

# PADESÁT LET ELEKTROCHEMIE NUKLEOVÝCH KYSELIN

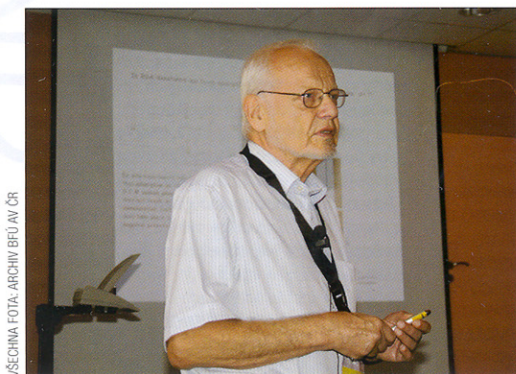
**Čtenáři je jistě známa důležitost nukleových kyselin, ve kterých je zaznamenána veškerá genetická informace o buňkách i organismech. Poznání nukleových kyselin (DNA a RNA) provázela řada převratných objevů jako např. nalezení struktury DNA a principu kopírování genetické informace do dceřiných buněk, rozluštění genetického kódu a mechanismu syntézy proteinů. V poslední době přibyl objev malých molekul RNA (siRNA a mikroRNA), které řídí syntézu proteinů. A neméně významnou měrou přispěl i objev elektrochemických vlastností nukleových kyselin, který před 50 lety učinil Emil Paleček na půdě Biofyzikálního ústavu AV ČR.**

**O**bjev vedl k vzniku a rozvoji nové vědní disciplíny – elektrochemie nukleových kyselin. Vývoj tohoto oboru je zřejmý z tabulky, která byla vytvořena podle Web of Science (str. 24). V posledních 10–15 letech každoročně přibývá vědeckých prací zabývajících se elektrochemií nukleových kyselin. Zatímco v r. 1989 bylo publikováno jen asi 10 prací, v r. 2007 jich vyšlo již asi 600. Z obrázku je patrné, že význam objevu elektrochemických vlastností nukleových kyselin strmě roste. Souvisí nepochybně také s praktickým využitím těchto metod, např. při stanovení sekvence NK pomocí biosenzorů. Podívejme se nejprve, jak k objevu elektrochemických vlastností nukleových kyselin došlo. Po objevení struktury DNA (1953) vědci intenzivně hledali nové metody výzkumu této molekuly, která v té době otevírala nové, zcela nečekané perspektivy ve vědě. O polarografickou analýzu nukleových kyselin se v Německu pokusil H. Berg, který v roce 1957 uveřejnil článek v časopise *Biochemische Zeitschrift*, v němž dokazoval, že nukleové kyseliny neposkytují žádné polarografické signály.

Před padesáti lety objevil Emil Paleček elektrochemické vlastnosti nukleových kyselin.

V té době byl založen Biofyzikální ústav (BFÚ) Československé akademie věd v Brně, do kterého, ještě před ukončením svých studií biochemie v roce 1955, nastoupil E. Paleček. Brzy dostal za úkol zabývat se poškozením DNA zářením. Při své diplomové práci na katedře biochemie MU u prof. V. Morávka se E. Paleček seznámil s polarografickými metodami a jejich využitím při analýze bílkovin. Chtěl tyto metody v ústavu využít pro analýzu DNA, jeho nadřízení však byli toho názoru, že elektrochemie DNA není perspektivní. Zkušenosti, které získal při své diplomové práci, mu však napovídaly, že určitá naděje na úspěch existuje. Aby nemusel bojovat se svými nadřízenými, plnil v pracovní době jejich směrnice a po pracovní době dělal elektrochemické pokusy. Velmi brzy zjistil, že jak stavební kameny nukleových kyselin (báze, nukleosidy a nukleotidy), tak i velké polymerní molekuly DNA i RNA poskytují elektrochemické signály.

V okamžiku, kdy H. Berg publikoval své výsledky (1957) již E. Paleček věděl, že jeho konkurent měl smůlu. Ze všech experimentálních podmínek, které mohl pro svou práci použít, si vybral pravděpodobně ty nejhorší. E. Paleček konzultoval své výsledky s prof. J. Heyrovským, který jeho práci pochválil a povzbudil ho k dalšímu výzkumu. V roce 1958 E. Paleček uveřejnil svoje překvapující výsledky v časopise *Naturwissenschaften*. O dva roky později publikoval další čtyři práce zabývající se elektrochemií DNA a jejich stavebních kamenů. V časopise *Nature* mu otiskli práci, v níž identifikoval elektrochemické signály DNA a jejich degradačních produktů a ukázal, že elektrochemie reflektuje změny ve struktuře DNA. Brzy nato dostal tři pozvání na přední univerzity v USA (Harvard, Brandeis a Princeton University). Přestože byl samozřejmě výjezd z Československa nebyl povolen, koncem roku 1962 však s doporučením prof. J. Heyrovského přešel jen do USA vycestoval.



