιφάνειας του χρυσού, "καθαρός " χρυσός μπορεί μόνο να δημιουργηθεί υπό συνθήκες κενού. Μόλις εκτίθεται μια χρυσή επιφάνεια στον αέρα καλύπτετε αμέσως με ένα στρώμα του τυχαίων υδρογονανθράκων. Στην πραγματικότητα, η σύνθεση μιας τυπικής χρυσής επιφάνειας είναι 50% άνθρακας, 40% χρυσός και 10% οξυγόνο (ατομικά ποσοστά όπως καθορίζονται από φασματοσκοπία φωτοηλεκτρονίων ακτίνων -X ή XPS). Αυτό το στρώμα υδρογονανθράκων θα είναι πάντα παρόν εάν η χρυσή επιφάνεια εκτεθεί στον αέρα. Για να σχηματιστεί λοιπόν ένα καλά διατεταγμένο monolayer θα πρέπει οι θειόλες να αντικαταστήσουν τους υδρογονάνθρακες. Εντούτοις, η παρουσία τυχαίων υδρογονανθράκων δεν είναι δημιουργεί τόσα προβλήματα όσο άλλοι μολυσματικούς παράγοντες επιφάνειας όπως τα λάδια (από τις αντλίες, το δέρμα ή άλλες πηγές), άλλα μέταλλα (από μη καθαρές πηγές χρυσού ή μη καθαρούς διαλύτες) και οι κοινά πολυμερή όπως το πολυ -διμεθυλικό- συλοξάνιο (poly(dimethyl siloxane), PDMS). Λόγω της ισχυρής κατευθυντήριας δύναμης της αλληλεπίδρασης Au-S, την σταθεροποίηση μέσω των αλληλεπιδράσεων van der Waals, και την έλλειψη μιας ογκώδους ω-ομάδας, τυπικές ω-μέθυλο αλκανοθιόλες με μακριές υδρογονανθρακικές αλυσίδες (~10 άτομα άνθρακα) είναι σε θέση να αντικαταστήσουν την τυχαία μόλυνση. Για άλλες θειόλες με ογκώδεις, εύκαμπτες, ή φορτισμένες ω-ομάδες, η καθαρότητα του χρυσού είναι σημαντικότερη. Αυτοί οι τύποι ω-ομάδων μπορούν να μειώσουν την κατευθυντήρια δύναμη, καθιστώντας δυσκολότερη την αντικατάσταση των μολυσματικών παραγόντων από τη χρυσή επιφάνεια. Σε κάθε περίπτωση, συνίσταται να χρησιμοποιείται άμεσα σχηματισμένη επιφάνεια χρυσού, και εάν είναι απαραίτητο οι χρυσές επιφάνειες αποθηκεύονται κάτω από αδρανές αέριο.

3.3.2) Καθαρότητα αλκανοθειολών:

Για να καταλάβει κανείς, γιατί ή μη καθαρές αλκανοθειόλες μπορούν να είναι προβληματικές, είναι σημαντικό να δούμε πώς οι αλκανοθειόλες συμπεριφέρονται σε ανταγωνιστική προσρόφηση. Όλες οι αλκανοθειόλες δεν έχουν την ίδια συγγένεια για το χρυσό. Μερικές θειόλες συναγωνίζονται άλλες όσον αφορά την προσρόφηση τους σε συγκεκριμένη επιφάνεια, οδηγώντας έτσι σε monolayer με διαφορετική επιφανειακή σύσταση από εκείνη που υπάρχει στο διάλυμα. Παραδείγματος χάριν, αλκανοθειόλες με μακρύτερες αλκανικές αλυσίδες θα σχηματίσουν monolayer γρηγορότερα από ένα μίγμα με αλκανοθειόλες με κοντύτερες αλυσίδες. Αυτό σημαίνει ότι σε μια ανταγωνιστική προσρόφηση θιολών με μακριές και κοντές αλυσίδες, σε μια δεδομένη σύσταση διαλύματος, η προκύπτουσα επιφάνεια θα εμπλουτιζόταν κυρίως με την μακρύτερη αλκανοθειόλη.

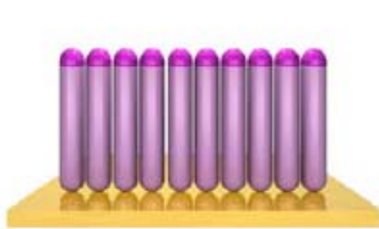
Θειόλες με μικρές ω-ομάδες τείνουν να συναγωνίζονται και να υπερισχύουν με ογκωδέστερες ω-ομάδες. Παρόλα αυτά σε ένα μίγμα θειολών με ευθεία αλυσίδα και θειολών με ογκώδη ω-ομάδα, αναμένετε να κυριαρχήσει η πρώτη. Η παρουσία προσμίξεων σε θειολικά διαλύματα δημιουργεί μια ανταγωνιστική κατάσταση προσρόφησης. Συχνά οι προσμίξεις είναι ίχνη πρόδρομων μορίων που δεν αφαιρέθηκαν από το τελικό προϊόν κατά τη διάρκεια του καθαρισμού. Ανάλογα με τον τρόπο σύνθεσης, είναι δυνατό αυτά τα πρόδρομα μόρια να περιέχουν ομάδες θείου. Για θειόλες με ευθείες αλυσίδες, αυτοί οι τύποι προσμίξεων δεν παρεμποδίζουν την αυτοσυγκρότηση, επειδή τα μόρια ευθειών αλυσίδων παρουσιάζουν ισχυρή συγγένεια για τη χρυσή επιφάνεια. Αυτές οι δυνάμεις επιτρέπουν την διαμόρφωση ενός ομοιόμορφου monolayer.

3.3.3) Το μήκος της υδρογονανθρακικής αλυσίδας:

Οι θειόλες με μακριές αλυσίδες τείνουν να διαμορφώσουν καλά διατεταγμένα monolayers. Συγκεκριμένα, για ένα καλά διατεταγμένο monolayer συνίσταται η χρησιμοποίηση θιολών με μακριά αλυσίδα και μικρή ω-ομάδα. Επίσης έχει αναφερθεί, ότι ένα καλά διατεταγμένο monolayer σχηματίζεται από θειόλες με > 10 άτομα άνθρακα (Whitesides 1989).

3.3.4) Τύπος ω-ομάδας:

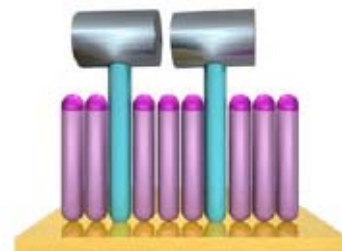
Για να δημιουργηθεί ένα monolayer, οι θειόλες πρέπει να συσκευάσουν σε ένα κρυσταλλικού τύπου πλέγμα. Όπως με οποιοδήποτε κρυσταλλικό πλέγμα, έτσι και στην περίπτωση των monolayers απαιτούνται ομοιόμορφα, γεωμετρικά καθορισμένα συστατικά. Παραδείγματος χάριν, κάποιος μπορεί να τακτοποιήσει σε μια "σφιχτότερη δέσμη" δέκα 1-ίντσας σε διάμετρο σωλήνες (εικόνα 18) παρά δέκα σφυριά παρόμοιου μήκους (εικόνα 19). Ομοίως, θειόλες με ευθείες υδρογονανθρακικές αλυσίδες σχηματίζουν καλά διατεταγμένα monolayers με λίγες ατέλειες, εν' αντιθέσει με τις θειόλες με ογκώδεις ω-ομάδες που διαμορφώνουν λιγότερο διατεταγμένα monolayers. Αυτή η αταξία οφείλεται στις στερεοχημικές παρεμποδίσεις.



Εικόνα 18 . Καλά διατεταγμένοι 1 ίντσας διαμέτρου σωλήνες



Εικόνα 19 . Το μεγάλο κεφάλι του σφυριού δεν επιτρέπει την καλή διάταξη τους



Εικόνα 20 . Οι σωλήνες δρουν σαν διαχωριστικά και βοηθούν την καλή διάταξη των σφυριών

Εάν για μια δεδομένη εφαρμογή απαιτείται monolayer με ογκώδη ω-ομάδα, είναι συχνά δυνατό να χρησιμοποιηθεί ένα μικτό monolayer. Συγκεκριμένα, θειόλες με κοντύτερη αλυσίδα άνθρακα και μικρή ω-ομάδα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως διαχωριστικά, από κοινού με μακρύτερης αλυσίδας θειόλες που φέρουν την επιθυμητή μεγάλη ω-ομάδα (εικόνα 20).

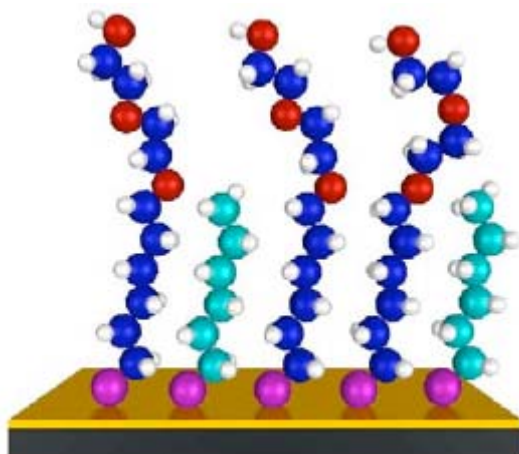
3.4) Κινητική σχηματισμού Monolayer:

Η διαδικασία της αυτοσυγκρότησης είναι γρήγορη. Για τις περισσότερες θειόλες, το monolayer διαμορφώνεται μετά από μερικά λεπτά. Μετά την αρχική διαμόρφωση οι αλλαγές συνεχίζονται καθώς όλο και περισσότερες θειόλες εισέρχονται στο monolayer και τα μόρια διευθετούνται ώστε να αποκτήσουν την καταλληλότερη διαμόρφωση. Αυτή η διαδικασία μπορεί να πάρει από ώρες έως ημέρες ώστε να οδηγήσει σε ένα τέλεια διατεταγμένο monolayer. Το χρονικό διάστημα που απαιτείται για να σχηματιστεί ένα υψηλής τάξης monolayer εξαρτάτε από την αρχική συγκέντρωση του διαλύματος, τη θερμοκρασία, και τις ιδιότητες της θειόλης που χρησιμοποιείτε. Γενικά ο σχηματισμός monolayers από αραιά διαλύματα απαιτεί πιο μεγάλο χρόνο από εκείνα που σχηματίζονται χρησιμοποιώντας πιο συγκεντρωμένα διαλύματα. Για τα περισσότερα monolayers, 1 έως 2 ημέρες θα οδηγήσουν σε κατάσταση ισορροπίας, όπου η πλειοψηφία των μορίων τακτοποιείται σύμφωνα με την τελική, βέλτιστη διαμόρφωσή τους.

3.5) Συνήθεις χρήσεις των SAMs:

3.5.1) Μικτά monolayers:

Μια δημοφιλής προσέγγιση για την κατασκευή επιφανειών με συγκεκριμένες ιδιότητες είναι η χρησιμοποίηση μικτών monolayer, που αποτελούνται από δύο θιόλες με διαφορετικές, ω -ομάδες (εικόνα 21). Με κατάλληλο σχεδιασμό και πειραματισμό, μπορεί να επιτευχθεί η επιθυμητή συγκέντρωση των λειτουργικών ομάδων στην επιφάνεια, διατηρώντας τη γενική δομή monolayer. Επιπλέον, διαφορετικές λειτουργικές ομάδες μπορούν να εισαχθούν συγχρόνως με τη χρησιμοποίηση περισσότερων από δύο θειολών. Εάν είναι απαραίτητο, αυτές οι διαφορετικές λειτουργικές ομάδες μπορούν να τροποποιηθούν χημικά, ώστε να εμφανίσουν νέα χημεία επιφάνειας.



Εικόνα 21 . Αναπαράσταση ενός μικτού monolayer που περιέχει μια θιόλη με μικρή υδρογονανθρακική αλυσίδα και μια θιόλη με αιθυλενο- γλυκόλη (ethylene glycol, EG) στα ακρά της.

Προκειμένου να ληφθεί η επιθυμητή σύσταση της επιφάνειας είναι απαραίτητο να γίνουν αρκετές πειραματικές δοκιμές. Αυτό γίνεται λόγω της διαφορετικής προσρόφησης των θειολών με διαφορετικά μήκη και τις ω -ομάδες. Συχνά παρατηρείται μεγαλύτερη προσρόφηση της μιας θειόλης έναντι της άλλης . Γενικά τα φαινόμενα αυτά εξαρτώνται από το μήκος των υδρογονανθρακικών αλυσίδων και τις ιδιότητες της ω -ομάδας (Whitesides 1989). Οι θειόλες με μακρύτερες αλυσίδες προσροφούνται καλύτερα από εκείνες με κοντύτερες αλυσίδες, με την προϋπόθεση να φέρουν ω -ομάδες με ίδιες ιδιότητες. Επίσης έχει αναφερθεί ότι σε ανταγωνιστική προσρόφηση ευνοούνται περισσότερο εκείνες με μη πολικές ω -ομάδες, παρά εκείνες με πολικές.

Ένας άλλος παράγοντας που επηρεάζει τα μικτά monolayers είναι η πιθανότητα διαχωρισμού φάσης των μιγμάτων στην επιφάνεια. Σε μερικές περιπτώσεις, ο διαχωρισμός φάσης μπορεί να έχει επιπτώσεις στην επιθυμητή απόδοση των monolayers. Παραδείγματος χάριν, η επιτυχής ακινητοποίηση μεγάλων βιομορίων όπως πρωτεΐνες, αντισώματα ή πεπτιδία απαιτεί συγκεκριμένη απόσταση μεταξύ των λειτουργικών ομάδων ώστε να αποτραπούν στερεοχημικές παρεμποδίσεις. Εάν οι θειόλες που χρησιμοποιούνται, και οι οποίες φέρουν συγκεκριμένες λειτουργικές ομάδες, εμφανίζουν διαχωρισμό φάσης, η επιθυμητή βιολογική αναγνώριση μπορεί να

μικρύνει ή να παρεμποδιστεί εντελώς. Διαχωρισμός φάσης έχει αναφερθεί σε περιπτώσεις SAMs που αποτελούνται από θειόλες με διαφορετικού μήκους υδρογονανθρακικές αλυσίδες. Παρόλα αυτά τα μικτά monolayers αποτελούν ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο για τη δημιουργία λειτουργικών επιφανειών που μπορούν να εφαρμοστούν σε απεριόριστες ερευνητικές εφαρμογές. Με κατάλληλο σχεδιασμό μπορεί να επιτευχθεί ακριβής έλεγχος της χημείας επιφάνειας. Αυτό επιτρέπει μελέτες συγκεκριμένων χημικών και βιολογικών αλληλεπιδράσεων.

3.5.2) Patterning:

Πολλές εφαρμογές στην εφαρμοσμένη μηχανική επιφάνειας απαιτούν καθορισμένη χημεία σε συγκεκριμένες θέσεις μίας επιφάνειας. Παραδείγματος χάριν, το patterning μιας επιφάνειας θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για να δημιουργηθούν arrays κυττάρων όπου ένας συγκεκριμένος τύπος κυττάρων θα προσκολλάται σε συγκεκριμένες περιοχές της επιφάνειας. Αυτό θα επέτρεπε τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων κυττάρων με συγκεκριμένες χημείες επιφάνειας και συγκεκριμένα υποστρώματα. Η αυτοσυγκρότηση των θειολών επιτρέπει μια ποικιλία μεθόδων patterning, όπως ultraviolet (UV) (Leggett 1996, Gillen 1993), photopatterning (Dellamarche 1993), microcontact printing (Whitesides 1999), και dip-pen lithography.

3.6) Είδη θιολών- εφαρμογές:

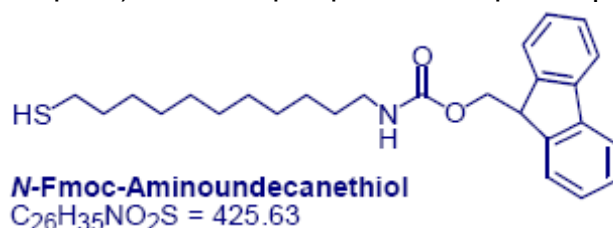
Υπάρχουν πολλά είδη αλκανοθειολών, με διαφορετικές υδρογονανθρακικές αλυσίδες και λειτουργικές ω-ομάδες (head groups), που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για ακινητοποίηση βιομορίων. Είναι λοιπόν σημαντικό να αναφερθούμε στις κυριότερες.

3.6.1) Αμινο-αλκανο-θειόλες (Aminoalkanethiols):

Οι aminoalkanethiols χρησιμοποιούνται για την τροποποίηση μιας επιφάνειας χρυσού, εισάγοντας αμινο ομάδες. Η αμινο ομάδα αντιδρά συνήθως με αμινο-δραστικά υλικά, όπως τα πρωτεϊνικά μόρια ή τα βιολογικά υλικά, η χρυσή επιφάνεια. Αν και έχει αναφερθεί σε πολλές περιπτώσεις η χρησιμοποίηση aminoalkanethiols μικρής αλκαλικής αλυσίδας, πιο ευρέως χρησιμοποιούνται, εκείνες μακρών αλκυλικών αλυσίδων.

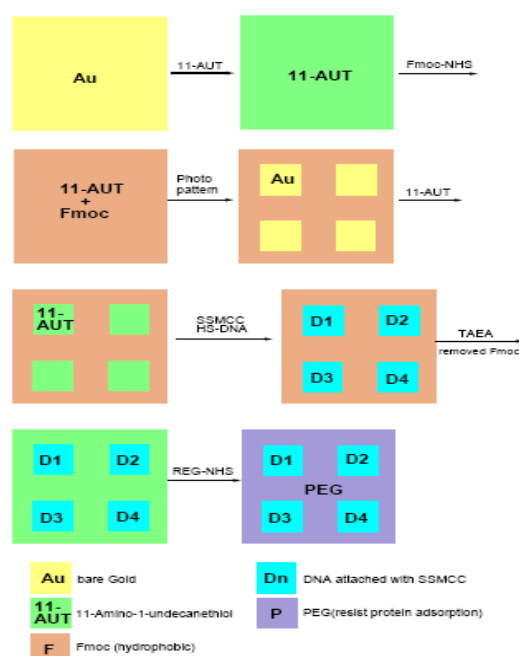
3.6.2) N-Fmoc αμινο-αλκανο-θειόλες (N-Fmoc Aminoalkanethiols):

Οι N - Fmoc Aminoalkanethiols είναι ενώσεις των οποίων η ω-αμινο ομάδα προστατεύεται από την ομάδα Fmoc (εικόνα 22). Η Fmoc-ομάδα μπορεί να αφαιρεθεί υπό ήπιες συνθήκες (βύθιση για 30 λεπτά σε 20% πιπεριδίνη / ακετονιτρίλιο), ώστε να μπορεί να αντιδράσει η αμινο ομάδα.



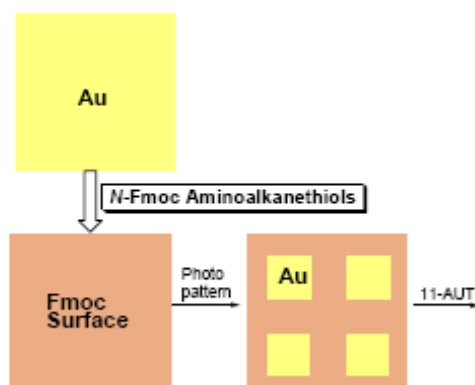
Εικόνα 22: N-Fmoc-Aminoundecanethiol

Έχει αναφερθεί (Brockman & co-workers) διαδικασία με την οποία προστατεύτηκε, με την ομάδα Fmoc, η αμινο-ομάδα της 11-amino-1-undecanethiol μετά τον σχηματισμό, 11-αμινο-1-undecanethiol SAMs, προκειμένου να κατασκευαστούν DNA arrays με UV photopatterning και μια πολύπλοκη χημική διαδικασία. Με τον τρόπο αυτό μελετήθηκαν αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών-DNA με SPR imaging (εικόνα 23).



Εικόνα 23: Κατασκευή DNA μικροστοιχείας

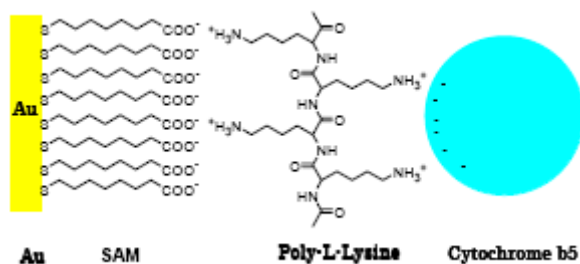
Οι *N*-Fmoc αμινοαλκανθειόλες αναμένεται να χρησιμοποιηθούν σε παρόμοιες τεχνικές. Τα SAMs *N*-Fmoc αμινοαλκανθειόλες μπορεί να χρησιμοποιηθούν για να αποφευχθεί η αλληλεπίδραση της αμινο-ομάδας με την επιφάνεια χρυσού και για να αναπτυχθεί ένα sensor-chip που ρυθμίζεται με photopatterning (εικόνα 24).



Εικόνα 24: Εφαρμογή των *N*-Fmoc Αμινοαλκανθειόλες

3.6.3) Καρβόξυ-αλκανο-θειόλες (Carboxyalkanethiols):

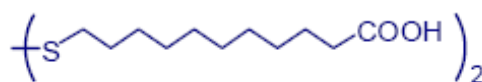
Οι Carboxyalkanethiols χρησιμοποιούνται για την τροποποίηση μιας επιφάνειας χρυσού, εισάγοντας καρβοξυλικές ομάδες. Η καρβοξυλική ομάδα, συχνά μετατρέπεται σε ενεργοποιημένο *N*-hydroxysuccinimide εστέρα, ο οποίος ενώνεται με πρωτοταγής αμίνες βιομορίων. Για παράδειγμα χρησιμοποιήθηκαν carboxyalkanethiol και poly-L-lysine ώστε να ακινητοποιηθεί το κυτόχρωμα b5 σε ηλεκτρόδιο (Glenn and co-workers) (εικόνα 25).



Εικόνα 25: Ακινητοποίηση του κυτοχρώματος b5 σε SAM Carboxyalkanethiol, μέσω poly-L-lysine.

3.6.4) Καρβόξυ- αλκυλο-δισουλφίδια (Carboxyalkyldisulfides)

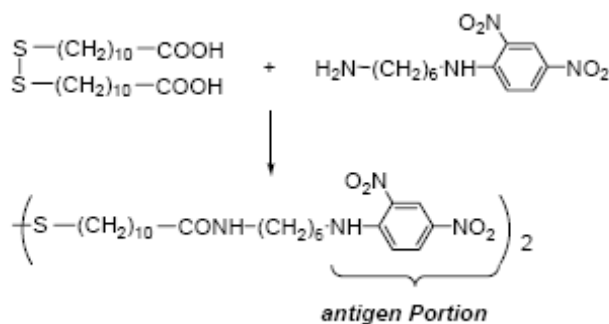
Τα Carboxyalkyldisulfides είναι οξειδωμένες ενώσεις των carboxyalkanethiols και σχηματίζουν παρόμοια SAMs με εκείνα των carboxyalkanethiols. Είναι λιγότερο δύσσομα και πιο σταθερά από τις θειόλες (εικόνα 26).



