

## SOUČASNÉ TRENDY V ELEKTROCHEMII NUKLEOVÝCH KYSELIN

**MARTIN BARTOŠÍK\***

*Regionální centrum aplikované molekulární onkologie (RECAMO), Masarykův onkologický ústav, Žlutý kopec 7, 656 53 Brno  
martin.bartosik@mou.cz*

Došlo 4.2.14, přijato 5.3.14.

**Klíčová slova:** elektrochemie, elektrody, hybridizace nukleových kyselin, DNA senzory, mikroRNA, poškození DNA

### Obsah

1. Úvod
2. Nové trendy v DNA hybridizačních senzorech
3. Aplikace v biomedicinském výzkumu
4. Poškození DNA a její interakce s nízkomolekulárními látkami
5. Závěr

### 1. Úvod

Personalizovaná medicína 21. století, ve které je léčba nemocí „šitá“ na míru pacientovi, vyžaduje vývoj rychlých a levných diagnostických přístupů a jednodušší, kompaktní instrumentaci. Tyto předpoklady splňují metody založené na elektrochemické detekci, u kterých se zkoumá přenos elektronů mezi sledovanou látkou v roztoku a elektrodou (čili její oxidace nebo redukce). Elektrochemicky se dají studovat nejenom jednodušší látky s nízkou molekulovou hmotností (kovy a jejich komplexy, různé organické molekuly, atd.), ale i mnohem složitější biomakromolekuly včetně bílkovin nebo nukleových kyselin (NK). Ve skutečnosti elektrochemie biomakromolekul není zdaleka novým přístupem, právě naopak. V posledních letech však právě díky rostoucím požadavkům současné medicíny zažívá výrazný rozvoj s exponenciálním nárůstem počtu publikací.

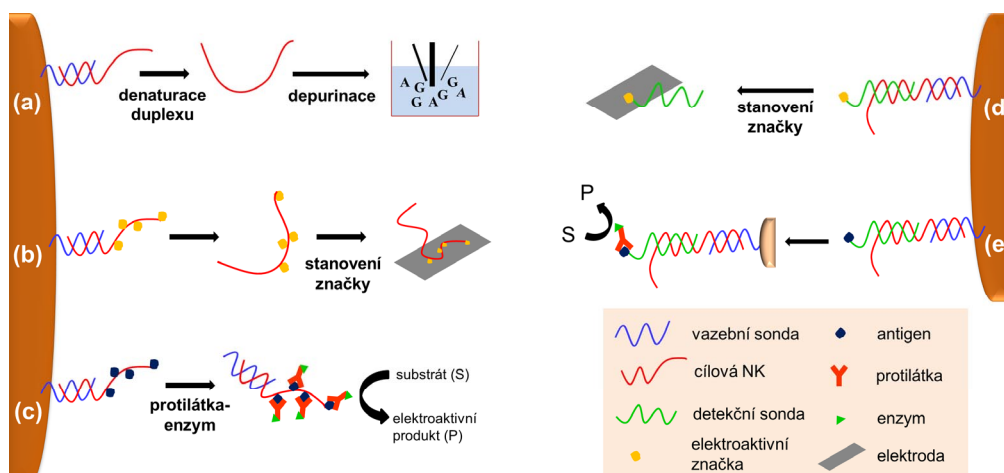
Začátky elektrochemie biomakromolekul sahají až do 30. let 20. století, k čemuž výraznou měrou přispěl i významný český vědec Jaroslav Heyrovský, laureát Nobelovy ceny z r. 1959, v jehož laboratoři byly provedeny první polarografické experimenty s lidskými tělními tekutinami obsahujícími albumin<sup>1</sup>. Na konci padesátých let 20. století

ukázal Emil Paleček, že nejenom bílkoviny, ale i NK jsou polarograficky aktivní díky redukci cytosinu a adeninu, a zpětné oxidaci produktu redukce guaninu<sup>2</sup>. Jeho práce publikovaná v prestižním *Nature de facto* položila základ elektrochemie NK, i když to trvalo ještě dalších 30 let než se díky pokroku v genomice, zejména v sekvencování lidského genomu, začalo o elektrochemii NK zajímat větší množství laboratoří po celém světě. Najednou totiž vědci znali sekvenci mnoha genů zodpovědných za vznik dědičných chorob anebo rakoviny (tzv. onkogenů anebo nádorových supresorových genů), a nebylo proto problémem připravit sondy DNA s komplementární sekvencí, které by tyto cílové geny navázaly (v procesu hybridizace) a tuto hybridizaci detegovali pomocí různých technik včetně elektrochemických. To vedlo k vývoji tzv. DNA hybridizačních senzorů, či přesněji DNA hybridizačních testů (anglicky assays), které jsou podrobněji popsány v kapitole 2. Pokrok v této oblasti postupně vedl ke zvyšování citlivosti a specifity jednotlivých testů, a k jejich aplikaci do biomedicíny, zejména do onkologického výzkumu (viz kapitola 3). Kromě hybridizačních senzorů, kterým se věnuje většina laboratoří zaměřených na elektrochemii NK, je možné elektrochemii využít i pro analýzu poškození DNA a pro studium interakcí DNA s nízkomolekulárními látkami, např. protinádorovými léčivy (viz kapitola 4). Více informací o historii NK může čtenář najít v tomto čísle *Chemických listů*<sup>63</sup>, a též v nedávném přehledu, který vyšel v *Chemical Reviews*<sup>3</sup>, kde jsou kromě historie NK popsány i současný výzkum a aplikace.