VŠECHNA FOTKA - ARCHIV BFÚ AV ČR

**Důležitá vědecká zjištění ve třech počátečních dekádách  
rozvoje elektrochemie nukleových kyselin (1958–1988)**

* Autoři jsou uvedeni v závorkách. Pokud není autor uveden, byly výsledky získány v laboratoři E. Palečka v Brně.	
1958	DNA, RNA a všechny jejich volné báze jsou elektroaktivní.
1960–1961	Přiřazení elektrochemických signálů DNA jednotlivým bázím. Oscilopolarografie reflektuje strukturu DNA.
1961	Adsorpce DNA na rtuťových elektrodách pomocí prvního měření ac impedanci (I. R. Miller, Rehovot)
1962–1966	Předdenaturační změny DNA (premelting), denaturace, renaturace/hybridizace mohou být sledovány elektrochemicky, stopy jednořetězcové DNA stanoveny v nativní dsDNA. Vliv sekvence nukleotidů na elektrochemické chování DNA.
1966	Pulsní polarografie byla poprvé aplikována při studiu DNA.
1966	První elektrochemická detekce poškození DNA
1967	Interakce nízkomolekulárních látek s DNA lze sledovat pomocí polarografie (P. J. Hilson, M. J. Simons, Harrow, UK, and H. Berg, Jena).
1974	DNA se denaturuje v úzkém rozmezí potenciálů negativně nabitě rtuťové elektrody (E. Paleček, Brno, a H. W. Nürnberg, Jülich).
1976	Elektrochemická měření svědčí pro polymorfii dvojité šroubovice DNA. Po dvě desetiletí byly v elektrochemii NK používány pouze rtuťové elektrody.
1978	Pevné (uhlíkové) elektrody byly poprvé použity při výzkumu nukleových kyselin (V. Brabec a G. Dryhurst a další).
1980	Poprvé byly stanoveny báze NK v nanomolárních koncentracích pomocí katodické rozpouštěcí voltametrie.
1981	První elektroaktivní značky kovalentně vázané k DNA
1986–1988	Byly navrženy elektrody modifikované DNA nezbytné při výzkumu a vývoji senzorů DNA.

V roce 1961 se elektrochemií DNA začal zabývat také I. R. Miller z Izraele a v průběhu dalších let se přidaly i laboratoře H. Berga (Jena), J. Reynauda (Orleans), H. W. Nürnberga (Jülich), G. C. Barkera (Oxford) a další, které elektrochemie DNA zaujala. Postupně se tak vytvářela nová oblast vědy, jež položila základy pro dnešní elektrochemii DNA orientovanou na senzory pro hybridizaci DNA (zjišťování sekvence nukleotidů v DNA) a pro poškození DNA. Z tabulky nejdůležitějších výsledků je zřejmé, že v prvních 30 letech byla většina významných objevů v oblasti elektrochemie nukleových kyselin a bílkovin učiněna v BFÚ v Brně. Tuto skutečnost je třeba vysoce ocenit, neboť vědecká práce v té době velmi trpěla nedostatkem deviz k zakoupení laboratorních prostředků potřebných pro experimentální práci, omezeným přístupem k vědecké literatuře a politickými prověrkami.

Po roce 1968 byl E. Paleček zbaven funkce vedoucího oddělení (nikdy nevstoupil do KSČ), nesměl cestovat a přednášet na univerzitě a hrozilo mu propuštění z ústavu. Avšak i v těchto situacích se objevovala pomoc, jako například dary potřebných chemikálií od vědců ze západních zemí či po-

moc československých vědců, kteří svůj charakter a poctivost nepodřídili náladám v politické straně. Díky tomu v druhé polovině r. 1976 mohl E. Paleček pokračovat ve své práci.

V prvních 20 letech se kromě E. Palečka na elektrochemickém výzkumu DNA v Biofyzikálním ústavu podílela řada dalších jeho žáků a spolupracovníků jako B. Janík, V. Vetterl, V. Brabec, E. Lukášová a M. Vorlíčková, kteří se později stali vedoucími vědeckými pracovníky, univerzitními profesory či významnými manažery. Je zajímavé, že v prvních 10–15 letech elektrochemii DNA pozitivně vnímali biochemikové zabývající se strukturou DNA, naproti tomu většina elektrochemiků se k výzkumu stavěla záporně. Jedním z důvodů jejich postojů byla pravděpodobně špatná informovanost o vlastnostech a významu DNA.