10-Carboxydecyl disulfide
 $C_{22}H_{42}O_4S_2 = 434.69$

Εικόνα 26: 10-Carboxydecyl disulfide

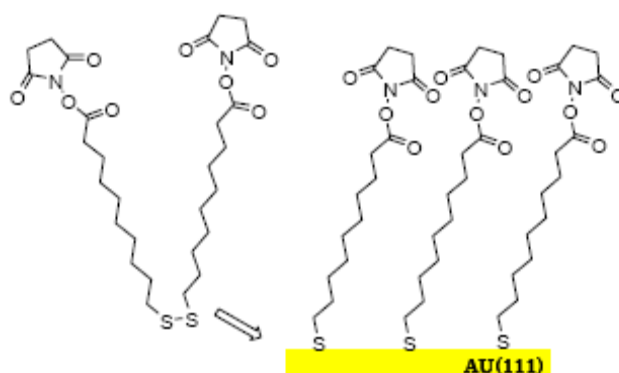
Ο Delamarche και οι συνεργάτες του κατασκεύασαν 10-carboxydecyl disulfide SAMs σε επιφάνεια χρυσού, και εισήγαγαν ομάδες βενζοφαινόνης, που είναι φωτοενεργή, στην ακρή τους. Μετά από μετατροπή του, που προέρχεται από την σύνδεση πρωτεΐνης (IgG), εξετάστηκε με ποικίλες τεχνικές χαρακτηρισμού (ellipsometry, ακτίνων X φασματοσκοπία φωτοηλεκτρονίων, AFM κ.λ.π) (εικόνα 27).



Εικόνα 27: Η ακινητοποίηση του φωτοενεργού αντιδραστήριου σε SAMs. 10-carboxydecyl disulfide.

3.6.5) Succinimidylester-terminated alkyldisulfides

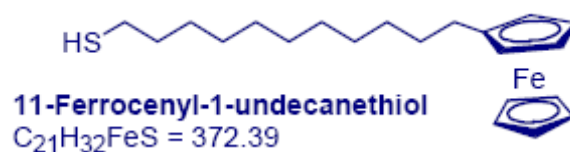
Τα succinimidylester-terminated alkyldisulfides είναι αμίνο-δραστικά ανάλογα των carboxyalkyldisulfide. Χρησιμοποιούνται για να εισαχθούν αμινο-δραστικές ομάδες στην επιφάνεια χρυσού. Δεν είναι ανάγκη να χρησιμοποιηθούν οι αντιδραστήρια σύζευξης επειδή αυτές οι ενώσεις έχουν ενεργοποιηθεί ήδη (εικόνα 28).



Εικόνα 28: SAMs που αποτελούντε από Succinimidylester-terminated alkyldisulfides.

3.6.6) Ferrocenylalkanethiols:

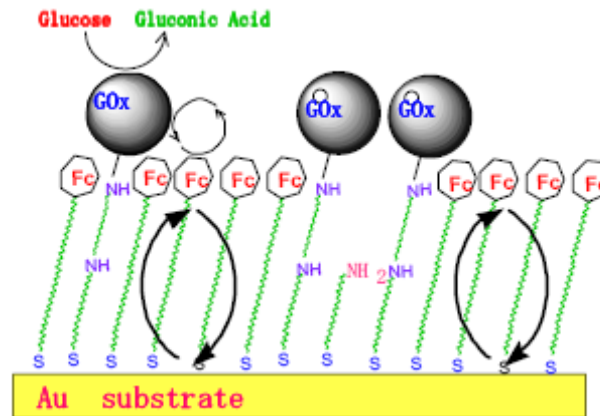
Οι ferrocenylalkanethiols χρησιμοποιείται για την τροποποίηση επιφάνειας χρυσού για να εισαχθούν σε αυτήν ηλεκτροχημικά ενεργά μόρια (εικόνα 29). Τέτοιου είδους επιφάνειες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανάπτυξη ευαίσθητων ηλεκτροχημικών αναλύσεων.



Εικόνα 29: 11-Ferrocenyl-1-undecanethiol

Ο *Rubin et al*, κατασκεύασαν μικτά, aminoalkanethiols και ferrocenyl-alkanethiols SAMs, με διάφορα μήκη αλυσίδων, στην χρυσή επιφάνεια ενός ηλεκτροδίου. Έπειτα ακινητοποίησαν την οξειδάση της γλυκόζης (GOx) στις aminoalkanethiol περιοχές και χρησιμοποίησαν τις ferrocenylalkanethiol περιοχές σαν συνδέσμους ηλεκτρονίων (electron mediator). Με τον τρόπο

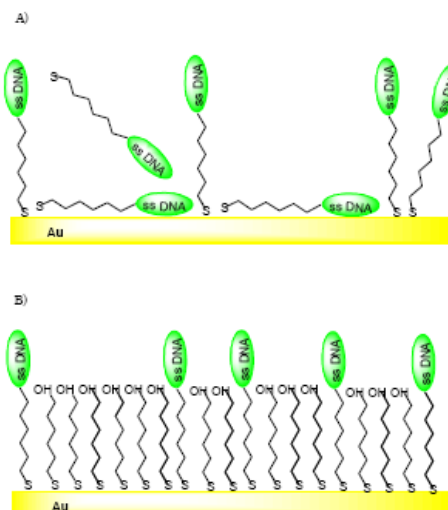
αυτό μελετήθηκε η σχέση μεταξύ της ηλεκτρικής απόκρισης και του μήκους των αλυσίδων των μικτών SAMs (εικόνα 30).



Εικόνα 30: Ακίνητοποίηση της οξειδάσης της γλυκόζης (GOx) σε επιφάνεια χρυσού

3.6.7) Υδρόξυ-αλκανο-θειόλες (Hydroxyalkanethiols):

Οι hydroxyalkanethiols χρησιμοποιούνται ως "αντιδραστήρια διαλύσεων" (dilution reagents) ή "αντιδραστήρια μπλοκαρίσματος" (blocking Reagents) ώστε να ελεγχθεί η πυκνότητα των δραστικών ομάδων επάνω στην επιφάνεια του χρυσού ή για να αποτραπεί η μη ειδική σύνδεση των αναλυτών. Για παράδειγμα ο *Herne et al*, κατασκεύασαν μικτά SAMs που αποτελούνταν από μονόκλωνο DNA συνδεδεμένο σε θειόλη (thiol-derivatized single-stranded DNA, HS-ss-DN) και 6- υδρόξυ-1-εξανοθειόλη (6-hydroxy-1-hexanethiol). Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα να αποτραπεί η μη ειδική σύνδεση του μονόκλωνου DNA (εικόνα 31).



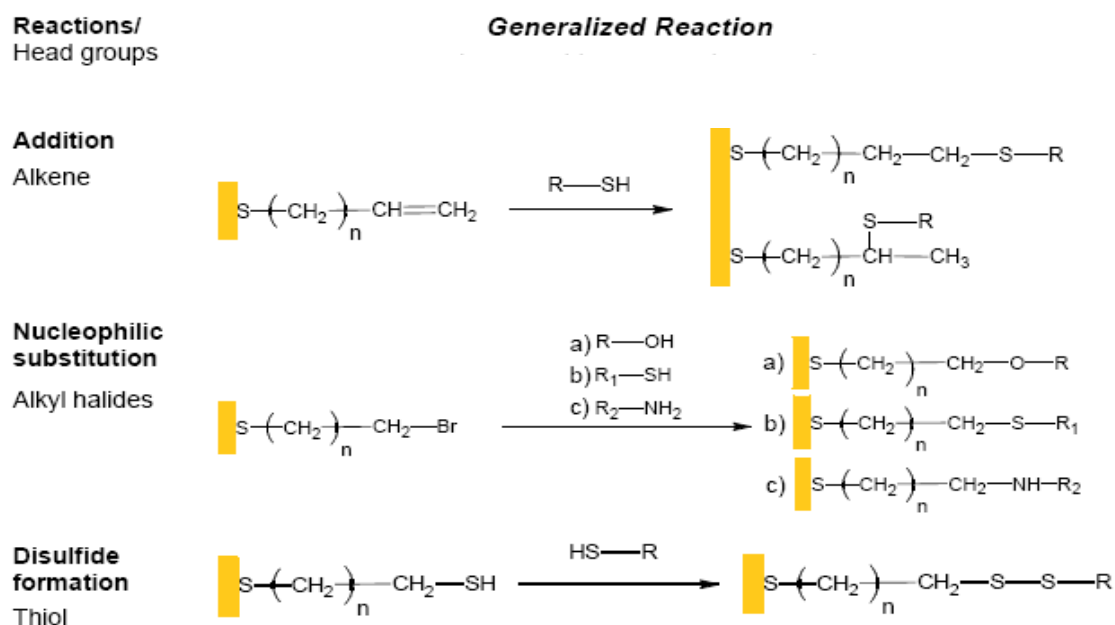
Εικόνα 31: Οι μορφές της επιφάνειας αισθητήρων DNA:
 Α) μόνο HS-ss-DNA
 Β) συνύπαρξη, HS-ss-DNA και 6-hydroxy-1-hexanethiol

Τα SAMs έχουν διευκολύνει πολυάριθμες χημικές και βιολογικές μελέτες. Η δυνατότητα για ειδικό και ακριβή έλεγχο της χημείας επιφάνειας επιτρέπει τις μελέτες αλληλεπιδράσεων σε αμέτρητα συστήματα. Συγκεκριμένα τα SAMs είναι ένα ιδανικό μοντέλο που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μελέτες: διαβρεξιμότητας (wettability), τριβής, προσκόλλησης, και βιολογικών αλληλεπιδράσεων.

3.7) Χημικές αντιδράσεις σε Self-Assembled Monolayers:

Τα Self-assembled monolayers (SAMs) παράγουν ομοιόμορφες ομοιογενείς επιφάνειες. Οι χημικές ομάδες που θα υπάρξουν στην εξωτερική επιφάνεια μπορούν να ελεγχθούν με απλή επιλογή θιολών με συγκεκριμένες ω-ομάδες. Αυτές οι επιφάνειες παρέχουν στην ουσία υποστρώματα για περαιτέρω χημικές αντιδράσεις. Με επιλογή μιας θιόλης, που φέρει μια χημικά ενεργή ω-ομάδα, τα SAMs είναι δυνατόν να υποστούν περαιτέρω χημικές αντιδράσεις και να προκύψουν επιθυμητά προϊόντα. Αν και οι χημικές αντιδράσεις επιφάνειας μπορούν συχνά να είναι διαφορετικές από τις αντίστοιχες που λαμβάνουν μέρος στα διαλύματα τους, οι περισσότερες μπορούν να γίνουν σε SAMs. Στον (πίνακας 2) παρουσιάζονται οι κύριες χημικές αντιδράσεις που μπορούν να πραγματοποιηθούν σε SAMs (Sullivan & Huck 2003).

Οι αντιδράσεις σε SAMs είναι επιτυχείς εφ' όσον δεν καταστρέφουν το υπόστρωμα των θιολών και οι λειτουργικές ω-ομάδες δεν εμφανίζουν στερεοχημική παρεμπόδιση. Η στερεοχημική παρεμπόδιση αποφεύγεται με τη χρησιμοποίηση μικτού monolayer. Μικτά monolayers μπορούν επίσης να είναι συμφέροντα δεδομένου ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να χωρίσουν κατά διαστήματα τις λειτουργικές ω-ομάδες και με αυτόν τον τρόπο να περιορίσουν τα στερικά προβλήματα για τις περαιτέρω αντιδράσεις ή μοριακές ακινητοποιήσεις. Η χρησιμοποίηση των SAMs ως υποστρώματα για χημική τροποποίηση, βρίσκει εφαρμογή σε πολλές πειραματικές μελέτες. Παραδείγματος χάριν, σε SAMs έχουν ακινητοποιηθεί DNA, πρωτεΐνες, κύτταρα και πολυμερή.

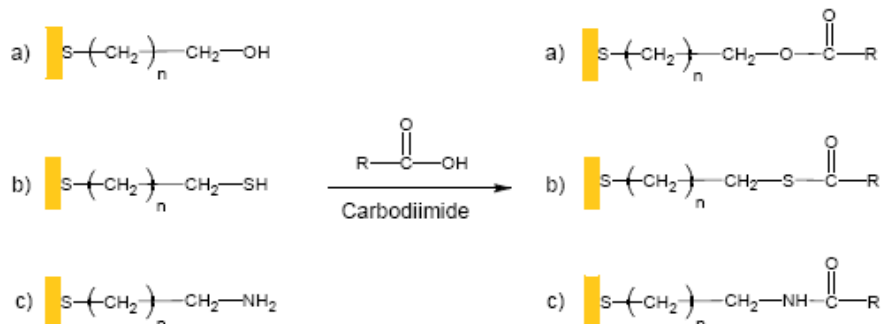


**Reactions/
Head groups**

Generalized Reaction

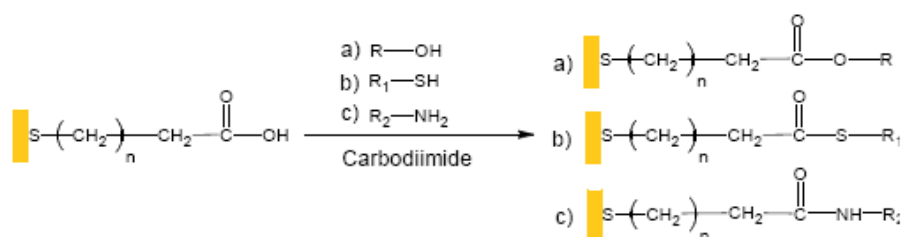
Condensation

Hydroxide
Sulfide
Amine

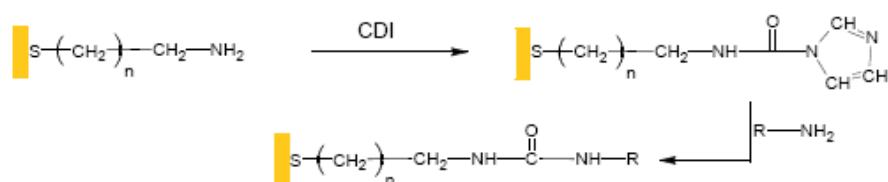


Condensation

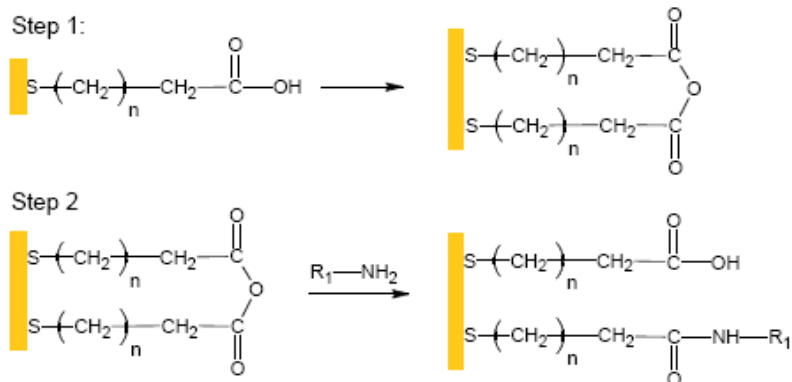
Hydroxide
Sulfide
Amine



CDI Coupling



**Anhydride formation/
Carboxylic acids**

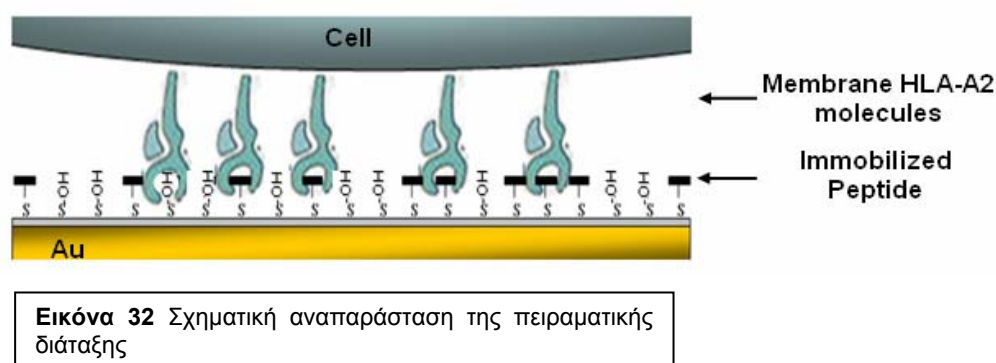


Πίνακας 2. Χημικές αντιδράσεις σε Self-Assembled Monolayers

4) ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ:

Οι βιοαισθητήρες είναι συσκευές που συνδυάζουν ένα βιοχημικό στοιχείο αναγνώρισης (ligand) με μια μονάδα μετατροπής σημάτων (transducer). Οι βιοαισθητήρες σχεδιάζονται συνήθως για αναλύσεις ρουτίνας, όπως κλινικές διαγνώσεις, ποιοτικό έλεγχο τροφίμων, περιβαλλοντικές αναλύσεις και στις φαρμακευτικές βιομηχανίες. Οι βιοαισθητήρες χρησιμοποιούνται κυρίως για την μελέτη αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών και άλλων βιολογικών υποστρωμάτων (protein/ligand) (Keusgen 2002). Εντούτοις, υπάρχουν μόνο λίγες αναφορές για βιοαισθητήρες που μπορούν να ανιχνεύσουν αλληλεπιδράσεις ολόκληρων κυττάρων / υποστρωμάτων.

Σε αυτήν την μελέτη, προσπαθήσαμε να αναπτύξουμε μια κατάλληλη επιφάνεια, για την μελέτη της αλληλεπίδρασης μεταξύ μορίων HLA-A2 συνδεδεμένα σε μεμβράνη κυττάρων, και επίτοπους καρκινικών πεπτιδίων (Rongcup 1999). Εννιά αμινοξέων, καρκινικά πεπτίδια, συντέθηκαν με αντικατάσταση του τέταρτου αμινοξέος με κυστεΐνη ώστε να είναι δυνατή η ακινητοποίηση μέσω δισουλφιδικού δεσμού (εικόνα 32)



Εικόνα 32 Σχηματική αναπαράσταση της πειραματικής διάταξης

Τα μόρια HLA-A2 ανήκουν στην τάξη I πρωτεΐνες του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (major histocompatibility Complex, MHC) που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην παρουσίαση αντιγόνων και την ρύθμιση της ανοσολογικής απόκρισης. Η λειτουργία τους είναι να δεσμεύουν μικρά αντιγονικά πεπτίδια (8-11 κατάλοιπα), που προέρχονται από μεταλλαγμένες ή ιικές πρωτεΐνες και να τα διατηρούν στην επιφάνεια των κυττάρων, ώστε να αναγνωρίζονται από αντιγονικούς υποδοχείς T-κυττάρων. Γενικά το MHC παρουσιάζει πολυμορφισμό. Υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός γενετικών παραλλαγών (αλληλόμορφα γονίδια) σε κάθε γενετικό τόπο. Πολλά από αυτά τα αλληλόμορφα γονίδια εμφανίζονται με σημαντική συχνότητα (> 1%) μέσα στον πληθυσμό, ενώ γενικά τα αλληλόμορφα διαφέρουν μεταξύ τους μέχρι και 30 αμινοξέα. Παραδείγματος χάριν στους ανθρώπους υπάρχουν περισσότερα από 200 αλληλόμορφα γονίδια που περιγράφονται σε κάποιο MHC γονιδιακό τόπο. Ο πολυμορφισμός των MHC μορίων, οδηγεί στην επιλογή των πεπτιδίων με τα οποία θα αλληλεπιδράσουν. Κάθε αλληλόμορφο MHC έχει ένα μοναδικό σύνολο πεπτιδίων, τα οποία μπορεί να δεσμεύσει με υψηλή συγγένεια, εν τούτοις, σπάνια, ορισμένα πεπτίδια μπορούν να δεσμευτούν σε περισσότερα του ενός.

Δύο τύποι βιοαισθητήρων χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση της αλληλεπίδρασης των κυττάρων: ένα οπτικό σύστημα βασισμένο στον επιφανειακό συντονισμό πλάσματος (surface plasmon resonance, SPR) και δύο ακουστικοί βιοαισθητήρες (SAW, QCM). Αυτές οι τεχνικές μπορούν να μετρήσουν βιομοριακές αλληλεπιδράσεις σε πραγματικό χρόνο, χωρίς να είναι αναγκαία η σήμανση των υποστρωμάτων (label free) . Η άμεση ανίχνευση μέσω του SPR είναι βασισμένη στη διαφορά του δείκτη διάθλασης μεταξύ των υδατικών και των βιολογικών μορίων. Η ανίχνευση των ακουστικών βιοαισθητήρων σχετίζεται με την ταχύτητα και την ενέργεια του κύματος στο μέσο όπου λαμβάνει μέρος η αλληλεπίδραση. Στην περίπτωση του αισθητήρα επιφανειακού ακουστικού κύματος (Surface Acoustic Device SAW), οι αλλαγές της ταχύτητας και της ενέργειας μετριοούνται ως φάση και πλάτος, αντίστοιχα (Lowe 1992). Στην περίπτωση Quartz Crystal Microbalance (QCM) τα ανωτέρω καταγράφονται ως συχνότητα και αποσβάνουσα ενέργεια (dissipation energy) (Kasemo 1998). SAMs που περιέχουν μίγμα θειολών με ω-ομάδες υδροξυλίου και καρβοξυλίου κατασκευάστηκαν στην επιφάνεια χρυσού των chips των βιοαισθητήρων και στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν για να παραγάγουν μια ενεργή επιφάνεια για την ομοιοπολική ακινητοποίηση των πεπτιδίων (Vann Bennecom 1997). Τα κύτταρα προστέθηκαν υπό ροή επάνω από την επιφάνεια και η αλληλεπίδραση μεταξύ των μορίων HLA-A2 και του πεπτιδίου μετρήθηκε σε πραγματικό χρόνο μέσω του ελέγχου του σήματος του βιοαισθητήρα.

5)ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ:

Οι θειόλες 11-mercaptoundecanoic acid (98%) και 11-mercaptoundecanol (98%), οι ταμπλέτες φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος (PBS), η αιθυλενοδιαμίνη και η αιθανολαμίνη που χρησιμοποιήθηκαν, αγοράστηκαν από τη Sigma-Aldrich. Το *N*-[γ-maleimidobutyryloxy]succinimide ester (GMBS, 90%) από την Calbiochem. Το 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide, (EDC), το sulfo-*N*-hydroxysuccinimide (sulfo-NHS) και το NHS-PEG₄-Maleimide αγοράστηκαν από την Pierce. Όλα τα πειράματα έγιναν σε θερμοκρασία δωματίου.