### 2. Nové trendy v DNA hybridizačních senzorech

Pro potřeby tohoto článku budeme za DNA hybridizační senzory považovat různé přístupy při detekci konkrétních nukleotidových sekvencí, a to nejenom DNA, ale i RNA. Navíc není vyloženě nutné, aby byl pro hybridizaci i elektrochemickou detekci použitý stejný povrch (tzv. jednopovrchová technika), ale někdy je výhodné tyto dva procesy oddělit (hybridizace probíhá na jiném povrchu než detekce) a použít tzv. dvoupovrchovou techniku. To je i případ oblíbených magnetických kuliček, jejichž povrch se dá vhodně modifikovat a tak dosáhnout efektivnější hybridizaci cílové NK, která je pak z kuliček uvolněna a elektrochemicky stanovena na elektrodě (tedy na druhém povrchu)<sup>4</sup>. Výhodou je, že se tímto způsobem dá zvlášť

\* Martin Bartošík je laureátem ceny firmy Metrohm za nejlepší publikaci mladého elektroanalytického chemika v roce 2012.



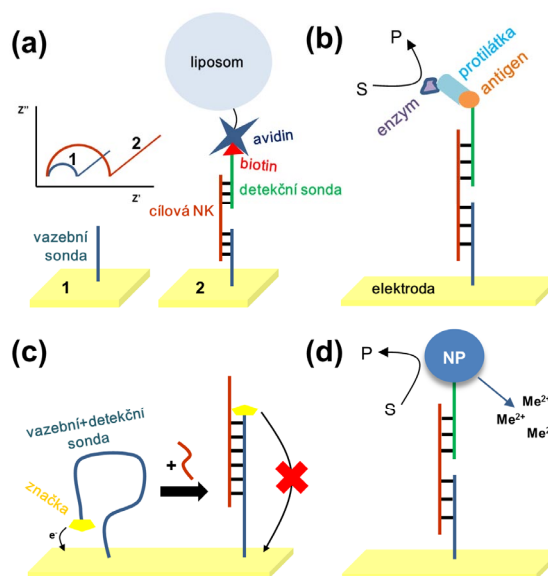
Obr. 1. Různé možnosti použití magnetických kuliček v elektrochemii NK

optimalizovat povrch pro hybridizaci (velikost, vhodná modifikace) a zvláště povrch pro detekci (typ elektrody, elektrodový děj). Poprvé byly magnetické kuličky pro DNA hybridizaci s elektrochemickou detekcí použité v roce 2001 v americké laboratoři J. Wanga<sup>5</sup> a v české laboratoři E. Palečka<sup>6</sup>. Během následujících let J. Wang zdokonalil magnetické kuličky tak, že pomocí nanotechnologií dosáhl na tu dobu nejvyšší citlivosti detekce DNA v elektrochemických senzorech<sup>7</sup>. Existuje několik strategií jejich použití, ale v zásadě všechny vycházejí z modifikace povrchu kuliček DNA vazební sondou a následné hybridizace s cílovou NK (obr. 1). Liší se pak způsob detekce, využívající např. (a) denaturaci pro uvolnění cílové NK a její následnou depurinaci pro voltametrické stanovení adeninu a guaninu (bez nutnosti značení)<sup>8</sup>, (b) modifikaci cílové NK (značkou či antigenem)<sup>9</sup>, anebo (c) značenou detekční sondou<sup>10</sup>.

Jak v případě jednopovrchové, tak i dvoupovrchové techniky rozlišujeme dva hlavní přístupy – bez nutnosti značení a s použitím elektroaktivního značení. První přístup je jednodušší a levnější, obecně je však méně citlivý, protože je založen buď na sledování redoxních vlastností samotných nukleových kyselin (tj. oxidace adeninu a guaninu na uhlíkových elektrodách a redukce adeninu s cytosinem společně se zpětnou oxidací redukováného produktu guaninu na rtuťových elektrodách), anebo na monitorování změn v odporu přenosu elektronů přes elektrodovou vrstvu před a po hybridizaci, a to pomocí elektrochemické impedanční spektroskopie (EIS). Samotná hybridizace však výsledný EIS signál příliš výrazně nemění, a tudíž se využívá určitá forma amplifikace vytvořením dodatečných vrstev složených např. z nanočástic, kvantových teček, či liposomů (obr. 2a), které mají výraznější efekt na výslednou impedanci. V pravém smyslu slova by však tento přístup již neměl patřit mezi metody bez nutnosti značení.

Právě pro zvýšení citlivosti elektrochemické detekce byly zavedeny různé elektroaktivní molekuly; jedná se

zejména o redoxní indikátory vázající se na DNA nekovaletně (interkalátory, molekuly vázající se do žlábků nebo na záporně nabitou fosfátovou kostru) a elektroaktivní značky kovaletně modifikující DNA (komplexy na bázi osmia, feroceny, antrachinony, atd.). Kovaletně se vázající značky vykazují vyšší citlivost i stabilitu, jsou proto



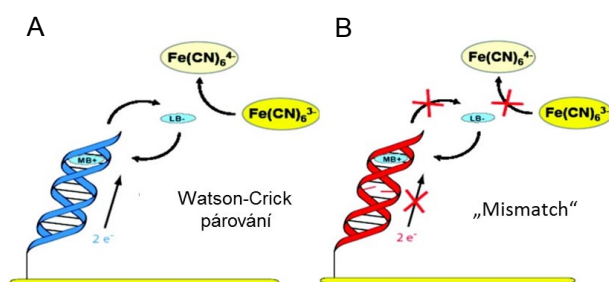
Obr. 2. DNA hybridizační senzory. (a) Elektrochemická impedanční spektroskopie monitoruje nárůst odporu přenosu elektronů přes nově vzniknutou vrstvu obsahující cílovou NK. (b) ELISA formát, ve kterém 2 sondy (vazební a značená) a cílová NK vytvoří sendvič, který je detegován enzymaticky. (c) Molekulární maják integrující vazební sondu a značenou sondu do jedné. Po přidání cílové NK nastává změna konformace sondy a tím i signálu. (d) Aplikace nanočástice jako elektroaktivní značky nebo katalyzátoru chemické reakce

