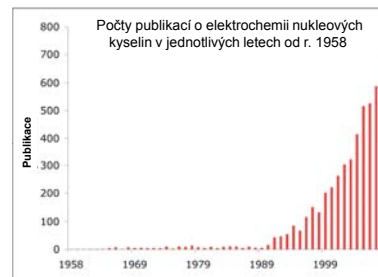


# ELEKTROCHEMIE NUKLEOVÝCH KYSELIN

As před 50 lety byla na Biofyzikálním ústavu objevena schopnost DNA přijímat nebo odevzdávat elektrony při její interakci s elektrodami a poskytovat analyticky využitelné elektrochemické signály. Tento objev vedl ke vzniku nové oblasti vědy – elektrochemie nukleových kyselin, která byla po 30 let doménou poměrně malého počtu laboratoří ve světě, produkujících kolem 10 publikací ročně. Od r. 1990 počet publikací v této oblasti exponenciálně narůstá; jen v r. 2008 bylo publikováno asi 700 prací (obr. 1a). Tento nárůst souvisí s tím, že elektrochemie je považována za vhodný nástroj pro decentralizovanou analýzu DNA pro medicínu 21. století (více v článkách<sup>1</sup>).



Obr. 1a

## Elektrochemie DNA

Po objevu struktury DNA v r. 1953 vědci intenzivně hledali nové metody výzkumu DNA, molekuly, která otvírala nové, zcela nečekané perspektivy ve vědě. V r. 1957 H. Berg, oznámil v časopise *Biochemische Zeitschrift*, že DNA i RNA jsou elektrochemicky neaktivní. Ve stejné době Emil Paleček (EP), vědecký aspirant Biofyzikálního ústavu (BFÚ) ČSAV v Brně (založen v r. 1955) věděl, že Bergův výsledek byl podmíněn nešťastnou volbou alkalického prostředí pro analýzu DNA. V r. 1958 E. Paleček uveřejnil svoje překvapující výsledky v časopise *Naturwissenschaften*, které naznačily, že DNA, RNA i jejich složky jsou schopny přijímat či odevzdávat elektrony při interakci s elektrodou. Svoji práci konzultoval s prof. J. Heyrovským, který o ni projevil velký zájem a povzbudil jeho úsilí. O dva roky později uveřejnil EP další čtyři práce zabývající se elektrochemií DNA a jejich stavebních kamenů. Jednu z nich publikoval v časopise *Nature* (Obr. 1b), kde identifikoval elektrochemické signály DNA a jejich degradačních produktů a ukázal, že elektrochemie reflektuje změny ve struktuře DNA.

## Elektrochemie DNA a studená válka

Brzy nato dostal tři pozvání k práci na třech předních univerzitách v USA (J. Marmur, Harvard; L. Grossman, Brandeis; J. Fresco, Princeton University). Samozřejmě mu výjezd z ČSR nebyl povolen. Teprve po návštěvách Marmura a Grossmana na BFÚ v r. 1961 a doporučení prof. J. Heyrovského se změnil postoj ředitele ústavu. Koncem roku 1962 byl EP výjezd do USA povolen. Tento příběh měl však pokračování typické pro období studené války. Přístroj, na kterém měl EP v USA pracovat (vyráběl se pouze v ČSR), došel do Bostonu až po 9 měsících jako nepoužitelný, pravděpodobně v důsledku důkladného zkoumání speciálními službami na obou stranách „Železné opony“. Namísto elektrochemie DNA se EP podílel na objevu týmu prof. J. Marmura, který přispěl k vytvoření základů molekulární biologie a je citován v učebnicích (např. J.D. Watson, Molekulární biologie genu, Academia, Praha 1982, s. 318).

## Prvních 30 let elektrochemie DNA

Po svém návratu z USA pokračoval EP ve své elektrochemii DNA a v průběhu let se připojili i další vědci jako G. C. Barker (Oxford), H. Berg (Jena), I. R. Miller (Rehovot), H. W. Nürnberg (Jülich), J. Reynaud (Orleans) a další, které elektrochemie DNA zaujala. Postupně se tak vytvářela nová oblast vědy, která položila základy pro dnešní elektrochemii DNA orientovanou na senzory a čipy pro hybridizaci DNA a pro poškození DNA.