5.1) Προετοιμασία των υποστρωμάτων χρυσού (SPR/QCM/SAW devices):

Για να παραχθούν υψηλής ποιότητας SAMs είναι αναγκαία καθαρά χρυσά υποστρώματα. Πολλοί παράγοντες επηρεάζουν την ποιότητα των υποστρωμάτων χρυσού και συνεπώς την ποιότητα monolayers. Αυτοί οι παράγοντες περιλαμβάνουν τη καθαρότητα του χρυσού, την τραχύτητα του υποστρώματος, την μέθοδο εναπόθεσης του χρυσού. Σε αυτή την μελέτη ακολουθήθηκαν τρεις διαφορετικές διεργασίες για τον καθαρισμό της επιφάνειας χρυσού των devices των βιοαισθητήρων που χρησιμοποιήθηκαν.

1) Εναπόθεση χρυσού, χάραξη με χημεία πλάσματος και καθαρισμός

α) Με τη χρήση του συστήματος BAL-TEC SCD 050 Sputter Coater πριν από κάθε πείραμα, η επιφάνεια χρυσού υφίσταται χάραξη με χημεία πλάσματος (etching) για 60sec, και κατόπιν εναποτίθεται φρέσκο στρώμα χρυσού μετά από sputtering για 3sec και τελικό etching για 180sec. Το Sputter Coater λειτουργεί με Ar, το οποίο διασπάζεται ως πλάσμα σε χημικά ενεργές ρίζες που απορροφούνται από την επιφάνεια και αντιδρούν με αυτό.

β) Με τη χρήση του συστήματος Harrick Plasma Cleaner πριν από κάθε πείραμα, η επιφάνεια χρυσού υφίσταται χάραξη με χημεία πλάσματος οξυγόνου (etching) για 10 min, και κατόπιν εναποτίθεται φρέσκο στρώμα χρυσού μετά από sputtering για 4sec με τη χρήση του συστήματος BAL-TEC SCD 050 Sputter Coater όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Τέλος ακολουθεί πάλι με τη χρήση του συστήματος Harrick Plasma Cleaner etching για 60sec. Το Harrick Plasma Cleaner λειτουργεί με οξυγόνο, το οποίο διασπάζεται ως πλάσμα σε χημικά ενεργές ρίζες που αντιδρούν με την επιφάνεια.

2) Καθαρισμός χρησιμοποιώντας Piranha Solution

Μια ιδιαίτερα “σκληρή” μέθοδος αφαίρεσης απομάκρυνσης των προσμίξεων του χρυσού είναι η χρήση του διαλύματος Piranha (Piranha Solution). Το διάλυμα Piranha αποτελείται τυπικά από 30% υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και πυκνό θειικό οξύ (H_2SO_4) σε αναλογία 30:70 v/v αντίστοιχα. Το διάλυμα κατασκευάστηκε προσθέτοντας το πυκνό θειικό οξύ στο υπεροξείδιο του υδρογόνου σιγά-σιγά καθώς αντιδρούν βίαια μεταξύ τους και εκλύετε υδρογόνο. Στη συνέχεια τα devices εμβαπτίζονται στο διάλυμα Piranha για 5 sec, ξεπλένονται με άφθονο nano pure νερό και στεγνώνουν υπό αέριο άζωτο.

Για τον καθαρισμό των devices και την αφαίρεση του monolayer που έχει εναποτεθεί, αφήνονται όλη τη νύχτα σε ακετόνη, ξεπλένονται με αιθανόλη και στεγνώνουν υπό αέριο άζωτο.

5.2) Κατασκευή monolayer:

Τα SPR, Q-sence και SAW devices, βυθίστηκαν σε μίγματα 11-mercaptoundecanoic acid (98%) και 11-mercaptoundecanol (98%) σε απόλυτη αιθανόλη, με διαφορετική μοριακή αναλογία και συνολική συγκέντρωση θιολών από 0,1-1 mM. Στην περίπτωση των Q-sence devices η συνολική συγκέντρωση των θιολών ήταν 3mM. Η δημιουργία του monolayer ξεκινά αμέσως όταν η επιφάνεια του χρυσού εκτίθεται στο διάλυμα θιολών, ωστόσο είναι σημαντικό να ελαχιστοποιηθεί η έκθεση στο οξυγόνο κατά τη διάρκεια της διαδικασίας αυτοσυγκρότησης. Για αυτό είναι απαραίτητο ο όγκος του δοχείου πάνω από το διάλυμα των θιολών να συμπληρωθεί με αδρανές αέριο όπως το άζωτο ή το αργό. Μετά από 12-24 ώρες τα devices ξεπλένονται με απόλυτη αιθανόλη και ξηραίνονται υπό αέριο άζωτο.

5.3) Κυτταρικές σειρές και καλλιέργειες:

Η μετασχηματισμένη με Epstein-Barr virus (EBV) B-λεμφοβλαστική κυτταρική σειρά LG2, ομόζυγη για το γονίδιο HLA-A*0201, και η κυτταρική σειρά K562, χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας, που δεν εκφράζει HLA-A, -B ή -C, χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία. Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε θρεπτικό μέσο RPMI 1640 στο οποίο έχει προστεθεί το αντιβιοτικό gentamycin 1mg/lt καθώς και 10% εμβρυϊκός ορός βοδιού. Αλλαγές το θρεπτικού γίνονται κάθε 2-3 μέρες. Η πυκνότητα των κυττάρων ήταν $3-8 \times 10^5$ κύτταρα/ml. Τα κύτταρα συλλέγονται πριν από κάθε πείραμα και ελέγχεται η θνησιμότητά τους με τη μέθοδο αποκλεισμού με τη χρωστική trypan blue. Τα ζωντανά κύτταρα μετρούνται σε αιμοκυτταρόμετρο τύπου Neubauer. Τα νεκρά κύτταρα δεν ήταν πάνω από το 5% του ολικού αριθμού. Η συλλογή των κυττάρων γινόταν έπειτα από φυγοκέντρηση σε 250g. Τα κύτταρα ξεπλένονταν με PBS πριν από κάθε πείραμα, υφίσταντο φυγοκέντρηση σε 250g και επαναιωρούντο σε PBS.

5.4) Πειράματα με αισθητήρα SPR

Στην παρούσα εργασία έγινε χρήση του οπτικού συστήματος SPR SR7000 (Reichert Analytical Instruments) (εικόνα. 33). Χρησιμοποιήθηκαν Πλάκες γυαλιού (12.5 x 12.5 x 0.9mm) με ένα λεπτό στρώμα χρυσού (50 nm). Οι πλάκες τοποθετούνται στην ειδική θέση και εφαρμόζεται η κυψελίδα ροής και το ειδικό gasket. Η ροή ελέγχεται μέσω περισταλτικής αντλίας και εφαρμόζεται στα πειράματα σε τιμές 10 και 25 μl/min. Οι μετρήσεις λαμβάνονται σε πραγματικό χρόνο μέσω του παρεχόμενου λογισμικού. Ο χρυσός ανανεωνόταν με τον τρόπο που αναφέρεται παραπάνω.



Εικόνα 33. Το οπτικό σύστημα SR7000.

5.5) Πειράματα με βιοαισθητήρα Q-sense

Για τα πειράματα έγινε χρήση του ακουστικού βιοαισθητήρα Q-sense D300 (εικόνα 34). Χρησιμοποιήθηκαν Q-sense device με ένα λεπτό στρώμα χρυσού (50 nm). Τα device τοποθετούνται στην ειδική θέση (εικόνα 35) και εφαρμόζεται ροή η οποία ελέγχεται μέσω περισταλτικής αντλίας και εφαρμόζεται στα πειράματα σε τιμές 10 και 25 $\mu\text{l}/\text{min}$. Οι μετρήσεις λαμβάνονται σε πραγματικό χρόνο μέσω του παρεχόμενου λογισμικού. Ο χρυσός ανανεωνόταν με τον τρόπο που αναφέρεται παραπάνω.



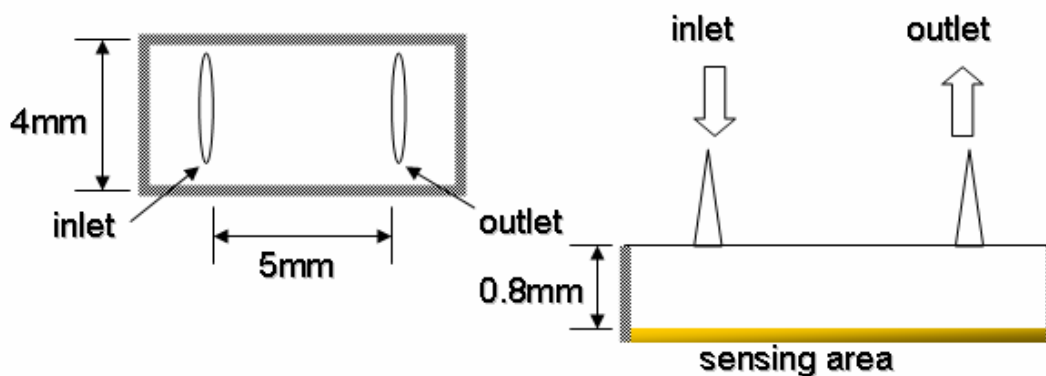
Εικόνα 34. Ακουστικός βιοαισθητήρας Q-sense D300



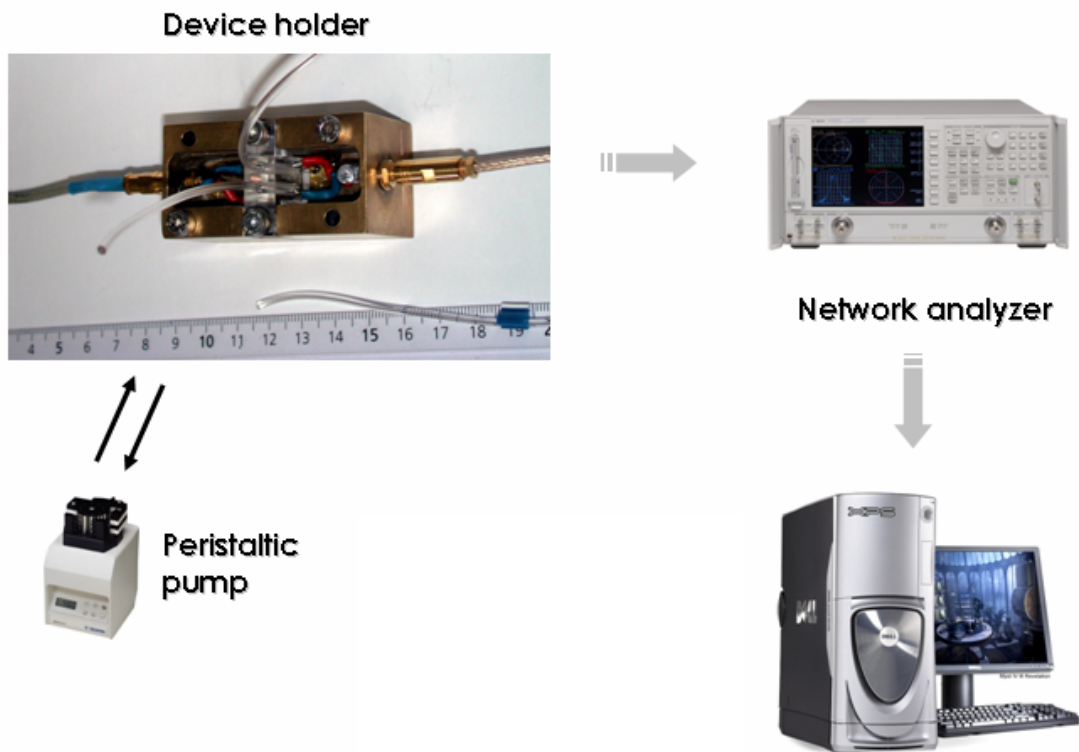
Εικόνα 35. Τοποθέτηση Q-sense device

5.6) Πειράματα με αισθητήρα SAW

Η συσκευή του βιοαισθητήρα τοποθετείται σε μία ειδική θήκη, που φέρει τα ηλεκτρόδια. Πάνω από τη θήκη αυτή εφαρμόζεται η κυψελίδα συνεχούς ροής, με την οποία διατηρείται σταθερή η ροή του υγρού διαλύματος στην περιοχή ανάμεσα στους IDTs μέσω περισταλτικής αντλίας (Gilson, France). Η κυψελίδα συνεχούς ροής εφαρμόζεται στην επιφάνεια του αισθητήρα με τη βοήθεια ενός λαστιχένιου gasket. Οι διαστάσεις του θαλάμου ροής φαίνονται στην εικόνα 36. Για τη μεταφορά των υγρών διαλυμάτων χρησιμοποιούνται σωληνάκια διαμέτρου 0,25 mm (Anachem). Η ροή που εφαρμόζεται στα πειράματα είναι 10 $\mu\text{l}/\text{min}$. Στις πλάκες χρυσού της συσκευής του ακουστικού βιοαισθητήρα εφαρμόζονται ηλεκτρόδια συνδεδεμένα με τον αναλυτή δικτύου (Hewlett Packard 4195A ή Agilent Technologies E5061A). Οι μετρήσεις που λαμβάνονται μεταφέρονται σε ηλεκτρονικό υπολογιστή από όπου παρακολουθείται η πρόοδος του πειράματος (εικόνα 37) μέσω του λογισμικού Labview 5.1 (National Instruments).



Εικόνα 36. Διαστάσεις του θαλάμου ροής



Εικόνα 37. Πειραματική διάταξη. Η συσκευή τοποθετείται στο device holder, η ροή ελέγχεται μέσω περισταλτικής αντλίας και οι μετρήσεις λαμβάνονται με τον αναλυτή δικτύου. Αυτός συνδέεται με υπολογιστή όπου μπορούν να αποθηκευτούν και να επεξεργασθούν τα δεδομένα.

6) ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ:

6.1) Κατασκευή του monolayer:

Η χρήση self-assembled monolayers (SAMs), σε διάφορους τομείς της έρευνας, αναπτύσσεται με ραγδαίους ρυθμούς. Ειδικότερα, τα SAMs χρησιμοποιούνται ως στρώμα επαφής (interface-layer), μεταξύ μεταλλικών επιφανειών (π.χ χρυσού), και διαλυμάτων ή ατμών τους. Τα ιδιαίτερα, σταθερά μοριακά στρώματα (molecular layers) που σχηματίζονται με την μέθοδο της αυτοσυγκρότησης (self-assembling), έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη διαφόρων συστημάτων ανίχνευσης όπως η ηλεκτροχημική ανίχνευση, οπτική ανίχνευση κ.λ.π.

Τα Self-assembled monolayers (SAMs) είναι κρυσταλλικά οργανικά μοριακά στρώματα που συγκρατούνται με χημικούς δεσμούς σε ένα στερεό υπόστρωμα. Ως ιδανικό monolayer ορίζεται το monolayer που αποτελείται από τέλεια ευθυγραμμισμένες, στενά πακεταρισμένες αλκυλικές αλυσίδες, και οι οποίες είναι ενωμένες με λείες επιφάνειες (π.χ γυαλί, χρυσό).

Ένας πολύ εύκολος και σίγουρος τρόπος για να σχηματίσει κανείς monolayers, είναι να χρησιμοποιήσει ενώσεις θείου (δισουλφίδια R-S-S-R, σουλφίδια R-S-R, θειόλες R-SH) επιφάνειες χρυσού. Συγκεκριμένα τα άτομα θείου προσανατολίζονται προς την επιφάνεια του χρυσού με τον οποίο αντιδρούν σύμφωνα με την αντίδραση:



Παράλληλα δεσμοί υδρογόνου, μεταξύ των μεθυλενικών ομάδων προσανατολίζουν και σταθεροποιούν το monolayer.

Γενικά, στα mixed SAMs οι θειόλες, προσροφούνται με μοριακή αναλογία σχεδόν ίδια με αυτήν των διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται. Έτσι στην συγκεκριμένη εργασία κατασκευάστηκαν mixed SAMs με 11-mercaptoundecanoic acid, και 11-mercaptoundecanol με μοριακή αναλογία 1/3, 1/5, 1/10, 1/20, 1/30 αντίστοιχα. Προκειμένου να επιλεχθεί θεωρητικά η κατάλληλη αναλογία, ώστε να μην υπάρχουν αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πεπτιδίων (στερεοχημικές, ηλεκτροστατικές κ.λ.π.), ελήφθησαν υπ' όψιν οι εγκάρσιες τομές των θιολών, των πεπτιδίων και των κυττάρων. Η επιφάνεια που καλύπτεται από τις θιόλες, έχει αναφερθεί ότι είναι 18 \AA^2 (Finklea, 1996), ενώ εκείνη που καλύπτουν τα πεπτιδία (εννιά αμινοξέα), είναι περίπου 250 \AA^2 . Γνωρίζοντας ότι τα καλά διατεταγμένα SAMs περιέχουν αλκανοθιόλες σε ένα εξαγωνικό κρυσταλλικό πλέγμα με διάταξη $(\sqrt{3} \times \sqrt{3})R30^\circ$ και η απόσταση μεταξύ των υδρογονανθρακικών αλυσίδων είναι περίπου ίδια με την απόσταση μεταξύ γειτονικών ατόμων θείου, δηλαδή 4.99 \AA μπορούμε να υπολογίσουμε την επιφάνεια που καλύπτει κάθε ενεργή μονάδα monolayer. Με τον όρο ενεργή μονάδα monolayer θεωρούμε το σύνολο των θιολών που αποτελείτε από ένα μόριο θειόλης ικανό να ενεργοποιηθεί (περιέχει ως ω-ομάδα καρβοξυλομάδα) και "ανενεργά" μόρια θειόλης (περιέχουν ως ω-ομάδα υδροξυλομάδα) με αριθμό που ορίζεται από την μοριακή αναλογία του μικτού monolayer. Για παράδειγμα σε ένα monolayer με μοριακή αναλογία 1/3, η ενεργή ομάδα αποτελείτε από ένα μόριο 11-mercaptoundecanoic acid και δύο μόρια 11-mercaptoundecanol. Αν θεωρήσουμε ότι οι ενεργές ομάδες των μικτών monolayers 1/3, 1/5, 1/10, 1/20, 1/30 έχουν σχήμα τριγώνου, τραπέζιου,

πολυγώνου και κύκλου αντίστοιχα, μπορούμε να υπολογίσουμε τον αριθμό των πεπτιδίων που θα ακινητοποιηθούν. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον πίνακα 3. Στο σημείο αυτό είναι ανάγκη να τονίσουμε ότι τα αποτελέσματα είναι θεωρητικά και δίνουν απλά μια εκτίμηση.

MONOLAYER	ΣΧΗΜΑ	ΕΜΒΑΔΟΝ Α ⁰	ΕΝΕΡΓΕΣ ΟΜΑΔΕΣ	ΘΕΣΕΙΣ ΠΟΥ ΚΑΤΑΛΑΜΒΑΝΕΙ ΤΟ ΠΕΠΤΙΔΙΟ	ΣΥΝΟΛΙΚΟ ΠΕΠΤΙΔΙΟ (ΜΟΡΙΑ)
1/3	ΤΡΙΓΩΝΟ	12,42	4,29 10 ¹³	20,12	2,13 10 ¹²
1/5	ΤΡΑΠΕΖΙΟ	32,40	2,58 10 ¹³	7,71	3,34 10 ¹²
1/10	ΠΟΛΥΓΩΝΟ	107,78	1,29 10 ¹³	2,31	5,58 10 ¹²
1/20	ΚΥΚΛΟΣ	488,58	6,44 10 ¹²	1	6,44 10 ¹²
1/30	ΚΥΚΛΟΣ	703,67	4,29 10 ¹²	1	4,29 10 ¹²

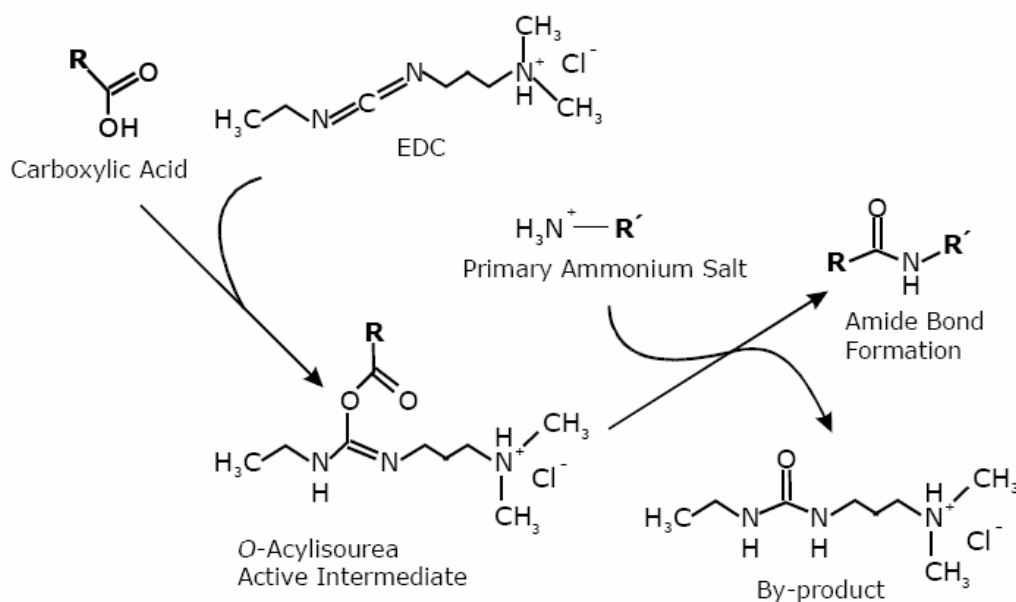
Πίνακας 3. Θεωρητικός αριθμός πεπτιδίων που ακινητοποιούνται σε κάθε monolayer .