v poslední době více preferované. Nejčastějším přístupem využívající značení při detekci konkrétních sekvencí NK je v podstatě analogie ELISA, kdy hledaná NK nejdřív hybridizuje s vazební sondou upevněnou na vhodném povrchu a pak jiná část cílové NK hybridizuje s další DNA sondou (tzv. detekční sondou), obvykle kovalentně značenou antigenem, který však sám o sobě není elektroaktivní (obr. 2b). Vzniká jakýsi „sendvič“, který se stanoví až přidáním primární protilátky (vůči danému antigenu) a sekundární protilátky konjugované s enzymem (ta se váže na primární protilátku). Elektrochemicky se pak sleduje enzymatická reakce značící přítomnost cílové NK. Protože se při vytvoření jednoho duplexu (a navázání jednoho enzymu) generuje enzymatickou reakcí velké množství elektroaktivního produktu, patří tato strategie mezi vůbec nejcitlivější, umožňující stanovení dokonce zeptomolů DNA<sup>11</sup>.

Dalším přístupem je tzv. „molekulární maják“ (angl. molecular beacon)<sup>12,13</sup>. Jedná se o značenou DNA sondu kombinující vazební i detekční sondu v jednu molekulu, navázanou na povrch elektrody (obr. 2c). Před hybridizací je sonda velmi flexibilní; díky tomu se na konci připojená elektroaktivní značka nachází relativně blízko povrchu elektrody a její signál je tak vysoký. Po hybridizaci s cílovou NK sonda mění konformaci, je více rigidní, a značka se dostává dál od elektrody, čímž signál klesá. Později přibyla citlivější strategie, u které po hybridizaci nedochází k poklesu signálu, ale k jeho nárůstu<sup>14</sup>. Molekulární maják připomíná senzory na bázi aptamerů – krátkých syntetických oligonukleotidů, které se s vysokou afinitou vážou na proteiny<sup>15</sup> či nízkomolekulární látky<sup>16</sup>, a tak umožňují jejich stanovení.

V poslední době se v elektrochemii NK čím dál častěji používají nanomateriály (obr. 2d), a to zejména k výraznému zvýšení citlivosti detekce<sup>17–19</sup>. Poskytují však i další výhody, kupříkladu miniaturizovatelnost senzorů a tak i nízkou spotřebu vzorků, mechanickou a tepelnou stabilitu, atd. Oblíbenou strategií je třeba aplikace anorganických nanočástic (kovových, polovodičových, atd.), které slouží buď jako elektroaktivní značky, nebo jako katalyzátory chemických reakcí. Pro zvětšení povrchu elektrod (a tudíž pro větší množství přenesených elektronů) je možné modifikovat povrch uhlíkovými nanotrůbkami anebo grafénem<sup>20,21</sup>. J. Wang a spol. dokázali pomocí anorganických nanokrystalů na bázi síry (ZnS, CdS a PbS) paralelně detegovat tři různé sekvence cílové DNA<sup>22</sup>. Použili přitom magnetické kuličky a tři DNA sondy značené nanokrystaly, které po úspěšné hybridizaci s komplementárními cílovými DNA sekvencemi rozpustili na kationty kovů a voltametriky detegovali.

Již v roce 1962 se ukázalo, že páry bází v dvoušroubovicové DNA mohou sloužit jako efektivní dráha pro transport elektronů mezi elektronovým donorem a akceptorem<sup>23</sup>, i když v té době se tomuto zjištění mnoho pozornosti nevěnovalo. To se změnilo v roce 1993, kdy skupina J. Bartonové použila DNA duplex jako vhodné médium pro přenos elektronů mezi dvěma metalointerkalátory, a to až na vzdálenost 40 angströmů<sup>24</sup>. První pokusy



Obr. 3. Elektronový transport přes DNA duplex imobilizovaný na zlaté elektrodě. V případě dvou plně komplementárních řetězců s Watson-Crick párováním (A) dochází k přenosu elektronů od elektrody k interkalátoru (methylenová modř (MB)), který je redukován na leukometylenovou modř (LB). LB je oxidována zpět na MB v elektrokatalytickém cyklu zahrnující redukcí  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  na  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ . V případě nesprávného párování (tzv. „mismatch“) je přenos narušen a signál klesá (B). Převzato z cit.<sup>26</sup>. Copyright 2008 American Chemical Society

byly ještě dělány v roztoku neelektrochemicky, ale brzy následovaly práce využívající DNA duplex jako mediátor mezi interkalátorem a zlatou elektrodou<sup>25,26</sup>. Skupina J. Bartonové aplikovala tento přístup mj. pro detekci DNA hybridizace<sup>27</sup> či bodových mutací a poškození DNA<sup>25,28–30</sup>. Elektronový přenos byl neefektivnější u perfektního DNA duplexu s Watson-Crickovským párováním, a tato účinnost klesala již za přítomnosti jediné špatně spárované nebo chybějící báze (obr. 3). Rovněž byla studována interakce DNA s proteinem – obdobně jako u DNA mutací, i vazba proteinu vedla k poklesu přenosu elektronů<sup>31–33</sup>.