Při svém založení v době studené války se BFÚ orientoval především na radiobiologii, které byl přikládán velký význam kvůli možnému použití jaderných zbraní. V průběhu let se zaměření ústavu zásadně změnilo a vznikla v něm vědecká škola orientovaná na fyzikální, chemické a biologické problémy struktury a interakcí DNA a proteinů. Dů-



ležitou součástí této školy byla elektrochemie nukleových kyselin a bílkovin vycházející ze základního výzkumu, jehož výsledky naznačovaly velké možnosti praktického uplatnění. Proto se v ústavu podařilo v polovině 90. let zachytit nástup výzkumu a vývoje elektrochemických senzorů DNA a udržet si špičkové postavení v oblasti elektrochemie NK. Významně k tomu přispěla spolupráce s laboratoří J. Wanga v USA, ve které Paleček v letech 1995–2000 každoročně nejméně měsíc pracoval a učil tamější elektrochemiky jak zacházet s DNA (J. Wang byl nedávno vyznamenán Americkou chemickou společností jako nejcitovanější elektrochemik a třetí nejcitovanější chemik). Koncem 90. let projevila zájem o spolupráci s oddělením E. Palečka německá firma November AG z Erlangenu, která pak čtyři roky velkoryse spolufinancovala výzkum v jeho oddělení.

Po roce 1948 až do poloviny 60. let byla u nás genetiky zatracována. Její zakladatel G. J. Mendel, který své objevy učinil v Brně, byl nazýván buržoazním pavědcem a jeho objevy elementů dědičnosti (tedy DNA) byl zamlžován a diskreditován. Tato atmosféra dokázala ovlivnit mysl některých studentů i univerzitních profesorů. Mezi elektrochemiky představoval naprostou výjimku nositel Nobelovy ceny J. Heyrovský, který již v r. 1961 udělil E. Palečkovi svoji cenu pro mladé vědce. Byl to on, kdo spolu se svými nejbližšími spolupracovníky podporoval jeho práci a pozval ho, aby některé experimenty prováděl v jeho laboratoři, na přístrojích, které v Brně nebyly k dispozici.

děl v jeho laboratoři, na přístrojích, které v Brně nebyly k dispozici.

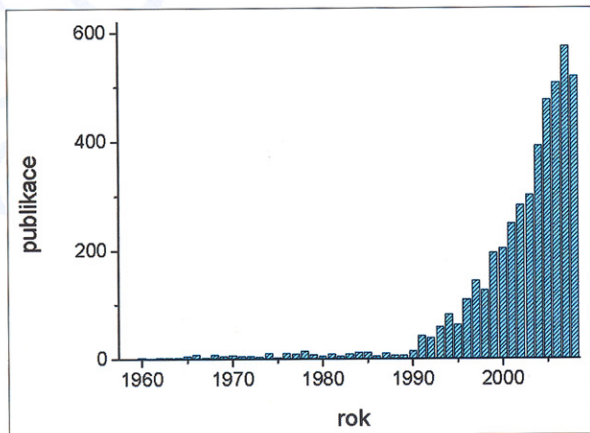
Laboratoře Biofyzikálního ústavu patří v oblasti elektrochemie nukleových kyselin také v současné době k vedoucím laboratořím ve světě. Svědčí o tom například nedávna publikace knihy na pozvání vydavatelství Elsevier i žádost nakladatelství Springer Verlag o napsání další knihy, jejíž text by měl být dokončen v roce 2010. Podobné svědectví vydává i scientometrie u jména E. Paleček na WOS: 249 publikací, 7641 citací, index  $h = 50$ . V roce 2008 (konec října) byly jeho práce citovány více než 600x. Tato čísla snesou srovnání s údaji předních českých vědců. Oddělení biofyziky makromolekul, které v roce 1967 E. Paleček založil, vede již čtvrtým rokem jeho žák Miroslav Fojta, jehož nadání a motivace je příslibem pro další rozvoj důležité vědní oblasti. Profesor E. Paleček nadále intenzivně pracuje s malou skupinou svých mladých spolupracovníků. Zdá se, že se jim podaří nový objev v oblasti elektrochemie bílkovin, který by mohl nalézt uplatnění v biomedicině. Nejbližší léta možná ukáží, zda bude stejně významný jako práce jeho laboratoře v oblasti elektrochemie DNA.