Η πυκνότητα επιφάνειας ενός καλά διατεταγμένου monolayer είναι $7.6 \cdot 10^{-10}$ mol/cm² ή $4.6 \cdot 10^{14}$ molecules/cm². (Ning Gu, 2005), ενώ η επιφάνεια του αισθητήρα όπου γίνεται η ανίχνευση είναι για το Q-sense $22 \cdot 10^{-2}$ cm² και για το SPR $11 \cdot 10^{-2}$ cm². Έτσι ο συνολικός αριθμός θειολών σε κάθε monolayer είναι $1,012 \cdot 10^{14}$ και $0,506 \cdot 10^{14}$ για το Q-sense και SPR, αντίστοιχα. Γνωρίζοντας λοιπόν την αναλογία των μικτών monolayer, το εμβαδόν των ενεργών ομάδων και το εμβαδόν των πεπτιδίων μπορούμε να υπολογίσουμε την συγκέντρωση των πεπτιδίων που πρέπει να χρησιμοποιήσουμε ώστε να έχουμε πλήρως κορεσμένη με πεπτιδίο επιφάνεια. Επίσης, λαμβάνουμε πληροφορίες για πιθανές στερεοχημικές παρεμποδίσεις που οδηγούν σε ελεύθερες ενεργές ομάδες, ικανές να αλληλεπιδράσουν με τα κύτταρα. Κάτι τέτοιο επηρεάζει την μέτρηση της αλληλεπίδρασης των κυττάρων με τα πεπτιδία όπως θα αναφερθεί λεπτομερέστερα παρακάτω. Γενικά μπορούμε να πούμε ότι τα monolayer με μοριακή αναλογία 1/20 και 1/30 είναι τα καταλληλότερα κάτι που διαπιστώνουμε και από τα πειραματικά δεδομένα.

Η επιφανειακή συγκέντρωση των MHC (60 Å⁰ διάμετρος, επιφάνεια πR² = 2826 Å⁰²), είναι 45 μόρια / μm², άρα σε επιφάνεια του monolayer ίση με την επιφάνεια που καλύπτει το κύτταρο ($7,7 \pm 0,1$ μm διάμετρος, επιφάνεια 186,17 μm²) εκτίθοντε 8382 μόρια. Όμως στο κομμάτι αυτό της επιφάνειας ο αριθμός των πεπτιδίων κυμαίνεται από 74833 έως 38104 για τα monolayer που κατασκευάστηκαν με μοριακή αναλογία μεταξύ 1/3 και 1/20, αντίστοιχα. Δηλαδή τα πεπτιδία μπορεί κανείς να πει ότι είναι σε περίσσεια σε σχέση με τα MHC, και συγκεκριμένα για κάθε 1 MHC αντιστοιχούν από 4,5-9 πεπτιδία.

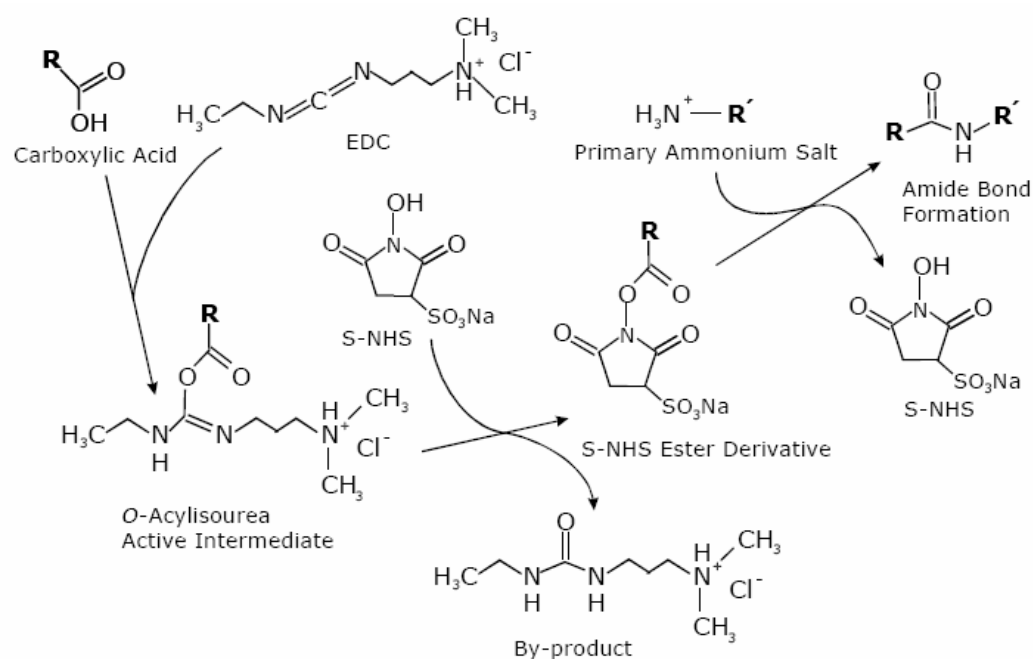
6.2) Οργανική σύνθεση:

Ένας πολύ κοινός τρόπος ακινητοποίησης βιομορίων είναι διαμέσου, ενεργοποίησης των καρβοξυλομάδων, και αντίδρασης τους με αμίνες προς σχηματισμό πεπτιδικού δεσμού. Αρχικά οι καρβοξυλομάδες αντιδρούν με καρβοδιιμίδιο (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide, EDC) προς σχηματισμό μιας πολύ ενεργού Ο-άκυλο-ουρίας, η οποία στη συνέχεια αντιδρά με πυρηνόφιλα όπως πρωτοταγείς αμίνες και σχηματίζεται αμιδικός δεσμός. Σε αυτήν την αντίδραση εμφανίζεται ουρία σαν παραπροϊόν (εικόνα 40).



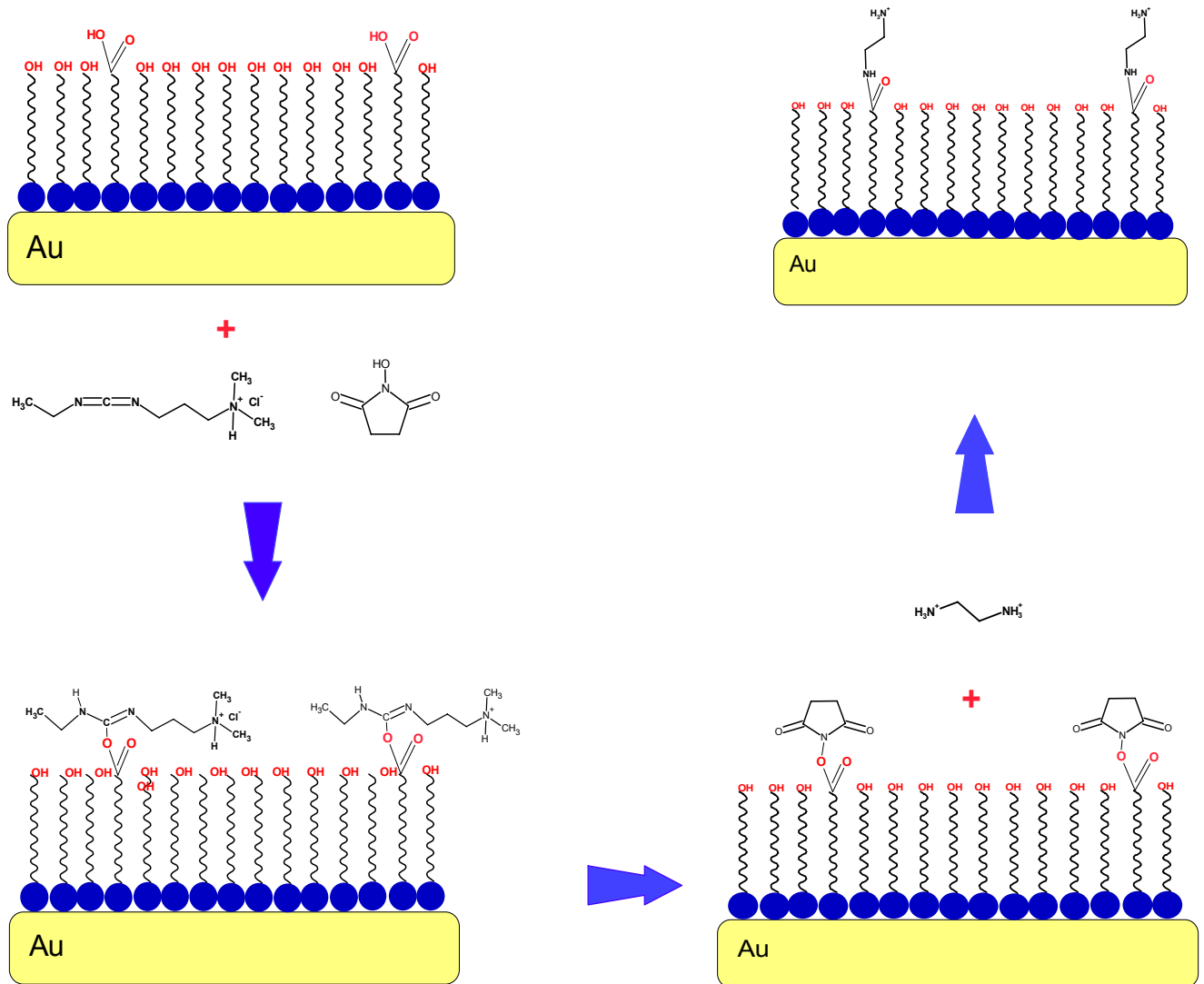
Εικόνα 40. Αντίδραση του EDC με καρβοξυλικό οξύ, ακολουθούμενη από σχηματισμό ενός ενδιάμεσου ενεργού NHS- εστέρα. Παρουσία μιας πυρηνόφιλης αμίνης σχηματίζεται αμιδικός δεσμός.

Στην συγκεκριμένη εργασία ακολουθήθηκε οργανική σύνθεση που στηρίχθηκε στην ενεργοποίηση των καρβοξυλομάδων σε δυο βήματα. Χρησιμοποιήθηκε EDC για ενεργοποίηση των καρβοξυλομάδων, με σχηματισμό ενεργών εστέρων. Στη συνέχεια οι εστέρες αυτοί αντιδρούν με NHS (*N*-hydroxysuccinimide) προς σχηματισμό σουλφο-εστέρων, οι οποίοι είναι υδρόφιλοι και αντιδρούν γρήγορα με πυρηνόφιλα. Αν το πυρηνόφιλο είναι αμίνη τότε σχηματίζεται αμιδικός δεσμός (εικόνα 41).



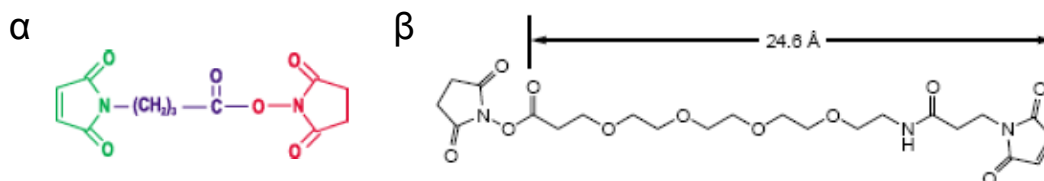
Εικόνα 41. Αντίδραση του EDC με καρβοξυλικό οξύ, ακολουθούμενη από σχηματισμό ενός ενδιάμεσου ενεργού NHS-εστέρα. Παρουσία μιας πυρηνόφιλης αμίνης σχηματίζεται αμιδικός δεσμός.

Το πλεονέκτημα της χρήσης NHS-εστέρων η μεγάλη διάρκεια ζωής τους και το γεγονός ότι υδρολύονται με μικρό ρυθμό στο νερό. Οι ιδιότητες αυτές προκαλούν περαιτέρω σταθεροποίηση του ενεργού ενδιάμεσου. Παρόλα αυτά οι αμίνες προσβάλουν τον άνθρακα του καρβονυλίου του εστέρα και απελευθερώνεται γρήγορα η ομάδα NHS, προς σχηματισμό αμιδικού δεσμού. Η αμίνη που χρησιμοποιήθηκε ήταν η αιθυλενοδιαμίνη [(CH₂)₂(NH₂)₂], η οποία αντιδρά με την μια αμινομάδα της (-NH₂) ενώ παραμένει ελεύθερη η άλλη (εικόνα 42). Για να απενεργοποιηθούν οι καρβοξυλομάδες που δεν αντέδρασαν με την αιθυλενοδιαμίνη, προστέθηκε αιθανολαμίνη. Η αιθανολαμίνη [HO(CH₂)₂NH₂] αντιδρα με τις ενεργοποιημένες καρβοξυλομάδες με την αμινομάδα της (-NH₂), και παραμένει ελεύθερη η ομάδα (-OH) του άλλου άκρου της.



Εικόνα 42. ενεργοποίηση των καρβοξυλομάδων και αντίδρασή τους με αιθυλενοδιαμίνες

Έχοντας πλέον στην επιφάνεια εκτεθειμένες αμινομάδες (-NH₂), προστίθεται δι-λειτουργικό αντιδραστήριο που έχει την ικανότητα να αντιδρά με πρωτοταγείς αμίνες, και σουλφιδρυλομάδες, ενώνοντας μεταξύ τους τα μόρια που τις περιέχουν. Δυο δι-λειτουργικά αντιδραστήρια χρησιμοποιήθηκαν σε αυτήν την μελέτη το *N*-[*g*-maleimidobutyryloxy]succinimide ester (GMBS) και το succinimidyl-[(*N*-maleimidopropionamido)-tetraethyleneglycol] ester (NHS-PEO₄-Maleimide) (εικόνα 43).

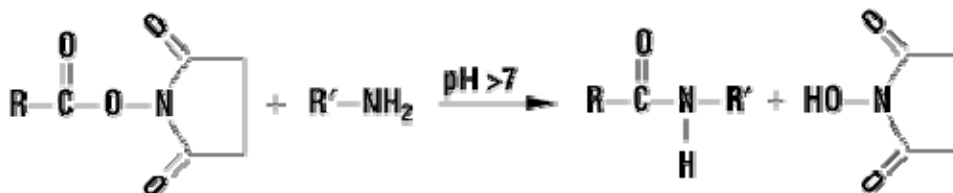


Εικόνα 43. α) GMBS β) NHS-PEO₄-Maleimide

Τα αντιδραστήρια αυτά ανήκουν στην κατηγορία των χημικών ενώσεων (Cross-linkers) που χρησιμοποιούνται για να συνδέσουν μόρια μεταξύ τους με ομοιοπολικούς δεσμούς. Αρκετά άτομα διαχωρίζουν τα δύο μόρια, σχηματίζοντας έναν "διαχωριστικό βραχίονα" (spacer arm). Τα συνδεδεμένα μέρη σε κάθε περίπτωση διατηρούν τα ειδικά χαρακτηριστικά τους και την βιολογική τους ενεργότητα. Οι Cross-linkers βρίσκουν εφαρμογή σε ανοσολογικές τεχνικές και πρωτεϊνικές μελέτες (δομή, αλληλεπιδράσεις, δραστηριότητα (κ.λ.π). Διακρίνονται σε έτερο-δι-λειτουργικούς (heterobifunctional) και όμο-δι-λειτουργικούς (homobifunctional), ανάλογα με το αν φέρουν δυο διαφορετικές ή δυο ίδιες ενεργές ομάδες αντίστοιχα. Σε κάθε περίπτωση, φαίνεται οι πρώτοι, να είναι πιο ενδιαφέροντες, καθώς επιτρέπουν την σύνδεση δυο μορίων με ένα συγκεκριμένο τρόπο, αποφεύγοντας παράλληλα τον σχηματισμό διμερών ή και πολυμερών. Σημαντική είναι επίσης, η φύση και το μήκος του διαχωριστικού βραχίονα (spacer arm) (μπλε μέρος εικόνα 43). Η επιλογή εξαρτάτε από το επιθυμητό αποτέλεσμα.

Σε αυτήν την εργασία χρησιμοποιήθηκαν τα αντιδραστήρια GMBS και NHS-PEO₄-Maleimide που φέρουν διαφορετικό διαχωριστικό βραχίονα (spacer arm). Το GMBS φέρει έναν υδρογονανθρακικό υδρόφοβο βραχίονα με μήκος 6,8 Å⁰ ενώ το NHS-PEO₄-Maleimide τέσσερις σχετικά υδρόφιλες ομάδες πολυαιθυλονογλυκόλης με συνολικό μήκος 24,6 Å⁰. Οι ομάδες πολυαιθυλονογλυκόλης έχουν μεγαλύτερο βαθμό ελευθερίας κίνησης. Παρόλα αυτά και στα δυο αντιδραστήρια οι ενεργές ομάδες είναι ίδιες: α) η σουκινιμιδική (κόκκινο μέρος εικόνα 15, που αντιδρά με αμίνες, και β) η μαλλεϊμιδική ομάδα (πράσινο μέρος εικόνα 43), που αντιδρά με σουλφιδρυλομάδες. Γενικά οι σουκινιμιδικοί εστέρες (NHS-esters), σχηματίζουν σταθερά προϊόντα με πρωτοταγείς αμίνες, σε φυσιολογικά pH. Οι εκτεθειμένες, λοιπόν, αμινομάδες (-NH₂), που υπάρχουν στο monolayer,

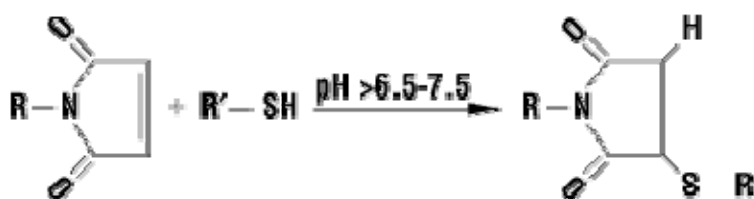
αντιδρούν με το σουκινιμιδικό μέρος του GMBS και σχηματίζουν αμιδικούς δεσμούς. Ο αμιδικός δεσμός σχηματίζεται με ταυτόχρονη, απελευθέρωση N-hydroxysuccinimide (εικόνα 44).



Εικόνα 44. αντίδραση NHS εστέρων με πρωτοταγείς αμίνες

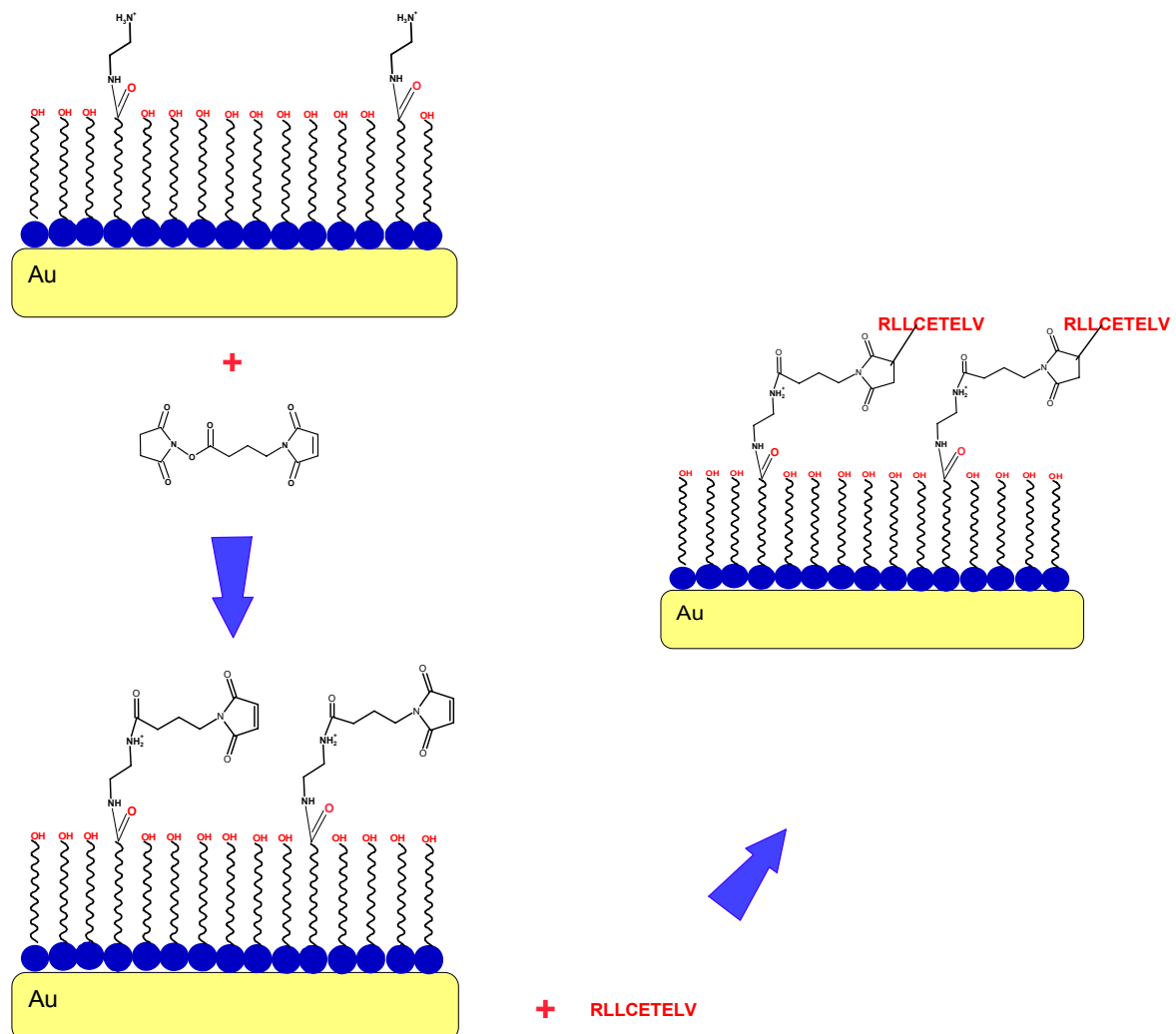
Η υδρόλυση των NHS εστέρων συναγωνίζεται την αντίδραση με τις πρωτοταγείς αμίνες. Η ρυθμός υδρόλυσης αυξάνει με την αύξηση του pH. Μελέτες έχουν δείξει ότι ο χρόνος ημιζωής της υδρόλυσης όμο-δι-λειτουργικών NHS εστέρων είναι 4-5 ώρες σε pH 7.0 και 0°C σε υδατικά περιβάλλοντα χωρίς πρωτοταγείς αμίνες, ενώ μειώνεται σε 10 λεπτά σε pH 8.6 και 4°C. Οι αντίδραση, συνήθως, λαμβάνει μέρος σε διαλύματα φωσφορικών, καρβοξυλικών αλάτων ή εστέρων, HEPES ή βορικών, συγκεντρώσεως μεταξύ 50-200 mM, και σε pH μεταξύ 7 και 9, σε θερμοκρασία δωματίου. Σε αυτήν την εργασία χρησιμοποιήθηκε διάλυμα PBS, συγκεντρώσεως 100 mM, με pH ≈ 7,2.

Αφού λοιπόν, οι εκτεθειμένες αμινομάδες (-NH₂), που υπάρχουν στο monolayer, έχουν αντιδράσει με το σουκινιμιδικό μέρος του GMBS και έχουν σχηματίσει αμιδικούς δεσμούς, (εικόνα 45), εισάγουμε τα αντιγονικά εννιά-πεπτίδια. Τα πεπτίδια αυτά αντιδρούν με τις μαλεϊμιδικές ομάδες που είναι ελεύθερες, μέσω της σουλφυδρυλομάδας, της μοναδικής κυστεΐνης που περιέχουν. (εικόνα 46). Οι μαλεϊμιδικές ομάδες αντιδρούν ειδικά, με τις σουλφυδρυλομάδες, όταν το pH του μίγματος της αντίδρασης είναι μεταξύ του 6,5 και 7,5 και σχηματίζουν έναν σταθερό θειο-αιθέρα, μη αντιστρεπτά (εικόνα 45).