### 3. Aplikace v biomedicínském výzkumu

Výše zmíněné strategie a postupy byly již úspěšně vyzkoušeny na různých biomedicínsky důležitých systémech. Jedním z nich je detekce bodových mutací (tzv. jednonukleotidového polymorfismu, z angl. single nucleotide polymorphism, SNP) pro rychlý screening genetických chorob. I nepatrná změna sekvence v důležitém genu totiž může způsobit závažnou genetickou nemoc, např. srpkovou anemii, cystickou fibrózu nebo hemochromatózu, popřípadě větší náchylnost ke vzniku rakoviny. V r. 2005 vyšla práce, která zkoumala bodové mutace genu p53 (důležitého tumor supresorového proteinu) sledováním elektronového transportu přes dvoušroubovicovou DNA<sup>34</sup>, přičemž bodové mutace způsobily pokles signálu.

Kromě SNP je možné detegovat i repetitivní sekvence (tzv. tripletové expanze typické např. pro Huntingtonovu chorobu, myotonickou dystrofii nebo Friedreichovu ataxii). Fojta a spol. separovali pomocí magnetických kuliček modifikovaných oligonukleotidem T<sub>25</sub> DNA obsahující tři nukleotidové repetitivní sekvence, a to díky tomu, že tato DNA obsahuje i přirozeně se vyskytující adeninový „ocásek“ hybridizující s T<sub>25</sub> (cit.<sup>35</sup>). Po separaci cílové DNA aplikovali biotinem značenou DNA sondu komple-

mentární k repetičím vázající se na streptavidin konjugovaný s enzymem, jehož produkt potom sledovali elektrochemicky. Výška signálu pak reprezentovala počet repetičí.

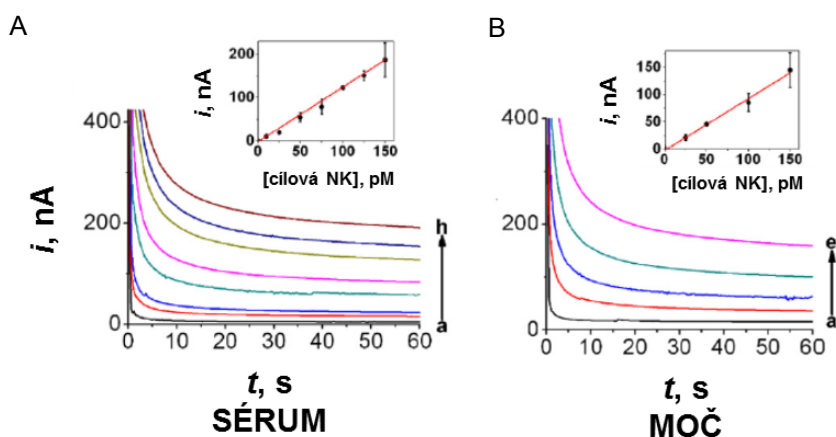
Zajímavou možností je detekce bakteriální nebo virové NK za účelem stanovení jejich přítomnosti v jídle, vodě, nebo dokonce přímo v tělních tekutinách (krev, moč, sliny). Byla publikována relativně levná metoda simultánní detekce čtyř patogenů v jídle, konkrétně bakterií *Salmonella*, *Lysteria*, *Staphylococcus* a *E. coli*, opět s využitím biotinylovaných DNA sond a streptavidinu konjugovaným s enzymem, avšak za použití jednorázových tištěných elektrodoých čipů<sup>36</sup>.

Většina těchto přístupů kvůli zvýšení citlivosti stanovení vyžaduje PCR amplifikaci před samotnou hybridizací a detekcí. Ve spolupráci s americkou laboratoří J. Wanga se nám nedávno podařilo obejít PCR amplifikaci při detekci *E. coli* tím, že jsme se namísto bakteriální DNA zaměřili na detekci ribozomální RNA, která se v bakteriích nachází ve více kopiích<sup>37</sup>. Modifikací zlatého povrchu elektrodoého čipu tzv. ternární vrstvou (složenou z DNA vazební sondy a dvou různých alkanthiolů) jsme výrazně potlačili šum z nespecifických adsorpcí, což nám dovolilo použít i nezředěné a neupravené vzorky lidského séra a moči (obr. 4). Aplikace této vrstvy vedla až k osmdesátinásobnému zlepšení poměru signál/šum v nezředěném lidském séru, ve srovnání s obvyklou binární vrstvou složenou z vazební sondy a jednoho alkanthiolu.

I mediátorová RNA (mRNA), která by mohla sloužit jako nádorový biomarker, byla použita pro elektrochemickou analýzu. Xie a spol. amperometricky detegovali transkripty mRNA u genů důležitých v rakovině prsu (BRCA1, p53, HSP90 a histon H4) izolovaných přímo z lidských tkání, a to bez nutnosti PCR (cit.<sup>38</sup>). Tento přístup zahrnoval značení veškeré RNA v buňkách (tzv. totalRNA) cisplatinou konjugovanou s biotinem, hybridizaci s vazební sondou a inkubaci s komplexem avidin-glukosooxidasa (A-GOx). Jednalo se o vysoce citlivý pří-

stup (kde na jednu molekulu mRNA připadalo více A-GOx komplexů) umožňující analýzu 5 ng mRNA. Wei a spol. naopak použili pro detekci mRNA molekulární maják<sup>39</sup>. Na stanovení mRNA transkriptu pro gen kódující interleukin-8 (nádorový biomarker např. u rakoviny ústní dutiny) využili během hybridizace pravidelné střídání hodnot potenciálu, a to z +200 mV po dobu 1 s na –300 mV po dobu 9 s a zpět, které zefektivňovalo hybridizaci. Velkou výhodou byla detekce mRNA přímo ve slinách, ideální pro neinvazivní bezbolestnou diagnostiku.