*Vědecké publikace týkající se elektrochemie nukleových kyselin v letech 1958–2008. Počet publikací za r. 2008 je neúplný.*

## Biosenzory na bázi elektrochemických vlastností nukleových kyselin v medicíně

Z médií se často dozvídáme o medicíně 21. století, která bude personalizována neboli šita na míru. Bude přizpůsobena genetické výbavě pacienta. To předpokládá znalost genomů jednotlivců a jejich exprese, což sice současná věda umožňuje, ale je to příliš drahé. Proto se obvykle hledá gen, jehož variabilita nebo změna je rozhodující pro danou léčebnou metodu a ten se testuje. Příkladem praktického využití znalosti genomu a jeho exprese najdeme v současné době značný počet – mutace v genech BRCA1 a BRCA2 zvyšují riziko vzniku rakoviny prsu, mutace v genu APC zase zvyšuje riziko vzniku rakoviny tlustého střeva (lze zde uvažovat o možnostech prevence), přítomnost BCR-ABL genu u myeloidní leukémie umožňuje léčbu inhibitory tyrosinkinázy (Gleevec), zvýšená exprese genu HER2 umožňuje léčbu rakoviny prsu pomocí Herceptinu atd. Korelace mezi prognózou onemocnění a genovou expresí je v současné době sledována u většiny závažných onemocnění.

Lze očekávat, že vědci budou v blízké budoucnosti hledat a nalézat nové biomarkery, schopné identifikovat jednotlivce, kteří by měli prospěch





z různých způsobů terapie, a zvláště ty, kteří by se měli určitému typu léčení vyhnout. Testování sekvencí nukleotidů v DNA, tedy zjišťování posloupnosti písmenek v genetické abecedě u jednotlivých lidí, je tak postupně stále významnější.

Stanovení sekvencí nukleotidů v genomu jednotlivců je velmi obtížné. Lidský genom má totiž tři miliardy párů basí (tedy párů písmenek genetické abecedy). V současné době se stále zlepšují metody zjišťování sekvencí důležitých z hlediska některých onemocnění pomocí tzv. hybridizačních čipů, nicméně dosud jsou tyto analýzy velmi nákladné. Jako metoda, pomocí které se určitá sekvence detekuje, se používá optická detekce. A tady se ukazuje, že elektrochemická detekce sekvencí DNA by mohla být výrazně levnější. Podstatou přístrojů pro elektrochemickou analýzu jsou jednoduché elektrické obvody a elektrody (např. zlaté, amalgamové či uhlíkové). Tyto přístroje jsou levné, spotřebovávají málo elektrické energie a lze je snadno miniaturizovat. Proto by se elektrochemické přístroje mohly časem dostat i do menších nemocnic a později možná i do poliklinik či do ordinací jednotlivých lékařů. Jejich použití by se nemuselo omezovat pouze na zdravotnictví, ale mohlo by nalézt uplatnění i v jiných oblastech praxe, např. v kriminalistice, potravinářství, detekci biologických zbraní atd. V USA, kde ještě asi

před dvaceti lety vědci neprojevovali o elektrochemii nukleových kyselin zájem, je v současnosti mnoho laboratoří orientovaných právě na tuto oblast vědy. V Číně počet takto orientovaných laboratoří velmi rychle přibývá. V Evropě je tento nárůst pomalejší. V ČR se elektrochemie nukleových kyselin zkoumá na BFÚ a začíná se rozvíjet i na univerzitě v Pardubicích v úzké spolupráci s BFÚ.

Padesát let po první vědecké zprávě o elektrochemické aktivitě NK je elektrochemie nukleových kyselin důležitou interdisciplinární vědeckou oblastí, která se bouřlivě vyvíjí a v dalších letech má velmi dobré vyhlídky na praktické aplikace. Většina čtenářů asi zná jednoduchá zařízení na měření hladiny glukosy v krvi diabetiků. Tato zařízení jsou založena na elektrochemickém principu. Podobně by mohly v budoucnu fungovat v ordinacích lékařů i malé přístroje pro analýzu sekvencí nukleotidů v DNA. Práce E. Palečka, kterou zahájil před 50 lety jako student a přes četné překážky v ní cílevědomě pokračoval až do dnešní doby, přinesla své ovoce. Teď je již věcí mladších vědců, aby tuto práci dále rozvíjeli jak v oblasti základního výzkumu, tak i v praktických aplikacích. ■

STANISLAV KOZUBEK,  
ředitel Biofyzikálního ústavu AV ČR, v. v. i.

*Výzkumný tým  
oddělení biofyzikální  
chemie  
a molekulární  
onkologie  
BFÚ AV ČR  
patří v oblasti  
elektrochemie  
nukleových kyselin  
k nejlepším  
na světě.*