Εικόνα 45. αντίδραση μαλεϊμιδικών ομάδων

Σε ουδέτερο pH, αντιδρούν 1.000 φορές γρηγορότερα με τις σουλφυδρυλομάδες απ' ό,τι με τις αμίνες, παρόλα αυτά σε pH > 8,5, ευνοείται η αντίδραση με πρωτοταγείς αμίνες. Οι τυροσίνες, ιστιδίνες, και οι μεθειονίνες δεν δίνουν την αντίδραση. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να αναφερθεί ότι πανώ από pH 8.0 λαμβάνει μέρος υδρόλυση της μαλλεϊμιδικής ομάδας σε μαλλεϊμιδικό οξύ. Επίσης θα πρέπει να αποφεύγονται διαλύματα που περιέχουν θειόλες, καθότι συναγωνίζονται με τα μόρια που θέλουμε να ακινητοποιήσουμε, τις θέσεις δέσμωσης. Όμως η προσθήκη ελεύθερων θειολών, έχει το πλεονέκτημα ότι τερματίζει την αντίδραση. Τα πεπτίδια, συγκέντρωσης 50 μM, που χρησιμοποιήθηκαν ήταν διαλυμένα σε διάλυμα PBS, που περιείχε 50 μM της ελεύθερης θειόλης DTT. Όπως φαίνεται τα πεπτίδια συναγωνίζονται με τα μόρια του DTT, για την πρόσδεση τους στο monolayer. Αυτό σημαίνει ότι ο αριθμός των πεπτιδίων στην επιφάνεια του αισθητήρα θα είναι μικρότερος από τον θεωρητικό αριθμό που υπολογίζεται από την μοριακή αναλογία των θειολών που συνθέτουν το monolayer. Η χρήση του DTT είναι αναγκαία διότι αποτρέπει τον σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών και άρα δι-πεπτιδίων.

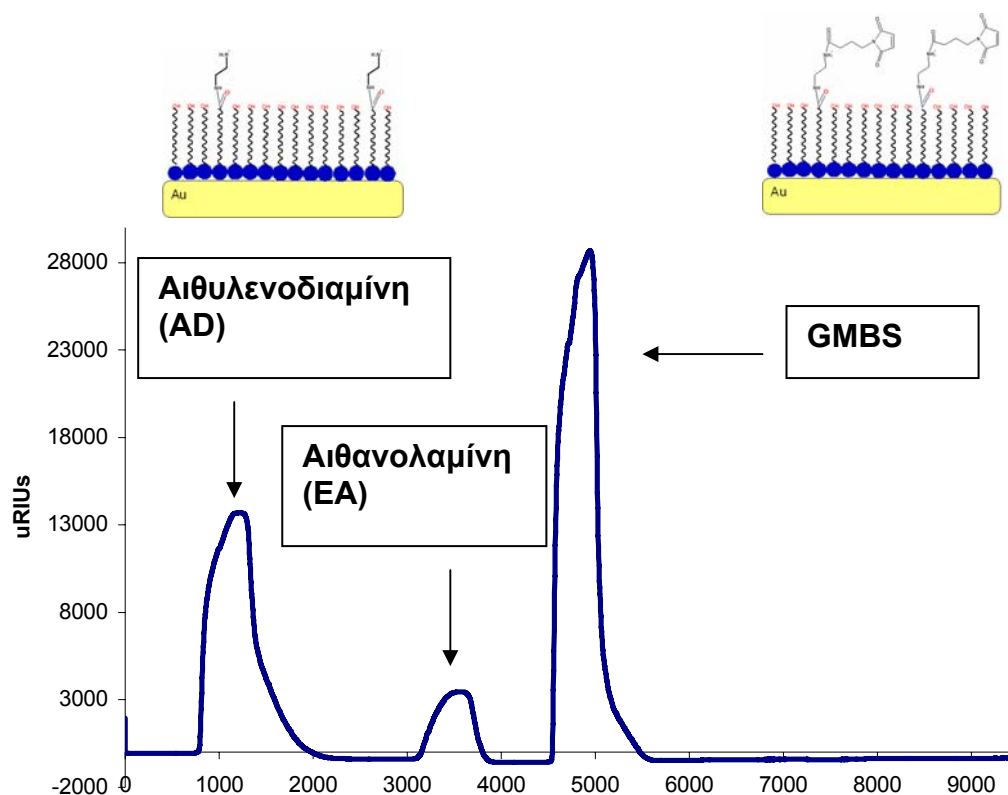


Εικόνα 46. αντίδραση GMBS και των πεπτιδίων

6.3) Πειράματα SPR για τον έλεγχο της ακινητοποίησης του πεπτιδίου-μελέτη της αλληλεπίδρασης των HLA μορίων καρκινικών κυτταρών με το πεπτίδιο.

Η ορθότητα της σύνθεσης, καθώς και η ακινητοποίηση των πεπτιδίων ελέγχθηκε με πραγματικού χρόνου (real time) πειράματα SPR. Σε κάθε περίπτωση παρατηρήθηκε αλλαγή στο σήμα του αισθητήρα λόγω της αλλαγής στο δείκτη διάθλασης κατά την εισαγωγή των δειγμάτων. Μετρήθηκε η τελική συνολική διαφορά, μεταξύ των τιμών του δείκτη διάθλασης πριν την εισαγωγή του κάθε αντιδραστήριου και μετά την ολική έξοδο τους από την επιφάνεια του αισθητήρα, και συσχετίστηκε με την αλλαγή στην μάζα ώστε να γίνουν κατανοητές οι διεργασίες που λαμβάνουν μέρος στην επιφάνεια του αισθητήρα. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να αναφέρουμε ότι οι τιμές έχουν υπολογιστεί αφού πρώτα έχει επέλθει εξισορρόπηση, τόσο πριν, όσο και μετά την εισαγωγή κάθε δείγματος. Τα πειράματα έγιναν με monolayers διαφορετικής μοριακής αναλογίας και χρησιμοποιήθηκε μόνο το δι-λειτουργικό αντιδραστήριο GMBS. Πρέπει να αναφερθεί ότι οι SPR βιοαισθητήρες είναι ιδιαίτερα ευαίσθητοι σε αλλαγές μάζας που προέρχονται από μόρια με μοριακό βάρος >500 Dalton. Για τον λόγο αυτό τα αποτελέσματα της οργανικής σύνθεσης συγκρίθηκαν επίσης με εκείνα που έχουν προκύψει από πειράματα που κάθε στάδιο ακινητοποίησης ελέγχεται από αντίδραση αβιδίνης- στρεπταβιδίνης (O'Shannessy, 1992).

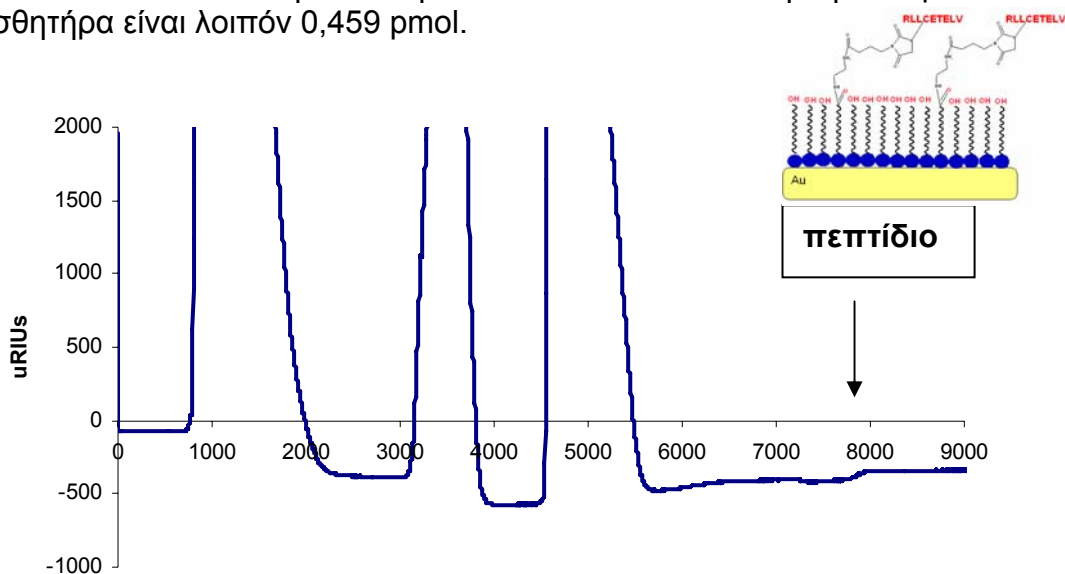
Σε κάθε περίπτωση η καμπύλη των δεδομένων των πειραμάτων εμφανίζει το ίδιο μοτίβο (γράφημα 1).



Γραφημα 1. Αλλαγή του σήματος του βιοαισθητήρα κατά την εισαγωγή των δειγμάτων

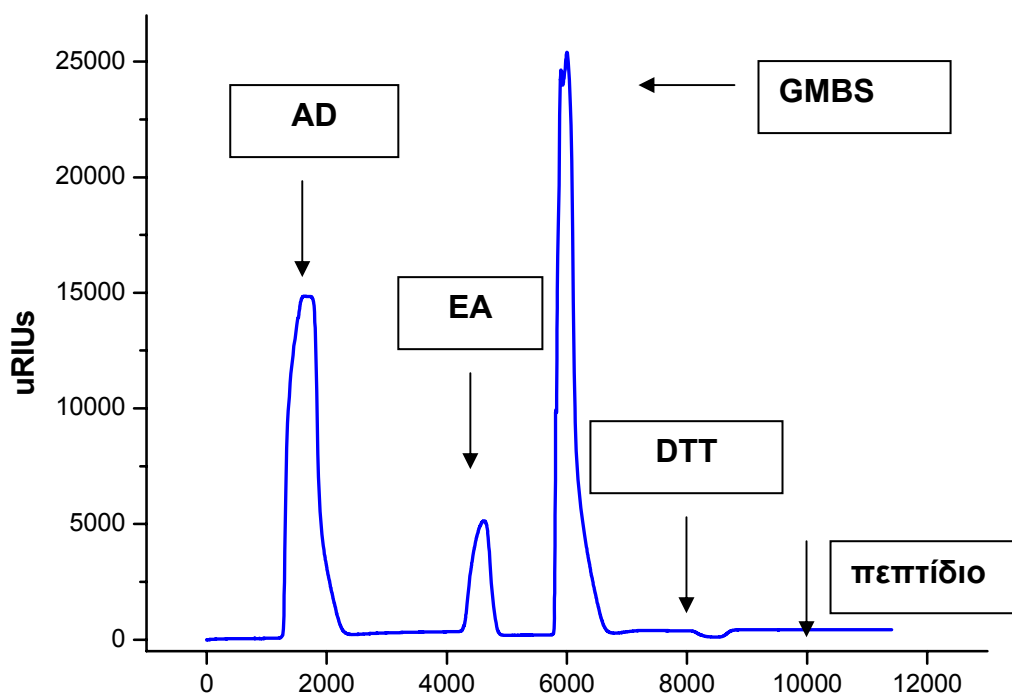
Συγκεκριμένα κατά την προσθήκη της αιθυλενοδιαμίνης παρατηρούμε μείωση της μάζας στην επιφάνεια του αισθητήρα. Αυτό είναι σύμφωνο με την οργανική σύνθεση, αφού μόρια της αιθυλενοδιαμίνης αντιδρούν με τους NHS-εστέρες και απελευθερώνονται ομάδες NHS (εικόνα 41). Δεδομένου ότι οι ομάδες NHS έχει μεγαλύτερο μοριακό βάρος (115) από την αιθυλενοδιαμίνη (50), η αλλαγή της μάζας είναι αρνητική (μείωση). Η μείωση για το συγκεκριμένο γράφημα είναι 315 uRIUs (γράφημα 2).

Για τον ίδιο λόγο, παρατηρούμε μείωση στη μάζα κατά την διάρκεια της αντίδρασης απενεργοποίησης των ενεργοποιημένων καρβοξυλομάδων που δεν αντέδρασαν με την αιθυλενοδιαμίνη (186 uRIUs) γράφημα 2. Σε αυτήν την αντίδραση μόρια αιθανολαμίνης (MB: 52) αντιδρούν με τους NHS-εστέρες και απελευθερώνονται ομάδες NHS (εικόνα 41). Το επόμενο στάδιο στην οργανική σύνθεση είναι η αντίδραση της ελεύθερης αμινομάδας, της αιθυλενοδιαμίνης με το GMBS. Στο στάδιο αυτό έχουμε φανερό αύξηση της μάζας στην επιφάνεια του αισθητήρα κάτι απολύτως λογικό (γράφημα 2). Για το γράφημα που παρατίθεται η αλλαγή στο δείκτη διάθλασης είναι 96 uRIUs. Τέλος προστίθεται το διάλυμα του πεπτιδίου (RLLCETELV) με συγκέντρωση 50 μM . Το πεπτίδιο αντιδρά με την μαλεϊμιδική ομάδα του GMBS και ακινητοποιείται στην επιφάνεια, προσθέτοντας και άλλη μάζα, που αποδεικνύεται από την αλλαγή του δείκτη διάθλασης. Για το συγκεκριμένο γράφημα η αλλαγή είναι 64 uRIUs. Σαφώς, θα ήταν πιο λογική μια μεγαλύτερη τιμή, αν αναλογιστούμε την μάζα του πεπτιδίου. Παρόλα αυτά πρέπει να ληφθεί υπ' όψιν το γεγονός ότι το διάλυμα του πεπτιδίου περιείχε και 50 μM DTT, που ανταγωνίζεται στην δέσμευση. Επίσης είναι πιθανό οι περισσότερες θέσεις να καταλαμβάνονται από DTT, καθώς λόγω μεγέθους έχουν μεγαλύτερη ταχύτητα διάχυσης, και προσεγγίζουν γρηγορότερα, ευκολότερα και με κατάλληλο προσανατολισμό την μαλεϊμιδική ομάδα του GMBS. Τα moles των πεπτιδίων στην επιφάνεια του SPR, που προκύπτουν από τους ίδιους θεωρητικούς υπολογισμούς όπως και στην περίπτωση του Q-sense παραπάνω, είναι 4,18 pmol για monolayer με μοριακή ανάλογια 1/20. Παρόλα αυτά, από τα πειραματικά δεδομένα διαπιστώνουμε συνολική αλλαγή 64 uRIUs του δείκτη διάθλασης που μεταφράζεται σε 38,9 pg/mm^2 ή 0,042 pmol/mm^2 . Η συνολική ποσότητα του πεπτιδίου σε όλη την επιφάνεια του αισθητήρα είναι λοιπόν 0,459 pmol.

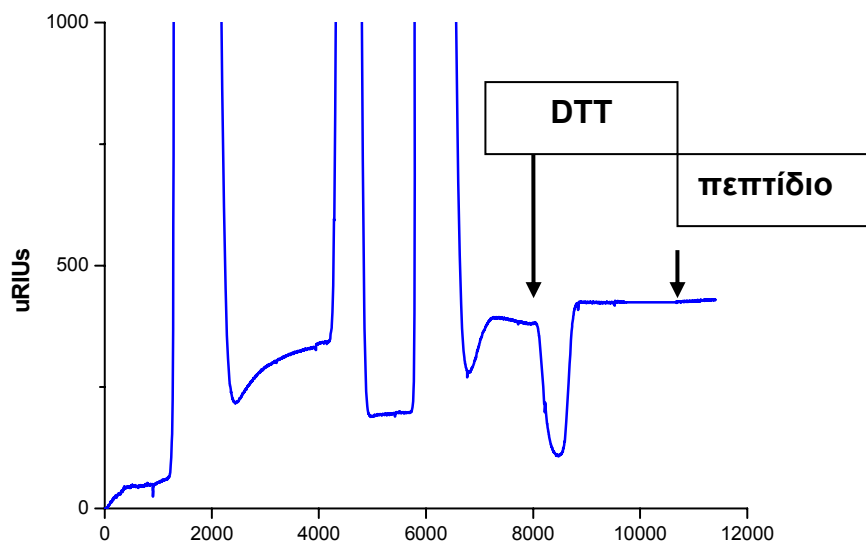


Γραφημα 2. Αλλαγή του σήματος του βιοαισθητήρα κατά την εισαγωγή των δειγμάτων

Για να επιβεβαιωθεί η ακινητοποίηση του πεπτιδίου έγινε πείραμα αρνητικού ελέγχου (negative control). Στο πείραμα αυτό ακολουθήθηκε η ίδια σύνθεση, με την διαφορά ότι αντί πεπτιδίου, χρησιμοποιήθηκε DTT ίσης συγκέντρωσης με την συνολική συγκέντρωση πεπτιδίου-DTT, των άλλων πειραμάτων. Τέλος προστέθηκε διάλυμα πεπτιδίου. Τα αποτελέσματα ήταν διαφωτιστικά. Το γράφημα εμφανίζει το ίδιο μοτίβο όπως και τα προηγούμενα πειράματα όσον αφορά τα διαδοχικά βήματα της σύνθεσης (γράφημα 3). Παρατηρούμε όμως, ότι κατά την εισαγωγή του DTT, η διαφορά του δείκτη διάθλασης είναι 34 uRIUs, που είναι χαμηλότερη σε σύγκριση με την αλλαγή που προκαλούν τα πεπτίδια (Πίνακας 4). Σημαντική είναι και η διαπίστωση, ότι μετά το πέρασμα του πεπτιδίου δεν εμφανίζεται καμία αλλαγή. Έτσι η διαφορά που βλέπουμε στα άλλα γραφήματα υποδηλώνει ακινητοποίηση του πεπτιδίου.



Γραφημα 3. Αλλαγή του σήματος του βιοαισθητήρα κατά την εισαγωγή των δειγμάτων σε αρνητικού τύπου πείραμα



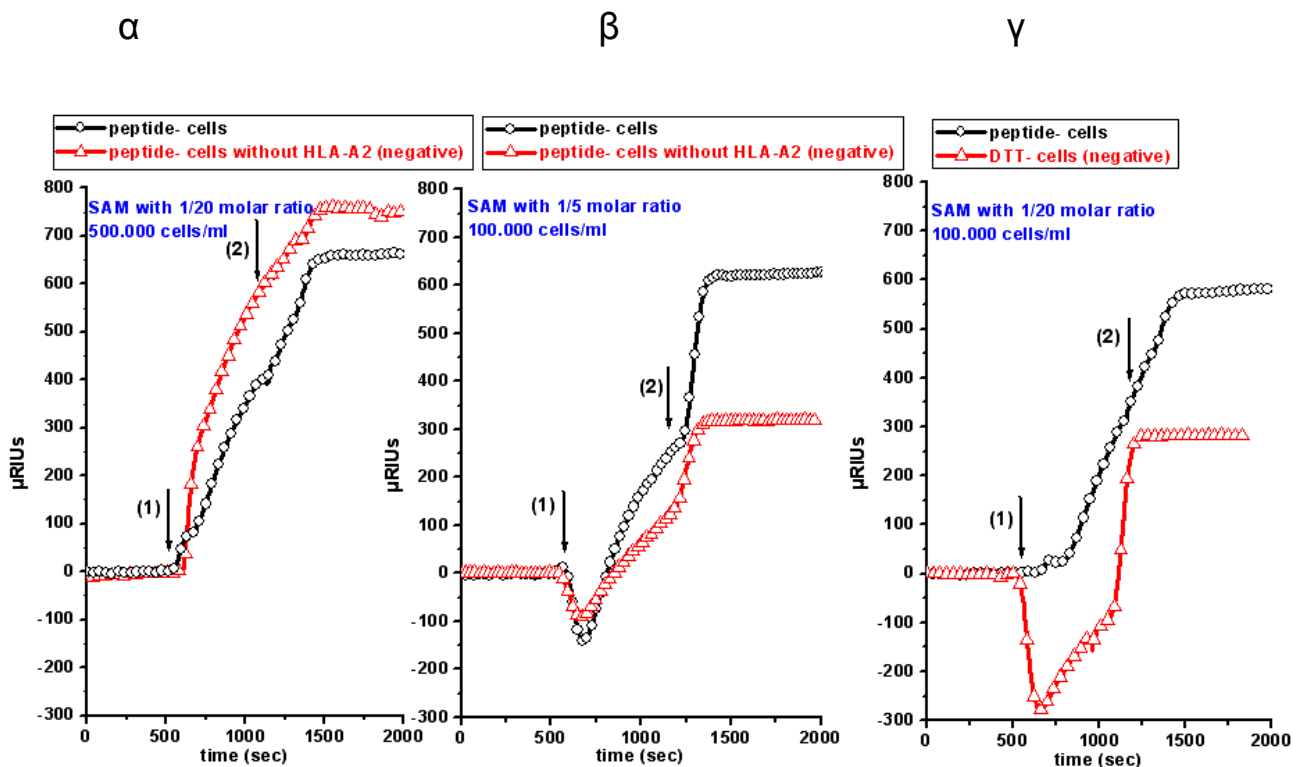
Γραφήμα 4. Αλλαγή του σήματος του βιοαισθητήρα κατά την εισαγωγή των δειγμάτων

Επίσης χρησιμοποιήθηκε άλλο είδος πεπτιδίου (KLLCFRETV) ώστε να επιβεβαιωθεί ότι η επιφαινόμενη ακινητοποίηση δεν αφορά μόνο το πεπτίδιο που έγιναν τα περισσότερα πειράματα. Τα αποτελέσματα φαίνονται συγκεντρωτικά στον πίνακα 4.

DA	EA	GMBS	PEPTIDE
-315	- 186	270	64
-126	-325	96	44
-163	-56	842	average: 54 ± 14,14
-247	-135,7	241	
		371	PEPTIDE 2
		189,2	109
average: -212,75 ± 84,90	average: -175,67 ± 113,02	average: 334,8667 ± 264,4937	
			DTT
			41,1

Πίνακας 4. Αλλαγές σήματος του βιοαισθητήρα σε uRIUs μονάδες.