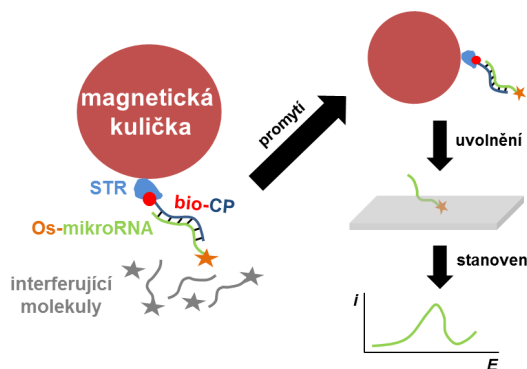
Hlavním trendem je v současnosti pravděpodobně detekce krátkých molekul RNA, tzv. mikroRNA. Jedná se o nekódující jednořetězové RNA o délce 18–25 nukleotidů využívající dva rozdílné mechanismy posttranskripční regulace genové exprese, vedoucí buď k degradaci cílové mRNA, nebo k represi její translace a následně k poklesu hladiny příslušného proteinu. Skutečnost, že mikroRNA mohou vykazovat funkci jak nádorového supresoru, tak i onkogenu, naznačuje jejich širokou využitelnost v onkologické praxi, a to nejen jako diagnostických biomarkerů, ale i jako potenciálních terapeutických cílů<sup>40</sup>. V současné době jsou mikroRNA stanovovány zejména pomocí metod založených na amplifikaci (např. reversní transkripci v kombinaci s PCR v reálném čase) a na hybridizaci (metody založené na čipových technologiích, tzv. „microarrays“). S rozvojem sekvenačních technologií se začíná prosazovat i tzv. hloubkové sekvencování (deep sequencing). Tyto robustní metody však nelze využívat univerzálně, mají řadu omezení, zejména jsou ještě stále časově a finančně náročné a vyžadují kvalifikovanou obsluhu. Není proto divu, že i elektrochemické metody našly uplatnění ve výzkumu mikroRNA, zejména ve vývoji senzorů pro rychlou detekci konkrétních sekvencí, které jsou důležité právě z onkologického hlediska<sup>41–45</sup>. I když první práce naznačovaly spíše nižší citlivost metody a nebyl u nich řešen ani problém specifity, postupně se začaly objevovat sofistikovanější postupy, ve kterých se čím dál



Obr. 4. Chronoamperometrická odezva pro různé koncentrace cílové NK během hybridizace (A) v neředěném séru a (B) v neředěné moči; (a) 0 pM, (b) 10 pM, (c) 25 pM, (d) 50 pM, (e) 75 pM, (f) 100 pM, (g) 125 pM a (h) 150 pM. Vložený graf: kalibrační křivka s chybovými úsečkami z pěti nezávislých měření. Převzato z cit.<sup>37</sup>. Copyright 2011 Elsevier

častěji uplatňují i nanotechnologie. Nejnovější přístupy jsou již schopné detekce piko- či femtomolárních koncentrací mikroRNA, i když obvykle za cenu větší složitosti celé metody. I nadále je tak velké úsilí věnováno nejenom zvýšení specifity, ale i zjednodušení a zrychlení těchto analýz. Nedávno jsme vyvinuli poměrně jednoduchou a časově i finančně nenáročnou metodu detekce konkrétních mikroRNA sekvencí<sup>46–48</sup>. Spočívá v naznačení mikroRNA elektroaktivní značkou na bázi osmia, která se specificky váže na 3'-konec RNA díky přítomnosti dvou hydroxylových skupin na ribose, a v následné hybridizaci s vazební sondou (komplementární k hledané mikroRNA) připevněnou k magnetickým kuličkám (obr. 5). Po hybridizaci a odstranění nespecificky navázaných molekul je hledaná mikroRNA stanovena změřením signálu elektroaktivní značky.

Z onkologického hlediska je důležitá i další oblast, ve které se uplatňuje elektrochemie NK, a to studium DNA methylace – epigenetické modifikace hrající roli v regulaci genové exprese (methylován je cytosin na 5-uhlíku za vzniku methylcytosinu, mC). V nádorových buňkách byly totiž nalezeny pozměněné methylační vzorce DNA, proto methylace DNA představuje další slibný biomarker nádorových onemocnění a jako taková je intenzivně studována. Bylo publikováno již několik prací na elektrochemické rozlišení methylované a nemethylované DNA, obvykle využívající reakci DNA s hydrogensířičitanem sodným, která vede k deaminaci cytosinu na uracil, zatímco mC zůstává nezměněn. Po vhodné volbě primerů je pak provedena PCR amplifikace buď methylované nebo nemethylované DNA, přičemž uracil je amplifikován jako tymin a mC jako cytosin, a amplifikovaná DNA je stanovena pomocí vybraných redoxních značek<sup>49,50</sup>. Podobná, ale jednodušší metoda využívající reakci s hydrogensířičitanem sodným bez nutnosti použít PCR amplifikaci naznačila, že by mohla být aplikovatelná pro rozlišení nadměrně methylovaných fragmentů<sup>51</sup>. Metoda spočívala v tom, že

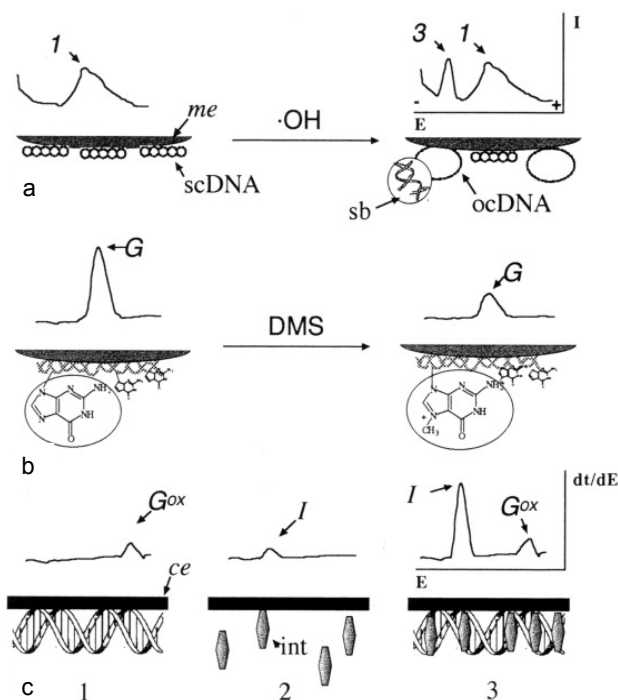


Obr. 5. Detekce mikroRNA pomocí magnetických kuliček a elektroaktivního komplexu na bázi šestimocného osmia, který selektivně modifikuje 3'-konec mikroRNA<sup>48</sup>. Streptavidinové (STR) magnetické kuličky vážou biotinylovanou DNA sondu (bio-CP) hybridizující se značenou mikroRNA (Os-mikroRNA). Po důkladném promytí a odstranění interferujících molekul je mikroRNA uvolněna a voltametricky stanovena pomocí značky

uracil je na rtuťových elektrodách neredukovatelný, zatímco mC ano. Methylovaná DNA proto po reakci s hydrogensířičitanem sodným poskytovala vyšší signál než nemethylovaná DNA, protože redukovatelné mC byly před konverzí chráněny, kdežto cytosiny nikoliv. I další publikované strategie<sup>52–54</sup> dávají tušit, že elektrochemická analýza DNA methylace by jednou mohla být vhodnou alternativou ke stávajícím technikám, zejména až se objeví víc aplikací pro reálné fragmenty, např. promotory genů.

#### 4. Poškození DNA a její interakce s nízkomolekulárními látkami

I když se většina prací věnuje vývoji hybridizačních senzorů pro detekci konkrétních sekvencí NK, nesmíme zapomenout i na jiné oblasti uplatnění elektrochemie, a to zejména studium poškození DNA a interakce DNA s jinými molekulami. Ve skutečnosti jsou obě tyto oblasti do jisté míry propojeny, protože při interakci DNA s jinými látkami často dochází k jejímu poškození, které se může projevit vznikem mutací a tím i závažných onemocnění, včetně rakoviny. Mezi tyto látky patří třeba kyslíkové



Obr. 6. Principy elektrochemické detekce DNA poškození na rtuťových a uhlíkových elektrodách. (a) Rtuťová elektroda (me) modifikovaná superhelikální DNA (scDNA) poskytuje pík 1. Po interakci s činidlem způsobujícím jednořetězový zlom (např. OH radikálem) se objevuje pík 3. (b) Pík guaninu G u DNA adsorbované na rtuťové elektrodě se zmenší po interakci s činidlem vázajícím se na guanin, např. s alkylačním činidlem DMS (dimethylsulfát). (c) Zvýšení redoxního signálu interkalátoru po jeho interakci s DNA (pík I). Převzato z cit.<sup>62</sup>. Copyright 1998 Elsevier

radikály, alkylační činidla, aromatické uhlovodíky, nebo pesticidy. I cytostatika poškozují DNA (např. cisplatina se váže na guaniny a potlačuje replikaci), a proto by elektrochemie mohla být vhodným nástrojem pro analýzu interakcí DNA s potenciálními protinádorovými léčivy. Obvykle se využívá toho, že samotná DNA je elektroaktivní molekula, konkrétně adenin, cytosin a guanin se účastní redoxních dějů na rtuťových elektrodách, a adenin s guaninem jsou oxidovány na uhlíkových elektrodách. Na rtuťové elektrodě navíc dochází u DNA k adsorpčně/desorpčním jevům, které se projevují vznikem tzv. tensametrických píků citlivých ke strukturním změnám v DNA. Elektroaktivita DNA byla proto využita pro vývoj jednoduchých senzorů na detekci jejího poškození<sup>55–57</sup>. Jedním z nich byla i rtuťová elektroda modifikovaná kovalentně uzavřenou plazmidovou DNA, vhodnou pro detekci jednořetězových zlomů působením hydroxylových radikálů<sup>58</sup>. Při interakci s radikály docházelo ke vzniku zlomu, který při vystavení elektrody záporným potenciálům způsobil rozvinutí dvoušroubovicové struktury a dal vzniknout novému signálu příslušícímu právě otevřené struktuře DNA (obr. 6).

Uhlíkové elektrody se naopak použily pro monitorování oxidativního poškození DNA bází (zejména guaninu) při interakci DNA s hydrazinem<sup>59</sup>, chromem<sup>60</sup> nebo aflatoxinem<sup>61</sup>, ale i pro studium interakce DNA s platinovými deriváty používanými jako protinádorové léčiva (zejména cisplatinou). Brabec a spol. použili grafitovou elektrodu, na kterou imobilizovali dvoušroubovicovou DNA a voltametriky sledovali oxidační pík guaninu. Po modifikaci DNA cisplatinou docházelo k výraznému poklesu píku guaninu, a to již po 10 min.

Výše popsané výsledky dávají naději, že by tyto relativně rychlé a levné techniky mohly nalézt uplatnění např. při hledání nových protinádorových léčiv, nebo při detekci genotoxických látek v prostředí.