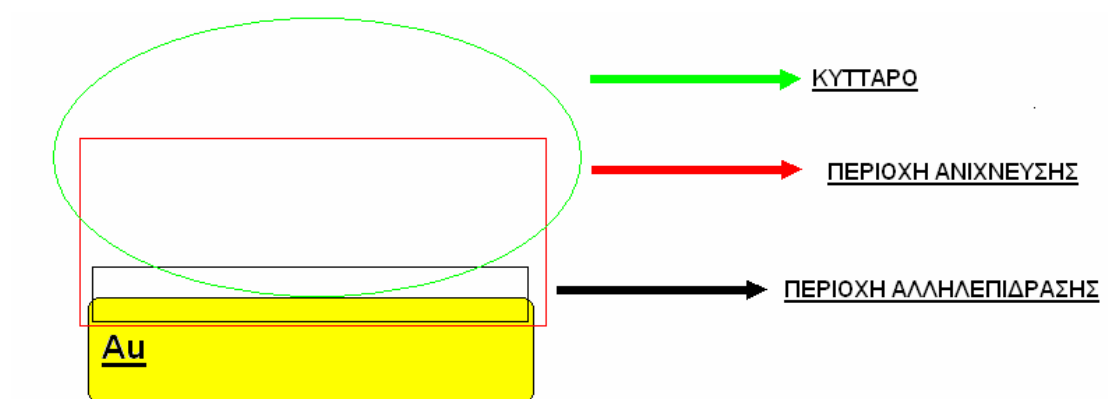
Μετά την ακινητοποίηση των πεπτιδίων, ακολουθούσε εισαγωγή καρκινικών κυττάρων (LG2), που είχαν MHC στην μεμβράνη τους ώστε να μελετηθεί η συγγένεια τους για αυτά. Πάντα παρατηρούνταν μια μεγάλη αλλαγή στη μάζα, στην επιφάνεια του αισθητήρα (γράφημα 6). Για να διαπιστωθεί αν η αλλαγή στην μάζα οφείλεται σε ειδική αλληλεπίδραση με τα αντιγονικά πεπτίδια, χρησιμοποιήθηκαν καρκινικά κύτταρα χωρίς MHC (K562) στην μεμβράνη τους (negative control). Παρατηρήθηκε αύξηση της μάζας, και μάλιστα η καμπύλη εμφάνισε το ίδιο μοτίβο (γράφημα 6).



Γράφημα 6: Γραφήματα του αισθητήρα για την αλληλεπίδραση μεταξύ τροποποιημένης με πεπτίδιο επιφάνειας και κυττάρων. Η ροή (flow rate) ήταν 25 $\mu\text{l}/\text{ml}$ σε όλες τις περιπτώσεις. Τα βέλη δείχνουν το χρόνο εισαγωγής των κυττάρων (1) και της εισαγωγής του φέρον διαλύτη (loading buffer) (2), αντίστοιχα.

Επίσης χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικής μοριακής αναλογίας monolayers και διαφορετικός αριθμός κυττάρων. Τα πειράματα με monolayers διαφορετικής μοριακής αναλογίας εμφάνιζαν το ίδιο μοτίβο αλλά ήταν αδύνατο τα αποτελέσματα να συσχετιστούν με την ειδική αλληλεπίδραση MHC/ πεπτίδιο. Πειράματα με διαφορετικό αριθμό κυττάρων έδειξαν ότι σε συνθήκες κορεσμού της επιφάνειας η αλλαγή στο δείκτη διάθλασης είναι μεγαλύτερη στα αρνητικά από ότι στα θετικά controls (γράφημα 6). Άρα η αλληλεπίδραση δεν είναι ειδική ή δεν μπορούμε απλά να την ανιχνεύσουμε με την τεχνική του SPR. Είναι γνωστό, ότι με την μέθοδο του SPR είναι δυνατόν να ανιχνευτούν αλλαγές στη μάζα σε περιοχή 200-300 nm από την επιφάνεια του χρυσού του device (Gizeli & Love 2002).

Με την διαδικασία ακινητοποίησης που χρησιμοποιούμε το πεπτίδιο βρίσκεται περίπου 20-30 Å⁰ πάνω από την επιφάνεια του χρυσού, οπότε η αλληλεπίδραση με τα ΜHC είναι αδύνατον να παρατηρηθεί αφού “καλύπτεται” από την μάζα του κυττάρου που εισέρχεται στην περιοχή ανίχνευσης (bulk effect) (εικόνα 47).



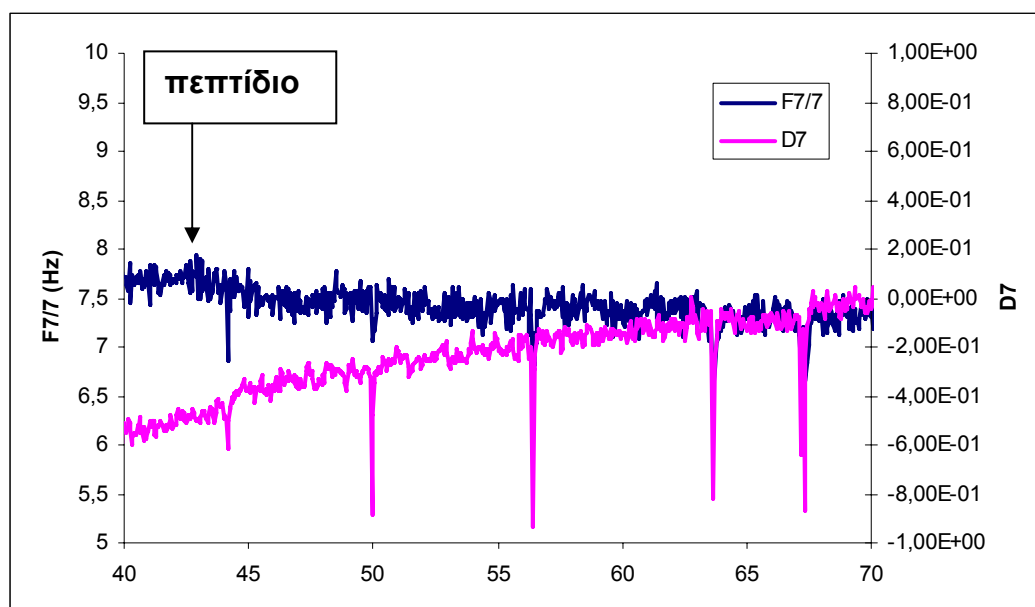
Εικόνα 47. Γραφική αναπαράσταση των ορίων ανίχνευσης του SPR βιοαισθητήρα (όχι σε κλίμακα)

Τέλος ελέγχθηκε η απόκριση των κυττάρων σε διαφορετικά πεπτίδια χωρίς να βγουν σαφή συμπεράσματα.

6.4) Ανίχνευση της αλληλεπίδρασης μεταξύ των HLA μορίων καρκινικών κύτταρων και πεπτιδίων με Q-sense βιοαισθητήρα:

Οι ιδιότητες του SPR βιοαισθητήρα δεν οδήγησαν σε σαφή συμπεράσματα όσον αφορά την ειδική αλληλεπίδραση των HLA μορίων καρκινικών κύτταρων με τα πεπτιδία. Έτσι χρησιμοποιήθηκε ο ακουστικός βιοαισθητήρας Q-sense για περαιτέρω διερεύνηση της αλληλεπίδρασης.

Στα πειράματα που έγιναν με τον αισθητήρα Q-sense, δεν ήταν δυνατόν να ελεγχθεί η οργανική σύνθεση, καθώς πολλά από τα ελαστικά της συσκευής (o-ring, λαστιχάκια κ.λ.π.), δεν ήταν συμβατά με τα διαλύματα που έπρεπε να χρησιμοποιηθούν γι' αυτό ελέγχθηκε μόνο το στάδιο της προσθήκης του πεπτιδίου στην ενεργοποιημένη επιφάνεια. Η διαδικασία στηρίχτηκε σε επώαση του Q-sense device, με τα διάφορα αντιδραστήρια της που λαμβάνουν μέρος στην διαδικασία ακινητοποίησης των πεπτιδίων. Η εισαγωγή, όμως του πεπτιδίου RLLCETELV, έγινε σε πραγματικού χρόνου πείραμα και έτσι είναι εύκολο να διαπιστώσουμε την ακινητοποίηση του. Επίσης χρησιμοποιήθηκε και το συνθετικό αντιγονικό πεπτιδίδιο KLLCFRETV του οποίου η συγγένεια για τα MHC μόρια προβλέφθηκε μέσω του υπολογιστικού προγράμματος και ελέγχθηκε με κυτταρομετρία ροής. Από το (γράφημα 7) είναι φανερό μια αλλαγή τόσο στην συχνότητα όσο και στην ενέργεια απόσβεσης (dissipation energy), το σύνολο της ενέργειας που χάνεται στο σύστημα ανά κύκλο ταλάντωσης. Δεδομένου ότι η αλλαγή στη συχνότητα ΔF σχετίζεται με αλλαγή στη μάζα στην επιφάνεια του Q-sense device, και παρατηρώντας μείωση της ($\Delta F = 0,412$ Hz), αναγνωρίζουμε ότι το πεπτιδίδιο έχει ακινητοποιηθεί. Σε αυτό συνηγορεί και το γεγονός ότι μετά από εξισορρόπηση με διάλυμα PBS δεν έχουμε μεταβολή της συχνότητας.



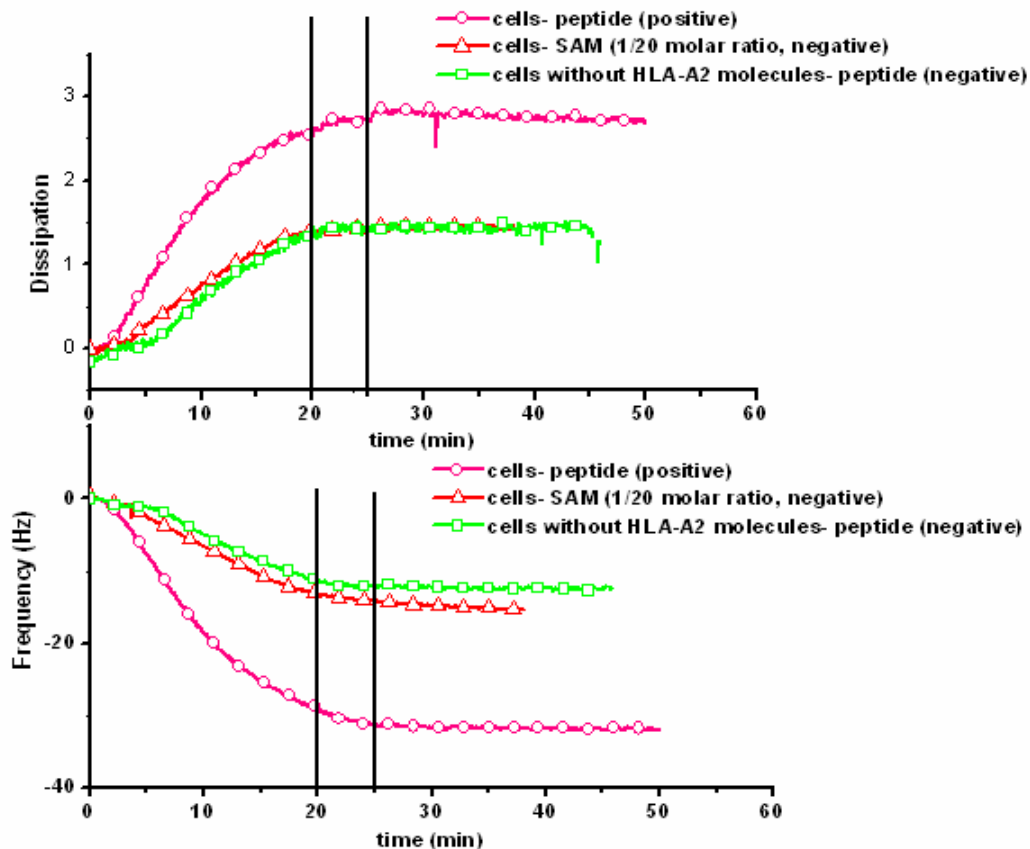
Γραφημα 7. Αλλαγή στην συχνότητα και την ενέργεια απόσβεσης

Η αλλαγή στην ενέργεια απόσβεσης (αύξηση), κατά 0,492 φανερώνει ότι το στρώμα έγινε πιο εύκαμπτο με την προσθήκη του πεπτιδίου. Παρόλα αυτά πρέπει να αναφερθεί ότι η αλλαγή δεν είναι τόσο μεγάλη ώστε να είμαστε απόλυτα σίγουροι για τη ακινητοποίηση του.

Ακολούθησε η εισαγωγή καρκινικών κυττάρων που είχαν MHC στην επιφάνεια τους, ώστε να ελέγξουμε την αλληλεπίδραση τους με τα ακινητοποιημένα πεπτιδία.

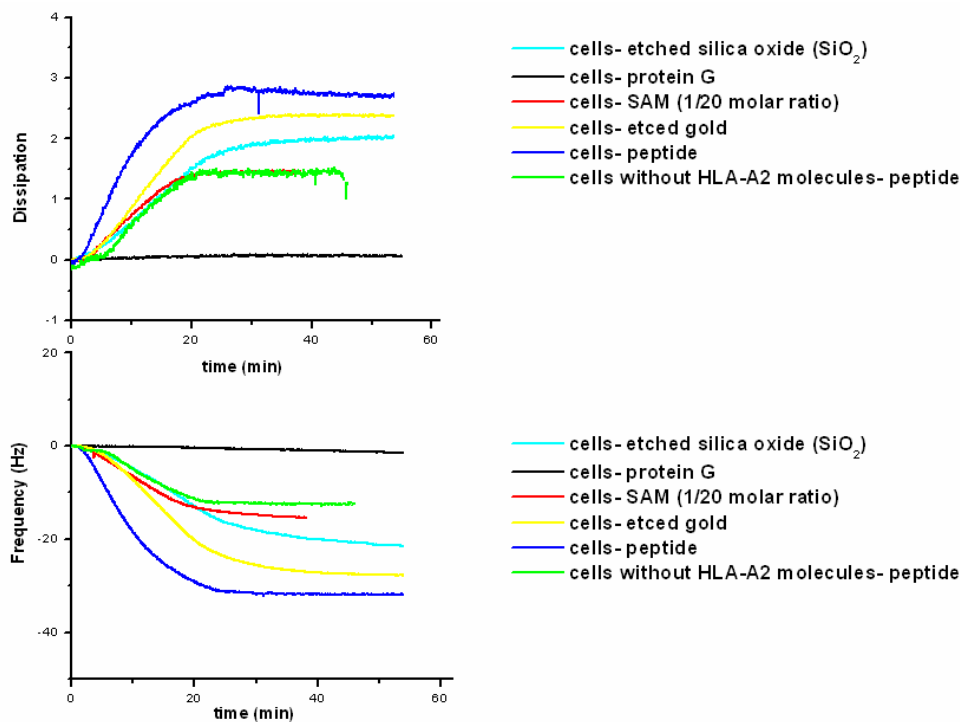
Στο QCM, η αλλαγή στη συχνότητα συσχετίζεται με τη μάζα των κυττάρων και η αλλαγή στην ενέργεια απόσβεσης με τις ίξωδο-ελαστικές ιδιότητες των κυττάρων (Galla 1998, Johannsmann 2005). Ο αισθητήρας QCM (Ballantine 1997) είναι ευαίσθητος σε αλλαγές μάζας και ίξωδο-ελαστικών ιδιοτήτων που γίνονται περίπου ~ 200- 300 nm πάνω από την επιφάνεια του χρυσού. Διενεργήθηκαν δύο τύποι αρνητικών πειραμάτων ελέγχου. Κατ' αρχάς, κύτταρα που δεν εκφράζουν HLA (K562) προστέθηκαν σε τροποποιημένη με πεπτιδίο επιφάνεια QCM. Δεύτερον κύτταρα που εκφράζουν HLA (LG2) προστέθηκαν σε τροποποιημένη με SAM επιφάνεια QCM, χωρίς το αντιγονικό πεπτιδίο. Και τα δύο είδη πειραμάτων επέδειξαν παρόμοια αλλαγή, εντούτοις, ήταν χαμηλότερα (~50%) από την αλλαγή που παρήχθη μετά από την προσθήκη LG2 των κυττάρων σε επιφάνεια με πεπτιδίο. Αυτό αποκαλύπτει ότι η διαφορά στο σήμα μεταξύ των θετικών - αρνητικών πειραμάτων αντιστοιχεί στην αλληλεπίδραση μεταξύ των μορίων HLA με τα πεπτιδία (γράφημα 8).

Επιπλέον, η συχνότητα και η ενέργεια απόσβεσης συνέχιζε να αλλάζει ακόμα και μετά από την εισαγωγή του φέροντος διαλύματος (loading buffer). Στα αρνητικά πειράματα ελέγχου, δεν υπάρχει καμία περαιτέρω αλλαγή, που δείχνει ότι η αλληλεπίδραση των μορίων HLA-A2 με τα πεπτιδία θα μπορούσε να οδηγήσει σε κυτταρική προσκόλληση (γράφημα 8). Δυστυχώς, η επαναληψιμότητα αυτών των πειραμάτων ήταν χαμηλή, πιθανώς λόγω της σύνθετης φύσης της αλληλεπίδρασης κυττάρων/υποστρωμάτων.



Γράφημα 8. Γραφήματα του αισθητήρα για την αλληλεπίδραση μεταξύ τροποποιημένης με πεπτίδιο επιφάνειας και κυττάρων: θετική αλληλεπίδραση κυττάρων/πεπτιδίων (0), αλληλεπίδραση κυττάρων χωρίς HLA-A2 μόρια/πεπτιδίων (Δ), αλληλεπίδραση κυττάρων/SAM (\square). Για τα δύο πρώτα η ροή ήταν 25 $\mu\text{l/ml}$ και ο αριθμός κυττάρων ήταν 600000 κύτταρα/ μl . Για το τρίτο το ποσοστό ροής ήταν 10 $\mu\text{l/ml}$ και ο αριθμός κυττάρων ήταν 500000 κύτταρα/ μl . Ο χρόνος επώασης (incubation time) ήταν ίδιος σε όλες τις περιπτώσεις. Οι γραμμές δείχνουν την αλλαγή στην συχνότητα και την ενέργεια απόσβεσης ακόμα και μετά από την εισαγωγή του φέροντος διαλύματος (loading buffer)

Για να βελτιστοποιήσουμε την απόκριση του αισθητήρα στην αλληλεπίδραση των HLA μορίων με τα κύτταρα έπρεπε, όπως διαφαίνεται από τα παραπάνω, να μειώσουμε την μη ειδική αλληλεπίδραση των κυττάρων με την επιφάνεια. Αυτή η μη ειδική αλληλεπίδραση οφείλεται στην συγγένεια των κυττάρων με την επιφάνεια. Επιφάνειες διαφορετικής φύσης, διαβρεξιμότητας (wettability) και φορτίου ελέχθησαν για την συγγένεια τους με κύτταρα (γράφημα 9).



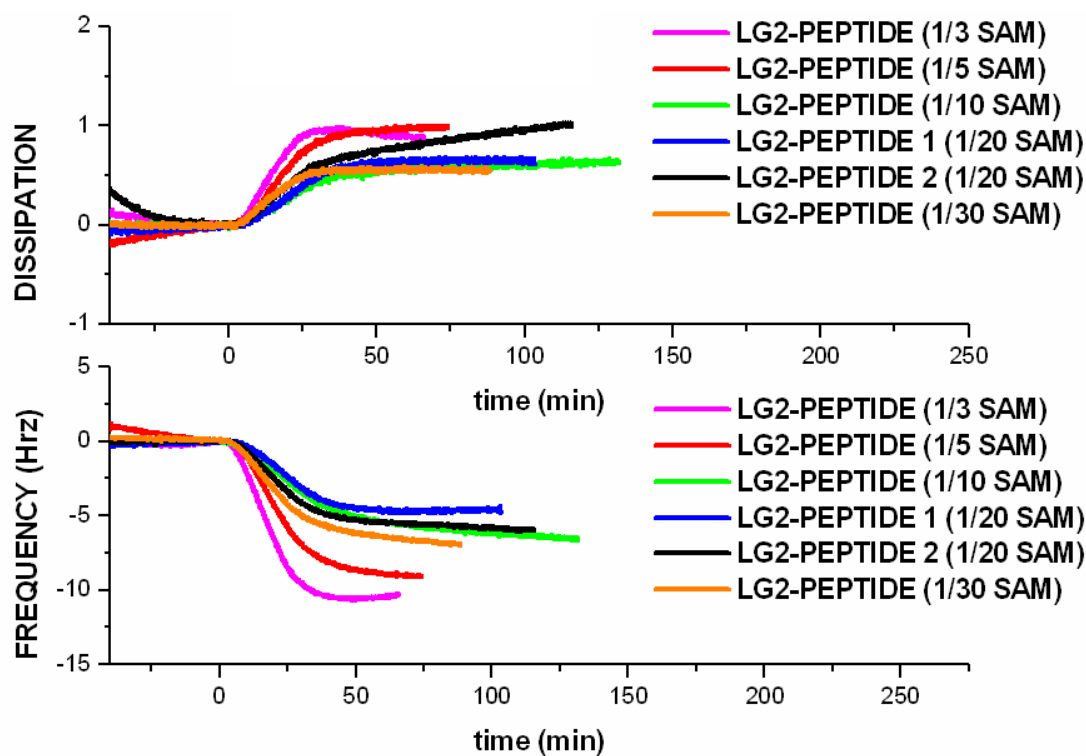
1

Γράφημα 9. Συγγένεια των κυττάρων για επιφάνειες διαφορετικής φύσης διαβρεξιμότητας (wettability) και φορτίου. Για το τρίτο το ποσοστό ροής ήταν 10 $\mu\text{l/ml}$ και ο αριθμός κυττάρων ήταν 500000 κύτταρα/ml.

Τα κύτταρα αλληλεπιδρούν ελάχιστα με επιφάνεια κορεσμένη με πρωτεΐνη G, ενώ παρουσιάζουν την μεγαλύτερη απόκριση στην περίπτωση της επιφάνειας του χρυσού. Η επιφάνεια κορεσμένη με πρωτεΐνη G είναι σχετικά υδρόφιλη και το πάχος της είναι μεγαλύτερο από εκείνο της υδρόφοβης επιφάνειας χρυσού. Αυτού του είδους τα πειράματά μας παρέχουν μια έμμεση απόδειξη της ύπαρξης του SAM καθώς η αλληλεπίδραση των κυττάρων με τα πεπτίδια προκαλεί την μεγαλύτερη αλλαγή στο σήμα του αισθητήρα. Κάτι που θα περιμέναμε για την επιφάνεια του χρυσού αναλογιζόμενοι την φύση και τις ιδιότητες της. Επίσης η αλλαγή είναι διαφορετική όταν προστίθενται κύτταρα σε επιφάνεια με SAM και σε επιφάνεια με χρυσό (γράφημα 9).