## 5. Závěr

Jak je patrné z předcházejících řádků, existuje mnoho zajímavých aplikací elektrochemie NK v biomedicíně s velkým potenciálem pro diagnostiku chorob. Je ovšem pravdou, že velká většina z nich patří zatím do základního výzkumu a nejsou příliš využívány v klinické praxi, nebo dokonce mimo nemocnice (jako je např. známý glukometr pro rychlé stanovení hladiny glukosy v krvi diabetiků). Je možné najít několik komerčně dostupných přístrojů s elektrochemickou detekcí, např. eSensor<sup>®</sup> od GenMark Diagnostics<sup>™</sup> (USA), nebo ElectraSense Microarray Reader od CombiMatrix (USA), nabízející elektrodové čipy integrované s měřicím zařízením, avšak ani ty zatím nepatří mezi běžné vybavení laboratoří zabývajících se výzkumem NK. Před elektrochemií NK stojí několik výzev. Jednou z nich je analýza reálných vzorků od pacientů, které jsou mnohem komplexnější než obvykle používané modelové systémy v jednotlivých studiích, a jednoznačně si zasluhují velkou pozornost. S tím souvisí i problém specifity, který může být v modelových systémech vyřešen, ale v tak složitých prostředích, jako jsou lidské tělní tekuti-

ny, může hrát zásadní roli. Navíc je potřebné dostatečně minimalizovat nespecifické adsorpce nežádoucích molekul, aby nedocházelo k falešně pozitivním výsledkům. Povrchy elektrod jsou někdy hůř regenerovatelné a výsledky ne vždy reprodukovatelné. Stabilita senzorů a jejich životnost je dalším často opomíjeným kritériem. Navzdory těmto výzvám byl v relativně krátké době udělán značný pokrok, a díky úsilí čím dál většího množství laboratoří se dají očekávat další zajímavé objevy a aplikace v rámci tohoto slibného oboru.

*Tato práce byla podpořena projektem GA ČR 14-24931P a Evropským fondem pro regionální rozvoj a státním rozpočtem České republiky (OP VaVPI – RECAMO, CZ.1.05/2.1.00/03.0101).*

## LITERATURA

- Heyrovsky J., Babicka J.: Collect. Czech. Chem. Commun. 2, 370 (1930).
- Palecek E.: Nature 188, 656 (1960).
- Palecek E., Bartosik M.: Chem. Rev. 112, 3427 (2012).
- Palecek E., Fojta M.: Talanta 74, 276 (2007).
- Wang J., Xu D. K., Polsky R.: J. Am. Chem. Soc. 124, 4208 (2002).
- Palecek E., Fojta M., Jelen F.: Bioelectrochemistry 56, 85 (2002).
- Wang J., Xu D. K., Erdem A., Polsky R., Salazar M. A.: Talanta 56, 931 (2002).
- Jelen F., Yosypchuk B., Kourilova A., Novotny L., Palecek E.: Anal. Chem. 74, 4788 (2002).
- Palecek E., Kizek R., Havran L., Billova S., Fojta M.: Anal. Chim. Acta 469, 73 (2002).
- Loaiza O. A., Jubete E., Ochoteco E., Cabanero G., Grande H., Rodriguez J.: Biosens. Bioelectron. 26, 2194 (2010).
- Wu J., Campuzano S., Halford C., Haake D. A., Wang J.: Anal. Chem. 82, 8830 (2010).
- Li D., Song S. P., Fan C. H.: Acc. Chem. Res. 43, 631 (2010).
- Lubin A. A., Plaxco K. W.: Acc. Chem. Res. 43, 496 (2010).
- Xiao Y., Lubin A. A., Baker B. R., Plaxco K. W., Heeger A. J.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103, 16677 (2006).
- Lai R. Y., Plaxco K. W., Heeger A. J.: Anal. Chem. 79, 229 (2007).
- Swensen J. S., Xiao Y., Ferguson B. S., Lubin A. A., Lai R. Y., Heeger A. J., Plaxco K. W., Soh H. T.: J. Am. Chem. Soc. 131, 4262 (2009).
- Choi Y. E., Kwak J. W., Park J. W.: Sensors 10, 428 (2010).
- Pingarron J. M., Yanez-Sedeno P., Gonzalez-Cortes A.: Electrochim. Acta 53, 5848 (2008).
- Wang J.: ChemPhysChem 10, 1748 (2009).
- Wang J., Lin Y. H.: TrAC, Trends Anal. Chem. 27, 619 (2008).
- Gan T., Hu S. S.: Microchim. Acta 175, 1 (2011).