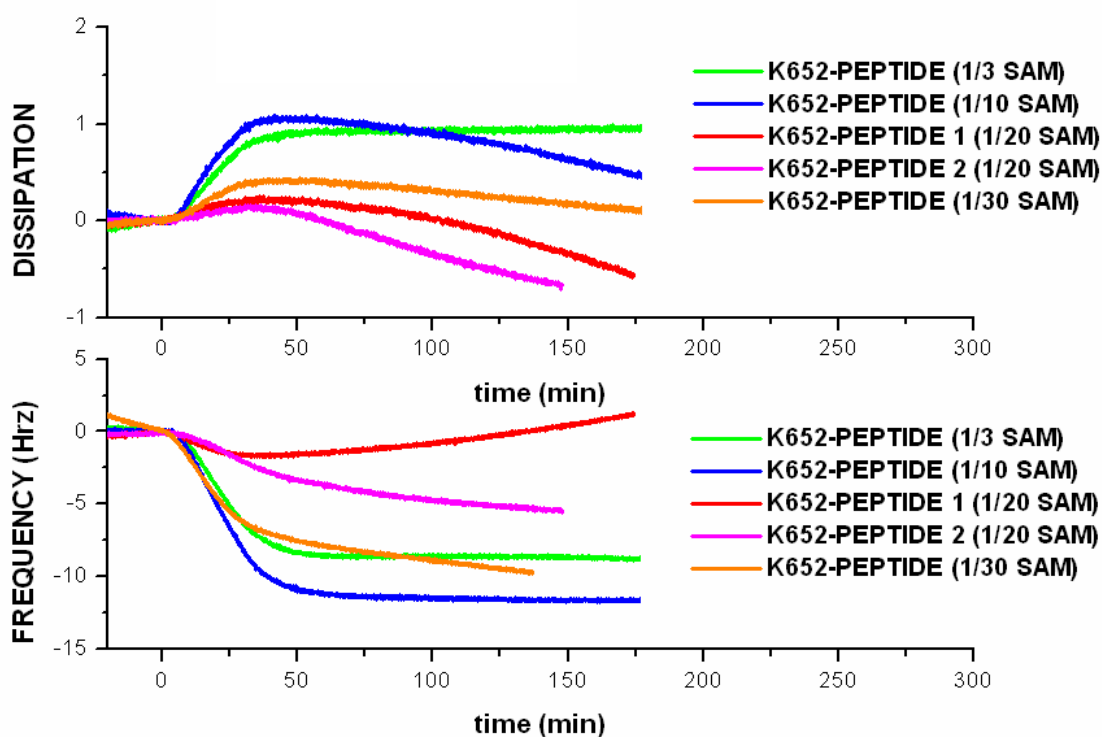
Λαμβάνοντας υπ' όψιν μας τα παραπάνω αποτελέσματα χρησιμοποιήσαμε στην συνέχεια ως δι-λειτουργικό αντιδραστήριο το NHS-PEO₄-Maleimide που περιέχει τέσσερις σχετικά υδρόφιλες ομάδες πολυαιθυλονογλυκόλης και σχηματίζει επιφάνεια με συνολικό πάχος $\sim 55 \text{ \AA}$. Συγκεκριμένα έγιναν πειράματα θετικού ελέγχου (LG2 κύτταρα/πεπτίδιο) με επιφάνειες τροποποιημένες με SAMs διαφορετικής μοριακής αναλογίας (1/3, 1/5, 1/10, 1/20, 1/30) και δύο ειδών πειράματα αρνητικού ελέγχου (K562 κύτταρα/ πεπτίδιο, LG2 κύτταρα/ κυστεΐνη).

Τα θετικού ελέγχου πειράματα, με SAMs διαφορετικής μοριακής αναλογίας, εμφανίζουν το ίδιο κινητικό μοτίβο (αύξηση στην ενέργεια απόσβεσης, μείωση στην συχνότητα) (γράφημα 10). Παρόλα αυτά η αλλαγή του σήματος είναι σε κάθε περίπτωση μικρότερη (~60%) από την αντίστοιχη που επιφέρει η αλληλεπίδραση των κυττάρων με τα πεπτιδία όταν χρησιμοποιείτε το GMBS ως δι-λειτουργικό αντιδραστήριο. Η παρατήρηση αυτή είναι αναμενόμενη αν σκεφτούμε ότι το πάχος της επιφάνειας μεγαλώνει (από 20-30 σε 55 Å), καθώς αυξάνεται το μήκος του δι-λειτουργικού αντιδραστήριου και έτσι η αλληλεπίδραση συμβαίνει σε πιο μεγάλο ύψος. Όσο πιο πάνω από την επιφάνεια του αισθητήρα γίνεται μια αλληλεπίδραση τόσο μικρότερη είναι και η απόκριση του (Kasemo 1998). Επίσης μειώνεται και το bulk effect που προκαλεί η μάζα των κυττάρων.



Γράφημα 10: γραφήματα του αισθητήρα για την αλληλεπίδραση μεταξύ τροποποιημένης με πεπτιδίο επιφάνειας και κυττάρων. Η ροή (flow rate) ήταν 10 $\mu\text{l}/\text{ml}$ σε όλες τις περιπτώσεις και ο αριθμός κυττάρων ήταν 50000 κύτταρα/ ml . Η ακινητοποίηση των πεπτιδίων έγινε σε SAMs με διαφορετική μοριακή αναλογία.

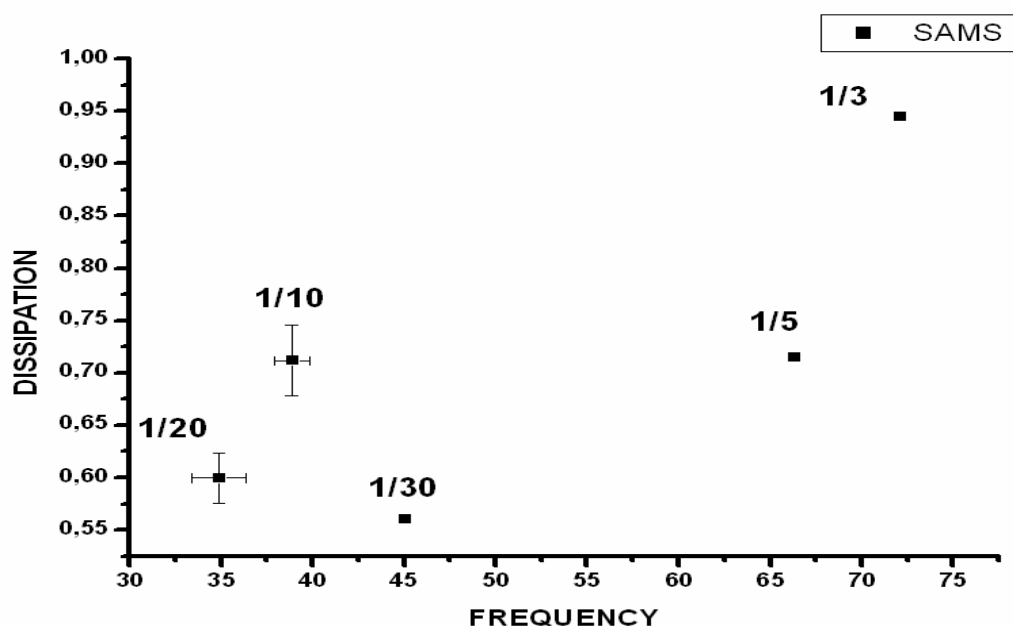
Τα αρνητικού έλεγχου πειράματα (K562-πεπτιδίο), έδειξαν καθαρά την μη ειδική αλληλεπίδραση των κυττάρων χωρίς HLA μόρια με τα πεπτιδία στις περιπτώσεις των SAMs με μοριακή αναλογία 1/10, 1/20, 1/30 (γράφημα 11). Για τα συστήματα αυτά η αλλαγή στην ενέργεια απόσβεσης είναι μηδέν. Αντίθετα στις περιπτώσεις των SAMs με μοριακή αναλογία 1/3, 1/5, αν και η αλλαγή του σήματος είναι μικρότερη από εκείνη των θετικών, σε καμία περίπτωση δεν μηδενίζεται η ενέργεια απόσβεσης. Πιθανή εξήγηση για αυτή την συμπεριφορά μπορεί να δοθεί από τους θεωρητικούς υπολογισμούς των ενεργών ομάδων των monolayers και του αριθμού των πεπτιδίων (πίνακας 4). Κατά την ακινητοποίηση του πεπτιδίου σε SAMs με μοριακή αναλογία 1/3, 1/5, λόγω στερεοχημικών παρεμποδίσεων, παραμένουν ελεύθερες ενεργές ομάδες οι οποίες μπορούν να αντιδράσουν ειδικά με άλλα μέρη του κυττάρου.



Γράφημα 11: Γραφήματα του αισθητήρα για αρνητικού έλεγχου πειράματα της αλληλεπίδρασης μεταξύ τροποποιημένης με πεπτιδίο επιφάνειας και κυττάρων K562. Η ροή (flow rate) ήταν 10 $\mu\text{l/ml}$ σε όλες τις περιπτώσεις και ο αριθμός κυττάρων ήταν 500000 κύτταρα/ml. Η ακινητοποίηση των πεπτιδίων έγινε σε SAMs με διαφορετική μοριακή αναλογία.

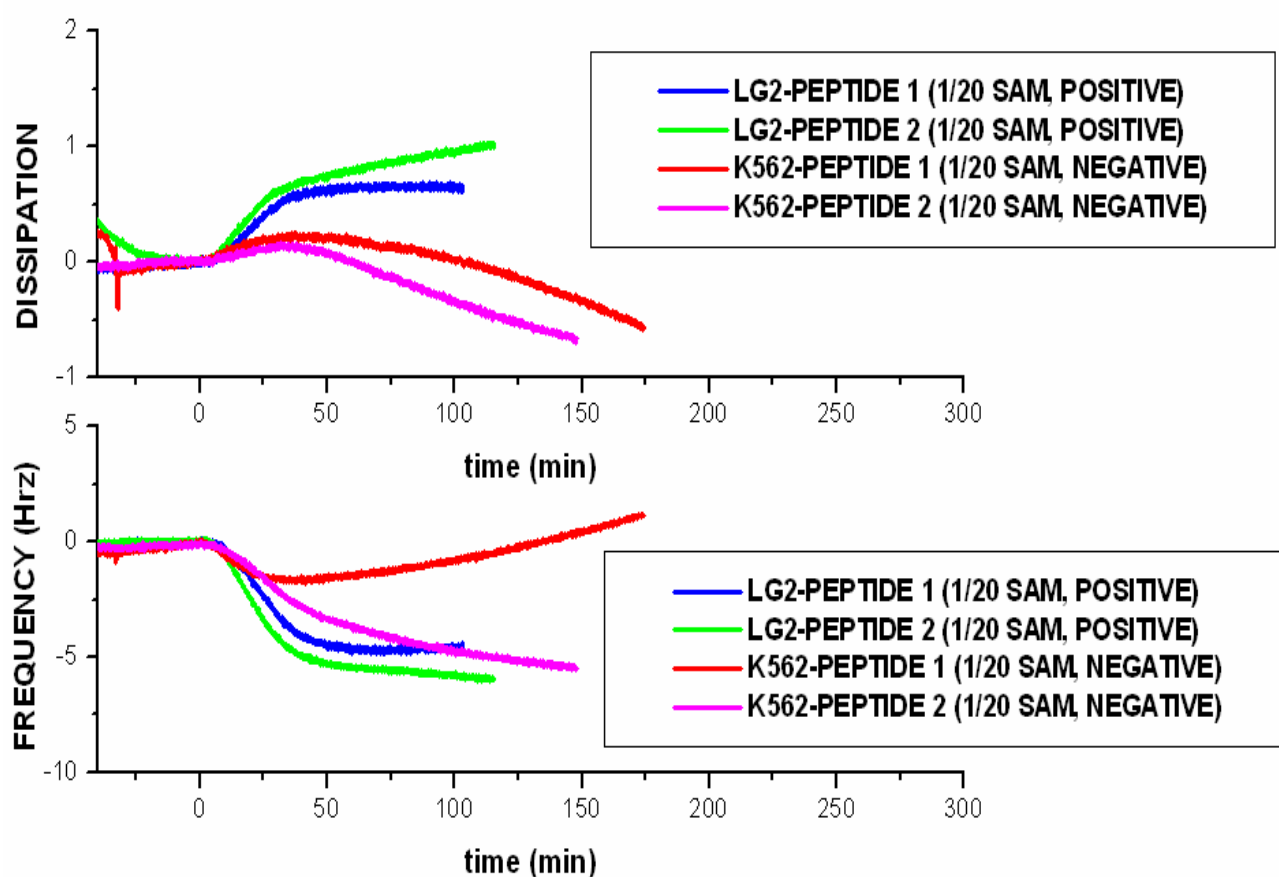
Για τον Q-sense βιοαισθητήρα το πηλίκο της αλλαγής ενέργειας απόσβεσης προς την αλλαγή της συχνότητας, D/F δίνει την φύση της αλληλεπίδρασης που συμβαίνει. Το γράφημα της αλλαγής της ενέργειας απόσβεσης προς την αλλαγή της συχνότητας μπορεί να βοηθήσει στην επιλογή του κατάλληλου συστήματος για την μελέτη της αλληλεπίδρασης των κυττάρων/πεπτιδίων (γράφημα 12). Όπως παρατηρούμε το μεγαλύτερο πηλίκο και άρα αλληλεπίδραση, δίνεται στην περίπτωση των SAMs με μοριακή αναλογία 1/3, 1/5. Παρόλα αυτά τα αρνητικού ελέγχου πειράματα δείχνουν ότι υπάρχει και μη ειδική αλληλεπίδραση (γράφημα 11). Αντιθέτως, τα SAMs 1/10, 1/20, 1/30, εμφανίζουν μικρότερη ειδική αλληλεπίδραση και διαφορετικό μοτίβο όσον αφορά την αποσβάνουσα ενέργεια (μηδενισμός). Η διαφορά αυτή καθιστά τα συστήματα αυτά ικανά για την ανίχνευση της αλληλεπίδρασης. Διαφαίνεται επίσης, ότι και στις δύο περιπτώσεις η ποσότητα του πεπτιδίου είναι καθοριστική. Όσο μεγαλύτερη είναι τόσο πιο μεγάλη αλληλεπίδραση έχουμε. Η διαπίστωση αυτή συμφωνεί απόλυτα με την θεωρητική προσέγγιση που έγινε για την ποσότητα του πεπτιδίου παραπάνω. (πίνακας 4).

Έχουμε δηλαδή ένα σύστημα που επηρεάζεται κυρίως από δύο παράγοντες: τις ελεύθερες ενεργές ομάδες και την ποσότητα του πεπτιδίου στην επιφάνεια. Μπορούμε λοιπόν να διακρίνουμε δύο επιμέρους περιπτώσεις: στην μία (SAMs με μοριακή αναλογία 1/10, 1/20, 1/30) η αλληλεπίδραση που ανιχνεύεται είναι ειδική και εξαρτάται από την επιφανειακή συγκέντρωση των πεπτιδίων, και στην άλλη (SAMs με μοριακή αναλογία 1/3, 1/5) ανιχνεύεται το σύνολο της ειδικής και μη ειδικής αλληλεπίδρασης και εξαρτάτε από την επιφανειακή συγκέντρωση των πεπτιδίων. Τέλος πρέπει να αναφέρουμε ότι το πηλίκο D/F παίρνει τιμές από 0,017 έως 0,019 για συστήματα με SAMs 1/10, 1/20, 1/30, και είναι χαρακτηριστικές για αλληλεπίδραση μεταξύ πρωτεϊνών (unpublished data).



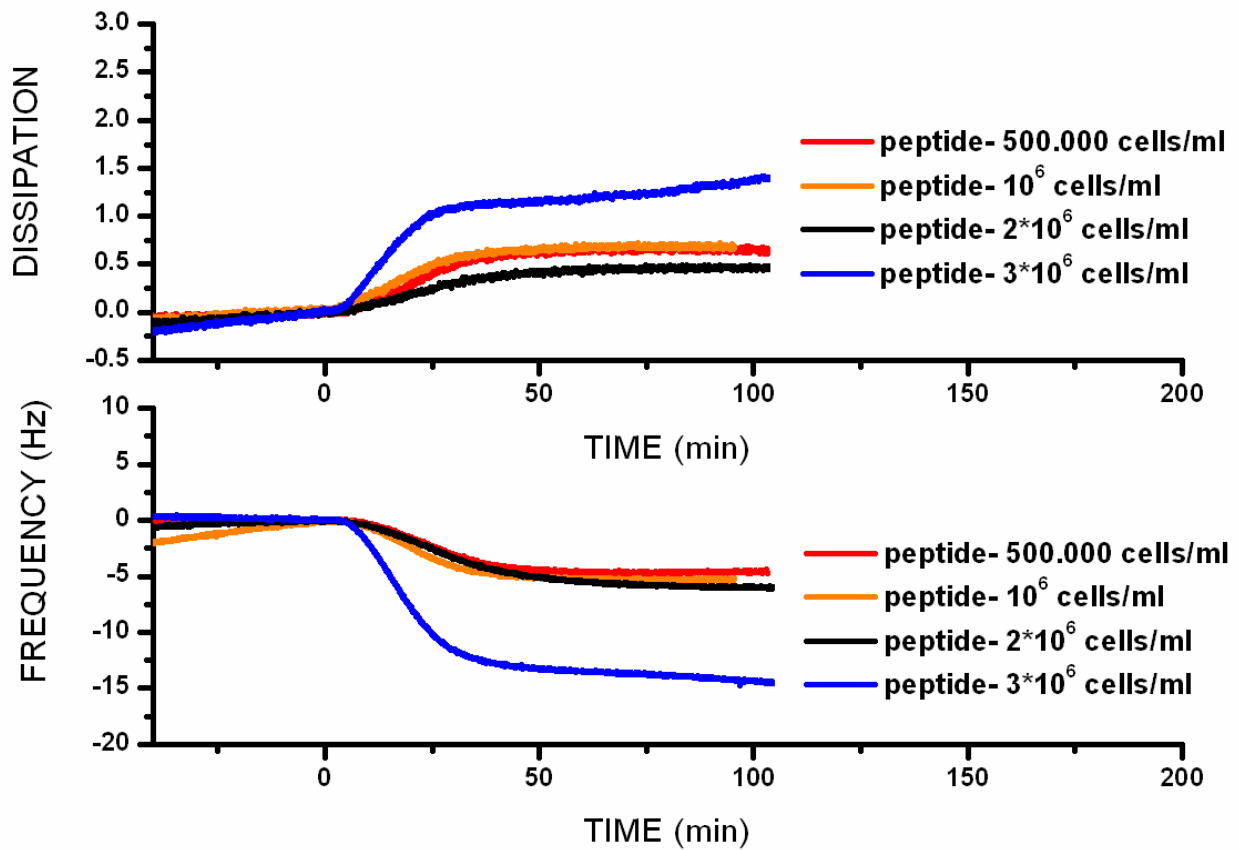
Γράφημα 12: Αλλαγή της ενέργειας απόσβεσης προς την αλλαγή της συχνότητας. το πηλίκο της αλλαγής ενέργειας απόσβεσης προς την αλλαγή της συχνότητας, D/F δίνει το μέτρο και την φύση της αλληλεπίδρασης που συμβαίνει

Στηριζόμενοι στα παραπάνω, επιλέξαμε το SAM με μοριακή αναλογία 1/20 ως το καταλληλότερο για την ακινητοποίηση του πεπτιδίου και την μελέτη της αλληλεπίδρασης του με τα HLA μόρια των λευχαιμικών καρκινικών κυττάρων LG2. Επίσης ελέγχθηκε η συγγένεια του συνθετικού αντιγονικού πεπτιδίου KLLCFRETV (γράφημα 13). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα δύο πεπτιδία έχουν παρόμοια συγγένεια για τα HLA μόρια.



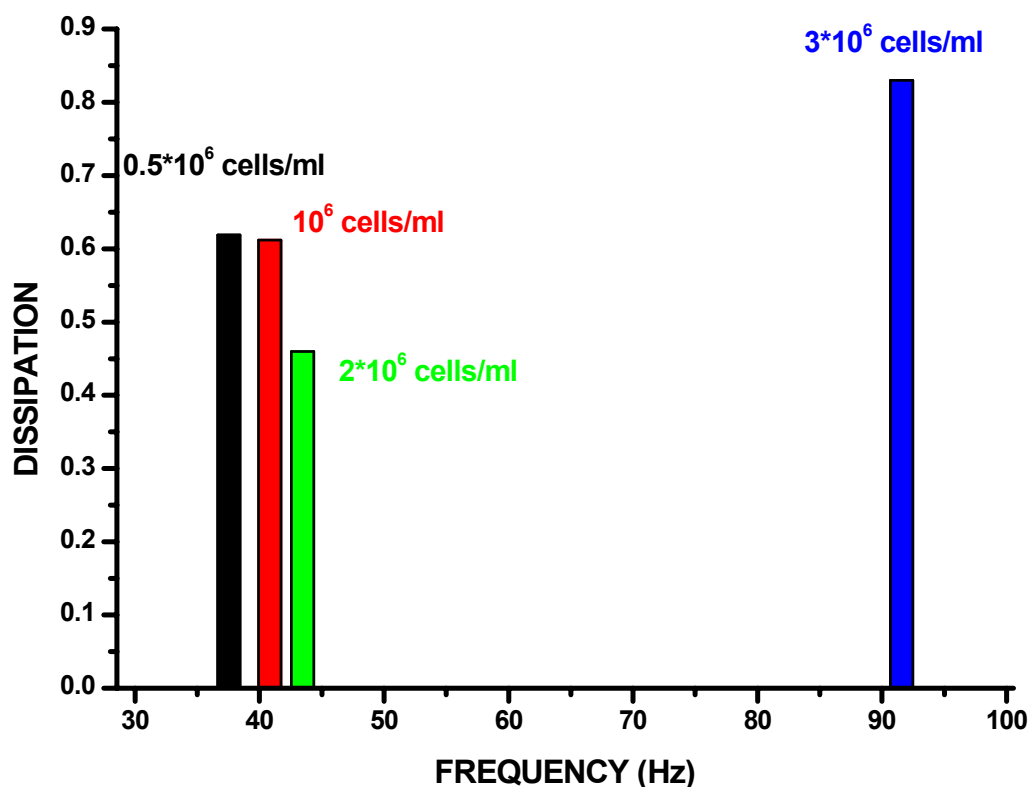
Γράφημα 13: Γραφήματα του αισθητήρα για θετικού έλεγχου πειράματα της αλληλεπίδρασης μεταξύ τροποποιημένης με πεπτιδίο επιφάνειας και κυττάρων LG2. Η ροή (flow rate) ήταν 10 $\mu\text{l}/\text{ml}$ σε όλες τις περιπτώσεις και ο αριθμός κυττάρων ήταν 500000 κύτταρα/ ml . Η ακινητοποίηση των πεπτιδίων έγινε σε SAMs με μοριακή αναλογία 1/20.

Τέλος, εξετάσθηκε η απόκριση του βιοαισθητήρα, στον οποίο η ακινητοποίηση του πεπτιδίου γίνεται σε SAM με μοριακή αναλογία 1/20, για διαφορετικό αριθμό κυττάρων (γράφημα 14). Η αύξηση του αριθμού των κυττάρων αυξάνει και την απόκριση του αισθητήρα.



Γράφημα 14: Γραφήματα του αισθητήρα για θετικού έλεγχου πειράματα της αλληλεπίδρασης μεταξύ τροποποιημένης με πεπτιδίο επιφάνειας και κυττάρων LG2. Η ροή (flow rate) ήταν 10 μ l/ml σε όλες τις περιπτώσεις και ο αριθμός κυττάρων ήταν 500000, 10⁶, 2* 10⁶, 3* 10⁶ κύτταρα/ml. Η ακινητοποίηση των πεπτιδίων έγινε σε SAMs με μοριακή αναλογία 1/20.

Το γράφημα της αλλαγής της ενέργειας απόσβεσης προς την αλλαγή της συχνότητας είναι ευθεία, της οποίας η κλίση είναι χαρακτηριστική του μέτρου και της φύσης της αλληλεπίδρασης που συμβαίνει (γράφημα 15). Ο βιοαισθητήρας μπορεί λοιπόν να χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο της αλληλεπίδρασης διαφορετικών πεπτιδίων με τα HLA μόρια καρκινικών κυττάρων.

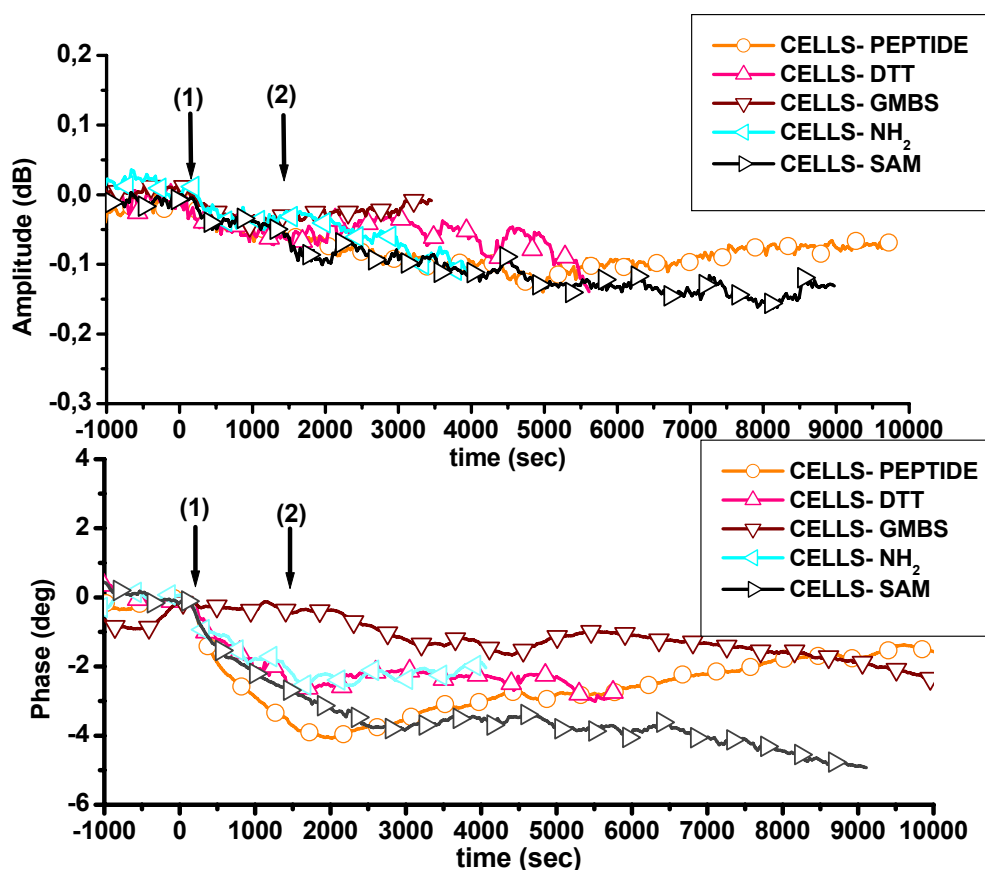


Γράφημα15: αλλαγή της ενέργειας απόσβεσης προς την αλλαγή της συχνότητας.

6.5 Πειράματα SAW:

Ο SAW βιοαισθητήρας ανιχνεύει αλλαγές στην μάζα και στις ιξωδο-ελαστικές ιδιότητες που γίνονται ~50 nm επάνω από την επιφάνεια του (Ballantine 1997). Το χαμηλό πάχος ανίχνευσης τον καθιστά κατάλληλο για την μείωση του bulk effect που προκαλείτε λόγω της μάζας των κυττάρων. Τα πειράματα αποκάλυψαν μια γρήγορη μείωση στη φάση του διαδιδόμενου κύματος αμέσως μετά από την εισαγωγή των κυττάρων στην τροποποιημένη με πεπτιδίο επιφάνεια. Αντίθετα, το πλάτος δεν επηρεάστηκε (γράφημα 16).

Η κινητική των πειραμάτων αρνητικού ελέγχου, με τις επιφάνειες που προκύπτουν από κάθε ξεχωριστό βήμα της χημικής διαδικασίας για την ακινητοποίηση του πεπτιδίου, παρουσίασε απλά παρόμοια μείωση στη φάση (εικόνα). Δυστυχώς, η δυναμική αυτού του βιοαισθητήρα, δεν έδωσε τα επιθυμητά αποτελέσματα λόγω της μη ειδικής αλληλεπίδρασης των κυττάρων με την επιφάνεια της συσκευής ή μπορεί να απαιτείται βελτιστοποίηση της πειραματικής διαδικασίας (αριθμός κυττάρων, ποσοστό ροής, χρόνος επώασης, κ.λπ.).



Γράφημα 16. αλλαγή στο πλάτος και την φάση του διαδιδόμενου κύματος που προκύπτουν από την αλληλεπίδραση των κυττάρων με τις διάφορες επιφάνειες που προκύπτουν από κάθε ξεχωριστό βήμα της χημικής διαδικασίας για την ακινητοποίηση του πεπτιδίου. Η ροή σε όλες τις περιπτώσεις ήταν 10 μl/ml. Ο αριθμός κυττάρων ήταν 600000 κύτταρα/ml. Τα βέλη δείχνουν την εισαγωγή των κυττάρων (1) και το χρόνο εισαγωγής του φέροντος διαλύματος (loading buffer) (2), αντίστοιχα.

7) ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ:

Στην συγκεκριμένη εργασία διενεργήθηκαν πειράματα SPR και Q-sense για να ελεγχθεί αφενός η ακινητοποίηση πεπτιδίων στην επιφάνεια χρυσού των devices που χρησιμοποιήθηκαν και αφετέρου η αλληλεπίδραση των πεπτιδίων αυτών με μόρια MHC στην επιφάνεια καρκινικών κυττάρων.

Η ορθότητα της οργανικής σύνθεσης που ακολουθήθηκε για την ακινητοποίηση ελέγχθηκε με τον SPR βιοαισθητήρα. Τα SPR πειράματα έδειξαν ότι τα κύτταρα προκαλούν μεγάλη αλλαγή στο δείκτη διάθλασης τόσο στα θετικά όσο και στα αρνητικά πειράματα. Αυτό δεν επέτρεψε την εκτίμηση της αλληλεπίδρασης των HLA-A2 μορίων με το πεπτίδιο λόγω του bulk effect που προκαλείτε από την μάζα των κυττάρων.

Τα QCM θετικά και αρνητικά πειράματα, στα οποία η ακινητοποίηση του πεπτιδίου γίνεται μέσω του δι-λειτουργικού αντιδραστήριου GMBS, παρουσίαζαν παρόμοιο κινητικό μοτίβο. Εντούτοις στα αρνητικά παρατηρήθηκε χαμηλότερη αλλαγή στο σήμα (50%). Αυτή η διαφορά θα μπορούσε να συσχετιστεί με την αλληλεπίδραση HLA-A2 μορίων/πεπτιδίων. Επιπλέον, στα αρνητικά πειράματα ελέγχου, δεν υπάρχει καμία περαιτέρω αλλαγή στη συχνότητα και στην ενέργεια απόσβεσης μετά από την εισαγωγή του φέροντος διαλύματος, που δηλώνουν ότι η αλληλεπίδραση των HLA-A2 μορίων με τα πεπτίδια θα μπορούσε να οδηγήσει σε κυτταρική προσκόληση.

Τα QCM πειράματα, στα οποία η ακινητοποίηση του πεπτιδίου γίνεται μέσω του δι-λειτουργικού αντιδραστήριου NHS-PEO₄-Maleimide, κατέστησαν δυνατή την ανίχνευση της αλληλεπίδρασης. Διαφαίνεται, ότι η χρήση του πιο μακρού και σχετικά υδρόφιλου δι-λειτουργικού αντιδραστήριου NHS-PEO₄-Maleimide μείωσε την απόκριση του σήματος και κατέστησε πιο ξεκάθαρη την ανίχνευση της αλληλεπίδρασης. Η ακινητοποίηση των πεπτιδίων σε SAM με μοριακή αναλογία 1/20 δίνει το καλύτερο σύστημα για την μελέτη της αλληλεπίδρασης.

Η συσκευή SAW, θα μπορούσε να είναι κατάλληλη για την ανίχνευση εξαιτίας του γεγονότος ότι μπορεί να "αισθανθεί" αλλαγές που γίνονται σε απόσταση 50nm από την επιφάνεια συσκευών. Κατά συνέπεια η μάζα των κυττάρων δεν έχει επιπτώσεις στο σήμα. Δυστυχώς, η δυναμική αυτού του βιοαισθητήρα, δεν έδωσε τα επιθυμητά αποτελέσματα.

8) ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ:

Για να έχουμε πιο σαφή συμπεράσματα πρέπει να διεξαχθούν επιπλέον πειράματα χαρακτηρισμού της επιφάνειας των ακινητοποιημένων πεπτιδίων. Σε αυτήν την κατεύθυνση θα βοηθούσε ο χαρακτηρισμός της επιφάνειας με polarization-infrared spectroscopy (PM-IRRAS), με ατομική μικροσκοπία (AFM) και Q-sense (ίξωδοελαστικότητα, πάχος, αλλαγή δομής, ποσό μάζας που επικάθεται). Επίσης μελέτες υδροφοβικότητας και ελλειψομετρίας μπορούν να δώσουν μια καλή εικόνα για την επιφάνεια.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

1. BIACORE Technology Handbook. (1998).
2. Akimoto, T. Effect of incident angle of light on sensitivity and detection limit for layers of antibody with surface plasmon resonance spectroscopy. *Biosens Bioelectron* **15**, 355-362 (2000).
3. Bachinsky, M.M. et al. Mapping and binding analysis of peptides derived from the tumor-associated antigen survivin for eight HLA alleles. *Cancer Immun* **5**, 6 (2005).
4. Bain, C.D., Evall, J. & Whitesides, G.M. Formation of Monolayers by the Coadsorption of Thiols on Gold: Variation in the Head Group, Tail Group, and Solvent. *J Am Chem Soc* **111**, 7155-7164 (1989).
5. Bain, C.D. & Whitesides, G.M. Modeling Organic-Surfaces with Self-Assembled Monolayers. *Angew Chem Int Ed* **28(4)**, 506-512 (1989).
6. Ballantine, D.S. et al. Acoustic Wave Sensors. (Academic Press, San Diego; 1997).
7. Becka, A.M. & Miller, C.J. Electrochemistry at ω -hydroxy thiol coated electrodes. *J Phys Chem* **96**, 2657-2668 (1992).
8. Biebuyck, H.A., Bain, C.D. & Whitesides, G.M. Comparison of Organic Monolayers on Polycrystalline Gold Spontaneously Assembled from Solutions Containing Dialkyl Disulfides or Alkanethiols. *Langmuir* **10**, 1825-1831 (1994).
9. Bjorkman, P.J. & Parham, P. Structure, function, and diversity of class I major histocompatibility complex molecules. *Annu Rev Biochem* **59**, 253-288 (1990).
10. Bjorkman, P.J. et al. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* **329**, 506-512 (1987).
11. Cady, W.P. *Proc. Inst. Radio Eng* **12** (1924).
12. Cady, W.P. Piezoelectricity, an Introduction to the Theory and Applications of Electromechanical Phenomena in Crystals. (Dover, New York 1964).
13. Cao, z. & Gu, N. Investigation on gold corrosion by in situ quartz crystal microbalance and atomic force microscopy in self-

- assembled processes of alkanethiol monolayers. *Materials Letters* **59**, 3687 – 3693 (2005).
14. Cooper, M.A. Label-free screening of bio-molecular interactions. *Anal Bioanal Chem* **377**, 834-842 (2003).
 15. D’Orazio, P. Biosensors in clinical chemistry. *Clinica Chimica Acta* **334(1-2)**, 41-69 (2003).
 16. Davis, T.M. & Wilson, W.D. Determination of the Refractive Index Increments of Small Molecules for Correction of Surface Plasmon Resonance Data. *Analytical Biochemistry* **284**, 348-353 (2000).
 17. Diao, P., Jiang, D., Gui, P., Tong, R. & Zhong, B. Studies of structural disorder of self assembled thiol monolayers on gold by cyclic voltametry and AC impedance. *J electronal chem* **461**, 61-67 (1999).
 18. Diao, P., Jiang, D., Gui, P., Tong, R. & Zhong, B. Characterization of defects in the formation process of self assembled thiol monolayers by electrochemical impedance spectroscopy. *J electronal chem* **495**, 98-105 (2000).
 19. Diao, P., Jiang, D., Gui, P., Tong, R. & Zhong, B. Fractional coverage of defects in self assembled thiol monolayers on gold. *J electronal chem* **480**, 59-63 (2000).
 20. Dieulesaint, E. & Royer, D. Acoustic Surface Waves, Elastic Waves In Solids, Applications to Signal Processing,. (Wiley, New York; 1980).
 21. Dojindo Molecular Technologies Self-Assembled Alkenethiol Monolayers. (2003).
 22. Dubois, L.H. & Nuzzo, R.G. The Synthesis, Structure, and Properties of Model Organic Surfaces. *Ann Rev Phys Chem* **43**, 437-463 (1992).
 23. Finklea, H.O. Electrochemistry of organized monolayers of related molecules on electrodes. *J electronal chem* **19**, 107-335 (1996).
 24. Gizeli, E., Goddart, N., Lowe, C.R. & Stevenson, A.C. A Love plate biosensor utilising a polymer layer. *Sens Actuators, B* **6**, 131-137 (1992).
 25. Gooding, J.J., Mearns, F., Yang, W. & Liu, J. Self-Assembled

- Monolayers into the 21st Century: Recent Advances and Applications. *Electroanal* **15**, 81-96 (2003).
26. Hall, D. Use of Optical Biosensors for the Study of Mechanistically Concerted Surface Adsorption Processes. *Analytical Biochemistry* **288**, 109-125 (2001).
 27. Holmes-Farley, S.R., Bain, C.D. & Whitesides, G.M. Wetting of Functionalized Polyethylene Film Having Ionizable Organic Acids and Bases at the Polymer-Water Interface: Relations between Functional Group Polarity, Extent of Ionization, and Contact Angle with Water. *Langmuir* **4**, 921-937 (1988).
 28. Holmlin, R.E., Chen, X., Chapman, R., Takayama, S. & Whitesides, G.M. Zwitterionic SAMs that Resist Nonspecific Adsorption of Protein from Aqueous Buffer. *Langmuir* **17**, 2841-2850 (2001).
 29. Hutt, D.A. & Leggett, G.J. Influence of Adsorbate Ordering on Rates of UV Photooxidation of Self-Assembled Monolayers *J Phys Chem.* **100**, 6657-6662 (1996).
 30. Ivarsson, B. & Malmqvist, M. in Biomolecular Sensors. (eds. E. Gizeli & C.R. Lowe) 241-268 (Taylor & Francis Inc., London; 2002).
 31. Keller, C.A. & Kasemo, B. Surface specific kinetics of lipid vesicle adsorption measured with a quartz crystal microbalance. *Biophys J* **75**, 1397-1402 (1998).
 32. Keusgen, M. Biosensors: new approaches in drug discovery. *Naturwissenschaften* **89**, 433-444 (2002).
 33. Khilko, S.N. et al. Direct Detection of Major Histocompatibility Complex Class I Binding to Antigenic Peptides Using Surface Plasmon Resonance. **268**, 15425-15434 (1993).
 34. Kretschmann, E. & Reather, H. Radiative decay of nonradiative surface plasmon excited by light. *Z Naturf* **23A**, 2135-2136 (1968).
 35. Li, J., Thielemann, C., Reuning, U. & Johannsmann, D. Monitoring of integrin-mediated adhesion of human ovarian cancer cells to model protein surfaces by quartz crystal resonators: evaluation in the impedance analysis mode. *Biosens Bioelectron* **20**, 1333-1340 (2005).
 36. Markey, F. What is SPR anyway? *Bia Journal* **1**, 14-17 (1999).

37. Merwe, P.A.v.d. Surface Plasmon Resonance, PDF file from internet (2003).
38. Morgan, D.P. Surface Acoustic Wave Devices for Signal Processing. (Elsevier, New York; 1985).
39. Nagata, K. & Handa, H. Relat-Time Analysis of Biomelecular Interactions. (2000).
40. Nuzzo, R.G. & Allara, D.L. Adsorption of Bifunctional Organic Disulfides on Gold Surfaces. *J. Am. Chem. Soc* **105**, 4481-4483 (1983).
41. Nuzzo, R.G., Fusco, F.A. & Allara, D.L. Spontaneously Organized Molecular Assemblies:Preparation and Properties of Solution Adsorbed Monolayers of Organic Disulfides on Gold Surfaces. *J Am Chem Soc* **109**, 2358-2368 (1987).
42. O'Shannessy, D.J., Brigham-Burke, M. & Peck, K. Immobilization Chemistries Suitable for Use in the BIAcore Surface Plasmon Resonance Detector. *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY* **205**, 132-136
43. O'Shannessy, D.J., Brigham-Burke, M., Soneson, K.K., Hensley, P. & Brooks, I. Determination of rate and equilibrium binding constants for macromolecular interactions using surface plasmon resonance: use of nonlinear least squares analysis methods. *Anal Biochem* **212**, 457-468 (1993).
44. Otto, A. A new method for exciting non-radioactive surface plasma oscillations. *Phys Stat Sol* **26**:, K99-K101 (1968).
45. Otto, A. Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection. *Z Phys* **216**, 398-410 (1968).
46. Porter, M.D., Bright, T.B., Allara, D.L. & Chidsey, C.E.D. Spontaneously Organized Molecular Assemblies.Structural Characterization of n-Alkyl Thiol Monolayers on Gold by Optical Ellipsometry, Infrared Spectroscopy, and Electrochemistry. *J Am Chem Soc* **109**, 3559-3568. (1987).
47. Quinn, J.G. Development and application of surface plasmon resonance-based biosensors for the detection of cell-ligand interactions. *Analytical Biochemistry* **281**, 135-143 (2000).

48. Rongcun, Y. et al. Identification of new HER2/neu-derived peptide epitopes that can elicit specific CTL against autologous and allogeneic carcinomas and melanomas. *J Immunol* **163**, 1037-1044 (1999).
49. Roos, H. Thermodynamic analysis of protein interactions with biosensor technology. *J Mol Recognit.* **11**, 204-210 (1998).
50. Scheller, F., Wollenberger, U., Warsinke, A. & Lisdat, F. Research and Development in Biosensors. *Curr Opin Biotechnol.* **12(1)**, 35-40 (2001).
51. Sette, A. et al. Effect of pH on MHC class II-peptide interactions. *J Immunol* **148**, 844-851 (1992).
52. Stratos, J.V. N-hydroxysulfosuccinimide active esters: Bis (N-hydroxysulfosuccinimide) esters of the two dicarboxylic acids are hydrophilic, membrane impermeant proteine cross-linkers. *Biochemistry* **21**, 3950-3955 (1982).
53. Strong, L. & Whitesides, G.M. Structures of Self-Assembled Monolayer Films of Organosulfur Compounds Adsorbed on Gold Single Crystals: Electron Diffraction Studies. *Langmuir* **4**, 546-558 (1988).
54. Tarlov, M.J., Burgess, D.R.F. & Gillen, G. UV Photopatterning of Alkanethiolate Monolayers Self-Assembled on Gold and Silver. *J Am Chem Soc.* **115**, 5305-5306. (1993).
55. Tidwell, C.D. et al. Endothelial cell growth and protein adsorption on terminally functionalized, self-assembled monolayers of alkanethiolates on gold. *Langmuir* **13** 3404–3413 (1997).
56. Ulman, A. Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers. *Chem Rev* **96**, 1533-1554 (1996).
57. Walton, P.W., E., B.M. & R., O.F.M. Piezoelectric- based biosensors. *Biochemical Society Transactions* **19**, 44-47 (1991).
58. Wegener, J., Janshoff, A. & Galla, H.J. Cell adhesion monitoring using a quartz crystal microbalance: comparative analysis of different mammalian cell lines. *Eur Biophys J* **28**, 26-37 (1998).
59. Wink, T., van Zuilen, S.J., A., B. & van Bennekom, W.P. Self-assembled Monolayers for Biosensors. *Analyst* **122**, 43R–50R

(1997).

60. Wink, T., van Zuilen, S.J., Bult, A. & van Bennekom, W.P. Self-assembled monolayers for biosensors. *Analyst* **122**, 43R-50R (1997).

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ:

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερως, την επιβλέπων καθηγήτρια μου Ηλέκτρα Γκιζελή, που μου έδωσε την ευκαιρία να γίνω μέλος του εργαστηρίου της, όπως επίσης και για την καθοδήγηση της σε επιστημονικά θέματα. Αποτελεί τιμή μου που συνεργάστηκα, με μια τόσο διακεκριμένη επιστήμονα.

Είμαι ευγνώμων στον Μιχάλη Σαϊτάκη , διδακτορικό ερευνητή, με τον οποίο συνεργάστηκα. Οι γνώσεις που αποκόμισα δίπλα του, όλο αυτό το διάστημα τον καθιστούν σημαντικό πρόσωπο στη ζωή μου. Με στήριξε και με βοήθησε με κάθε τρόπο.

Τέλος θα ήταν παράληψη να μην ευχαριστήσω την Kathryn για τις επικοινωνιακές συζητήσεις που κάναμε για διάφορα θέματα πάνω στην συγκεκριμένη εργασία. Τον Αλέξανδρο, τον Αχιλλέα, τον Γιώργο, τον Κώστα, την Μαρία και τον Florian, που με βοήθησαν να εγκλιματιστώ γρήγορα.