22. Wang J., Liu G. D., Merkoci A.: *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 3214 (2003).
23. Eley D. D., Spivey D. I.: *Trans. Faraday Soc.* **58**, 411 (1962).
24. Murphy C. J., Arkin M. R., Jenkins Y., Ghatlia N. D., Bossmann S. H., Turro N. J., Barton J. K.: *Science* **262**, 1025 (1993).
25. Drummond T. G., Hill M. G., Barton J. K.: *Nat. Biotechnol.* **21**, 1192 (2003).
26. Gorodetsky A. A., Buzzeo M. C., Barton J. K.: *Bioconjugate Chem.* **19**, 2285 (2008).
27. Slinker J. D., Muren N. B., Gorodetsky A. A., Barton J. K.: *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 2769 (2010).
28. Boal A. K., Barton J. K.: *Bioconjugate Chem.* **16**, 312 (2005).
29. Boon E. M., Ceres D. M., Drummond T. G., Hill M. G., Barton J. K.: *Nat. Biotechnol.* **18**, 1096 (2000).
30. Kelley S. O., Boon E. M., Barton J. K., Jackson N. M., Hill M. G.: *Nucleic Acids Res.* **27**, 4830 (1999).
31. Boon E. M., Salas J. E., Barton J. K.: *Nat. Biotechnol.* **20**, 282 (2002).
32. Gorodetsky A. A., Dietrich L. E. P., Lee P. E., Demple B., Newman D. K., Barton J. K.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 3684 (2008).
33. Gorodetsky A. A., Ebrahim A., Barton J. K.: *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 2924 (2008).
34. Inouye M., Ikeda R., Takase M., Tsuru T., Chiba J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 11606 (2005).
35. Fojta M., Havran L., Vojtiskova M., Paleček E.: *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 6532 (2004).
36. Farabullini F., Lucarelli F., Palchetti I., Marrazza G., Mascini M.: *Biosens. Bioelectron.* **22**, 1544 (2007).
37. Campuzano S., Kuralay F., Lobo-Castanon M. J., Bartosik M., Vyavahare K., Paleček E., Haake D. A., Wang J.: *Biosens. Bioelectron.* **26**, 3577 (2011).
38. Xie H., Yu Y. H., Xie F., Lao Y. Z., Gao Z. Q.: *Anal. Chem.* **76**, 4023 (2004).
39. Wei F., Wang J. H., Liao W., Zimmermann B. G., Wong D. T., Ho C. M.: *Nucleic Acids Res.* **36**, e65 (2008).
40. Iorio M. V., Croce C. M.: *Carcinogenesis* **33**, 1126 (2012).
41. Wang Z. W., Zhang J., Guo Y., Wu X. Y., Yang W. J., Xu L. J., Chen J. H., Fu F. F.: *Biosens. Bioelectron.* **45**, 108 (2013).
42. Tran H. V., Piro B., Reisberg S., Tran L. D., Duc H. T., Pham M. C.: *Biosens. Bioelectron.* **49**, 164 (2013).
43. Ren Y. Q., Deng H. M., Shen W., Gao Z. Q.: *Anal. Chem.* **85**, 4784 (2013).
44. Bettazzi F., Hamid-Asl E., Esposito C. L., Quintavalle C., Formisano N., Laschi S., Catuogno S., Iaboni M., Marrazza G., Mascini M., Cerchia L., De Franciscis V., Condorelli G., Palchetti I.: *Anal. Bioanal. Chem.* **405**, 1025 (2013).
45. Yin H. S., Zhou Y. L., Zhang H. X., Meng X. M., Ai S. Y.: *Biosens. Bioelectron.* **33**, 247 (2012).
46. Bartosik M., Trefulka M., Hrstka R., Vojtesek B., Paleček E.: *Electrochem. Commun.* **33**, 55 (2013).
47. Trefulka M., Bartosik M., Paleček E.: *Electrochem. Commun.* **12**, 1760 (2010).
48. Bartosik M., Hrstka R., Paleček E., Vojtesek B.: *Anal. Chim. Acta* **813**, 35 (2014).
49. Sato S., Tsueda M., Takenaka S.: *J. Organomet. Chem.* **695**, 1858 (2010).
50. Hou P., Ji M. J., Ge C. W., Shen J. Y., Li S., He N. Y., Lu Z. H.: *Nucleic Acids Res.* **31**, e92 (2003).
51. Bartosik M., Fojta M., Paleček E.: *Electrochim. Acta* **78**, 75 (2012).
52. Wang P., Mai Z. B., Dai Z., Zou X. Y.: *Chem. Commun.* **46**, 7781 (2010).
53. Dai Z., Cai T., Zhu W. Y., Gao X. Y., Zou X. Y.: *Chem. Commun.* **49**, 1939 (2013).
54. Saheb A., Patterson S., Josowicz M.: *Analyst* **139**, 786 (2014).
55. Fojta M.: *Electroanalysis* **14**, 1449 (2002).
56. Ovadekova R., Labuda J.: *Curr. Top. Electrochem.* **11**, 21 (2006).
57. Diculescu V. C., Paquim A. M. C., Brett A. M. O.: *Sensors* **5**, 377 (2005).
58. Fojta M., Kubiarova T., Paleček E.: *Biosens. Bioelectron.* **15**, 107 (2000).
59. Wang J., Chicharro M., Rivas G., Cai X. H., Dontha N., Farias P. A. M., Shiraishi H.: *Anal. Chem.* **68**, 2251 (1996).
60. Oliveira S. C. B., Oliveira-Brett A. M.: *Anal. Bioanal. Chem.* **398**, 1633 (2010).
61. Mascini M.: *Pure Appl. Chem.* **73**, 23 (2001).
62. Paleček E., Fojta M., Tomschik M., Wang J.: *Biosens. Bioelectron.* **13**, 621 (1998).
63. Paleček E., Ostatná V., Pečan Z.: *Chem. Listy* **108**, 490 (2014).

**M. Bartošik** (*RECAMO, Masaryk Memorial Cancer Institute, Brno*): **Current Trends in Nucleic Acid Electrochemistry**

Electrochemistry could be a valuable tool in nucleic acids research by offering relatively inexpensive instrumentation, short assay times and high sensitivity. Interesting applications can be found in the literature, including detection of oncogenes or tumor suppressor genes, analysis of point mutations in DNA, or determination of viruses and bacteria. Moreover, new strategies are being developed for detection of microRNAs, or for analysis of DNA methylation, both important in carcinogenesis. These novel approaches usually involve the use of various electroactive labels, nanomaterials, enzymes or magnetic particles, rendering them more sensitive, selective and efficient. In addition, electrochemistry was applied also in studies of DNA damage and interactions with other molecules. Numerous chemicals damage DNA in such a way that they alters electrochemical properties of DNA itself, such as oxygen radicals, aromatic hydrocarbons, alkylating agents and pesticides. DNA-modified electrodes could thus serve as simple biosensors for detection of environmental pollutants as well as potential antitumor drugs.