1956	Pulsní polarografie byla poprvé aplikována při studiu DNA.
1956	První elektrochemická detekce poškození DNA.
1967	Interakce nízkomolekulárních látek s DNA lze sledovat pomocí polarografie (P. J. Hilsen, M. J. Simons, Harrow, UK, and H. Berg, Jena)
1974	DNA se denaturuje v úzkém rozsahu potenciálů negativně nabitě rurové 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 rurové 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 rozpuštěli voltametrie.
1981	První elektroaktivní značky kovalentně vázané k DNA.
1986-1988	Byly navrženy elektrody modifikované DNA nezbytné při výzkumu a vývoji senzorů DNA.
1986	První elektrochemická detekce poškození DNA.
1967	Interakce nízkomolekulárních látek s DNA lze sledovat pomocí polarografie (P. J. Hilsen, M. J. Simons, Harrow, UK, and H. Berg, Jena)
1974	DNA se denaturuje v úzkém rozsahu potenciálů negativně nabitě rurové 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 rurové 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 rozpuštěli voltametrie.
1981	První elektroaktivní značky kovalentně vázané k DNA.
1986-1988	Byly navrženy elektrody modifikované DNA nezbytné při výzkumu a vývoji senzorů DNA.

Tabulka 1.

Z tabulky I. plyne, že v prvních 30-ti letech byla většina významných objevů v oblasti elektrochemie nukleových kyselin učiněna vědci BFÚ. Přitom je třeba si uvědomit, že vědecká práce tehdy velmi trpěla nedostatkem deviz k zakoupení laboratorních prostředků potřebných pro experimentální práci, omezeným přístupem k vědecké literatuře a občasnými politickými prověrkami, které postihly po r. 1968 i EP. Při svém založení v době studené války byl BFÚ orientován především na radiobiologii. V průběhu let se jeho zaměření silně změnilo a vznikla v něm vědecká škola orientovaná na fyzikální, chemické a biologické problémy struktury a interakcí DNA a proteinů, jejíž důležitou součástí je elektrochemie nukleových kyselin a bílkovin vycházející ze základního výzkumu, jehož výsledky naznačují velké možnosti praktického uplatnění.

## Analýza DNA bude stále důležitější pro naše zdraví

Z médií se často dozvídáme o medicíně 21. století, která bude „šita na míru“, tj. bude přizpůsobena genetické výbavě toho či onoho pacienta. Již dnes víme, že zatímco většina pacientů nemocných rakovinou má prospěch z chemoterapie, někteří z nich jsou resistentní a některým dokonce tato terapie škodí. Navržené léčebných postupů na základě znalosti rozdílů v genomech pacientů zvýší v budoucnu úspěšnost léčby. K tomu je třeba (a) dalších poznatků o vztazích mezi rozdíly v genomech (pořadí nukleotidů v DNA) jednotlivců a různými nemocemi a (b) zlevnění analýzy DNA. V současné době jsou používány tzv. hybridizační čipy (DNA array) s optickou detekcí, tato analýza je však dosti nákladná a je omezena jen výzkumné ústavy a velké nemocnice.

## Elektrochemie umožní zlevnění a decentralizaci analýzy DNA

Naproti tomu elektrochemická analýza DNA by mohla být významně levnější. Podstatou přístrojů pro elektrochemickou analýzu jsou jednoduché elektrické obvody a elektrody (např. zlaté, amalgamové či uhlíkové). Tyto přístroje jsou levné, vyžadují málo elektrické energie a lze je snadno miniaturizovat. Takovéto přístroje se mohou dostat i do menších nemocnic či do ordinací lékařů. Mohly by nalézt uplatnění i v jiných oblastech praxe, např. v kriminalistice, potravinářství, detekci biologických zbraní, zkrátka všude, kde je vhodné provádět decentralizovanou analýzu DNA. Z toho důvodu v posledních 10 – 15 letech každým rokem přibývá vědeckých prací, zabývajících se elektrochemií nukleových kyselin. Zatímco v r. 1989 bylo publikováno jen asi 10 prací, v r. 2008 jich vyšlo již asi 700 (obr. 1a).



E. Paleček, *Nature* 188 (1960) 656-657  
Obr. 1b.

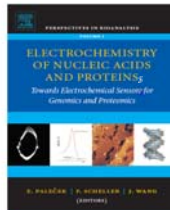
## Elektrochemie biomakromolekul má reálné možnosti aplikací

Praktický význam aplikace elektrochemie DNA rozpoznala koncem devadesátých let německá firma z Erlangen, která po 4 léta velkoryse spolufinancovala výzkum v oddělení EP. Je třeba říct, že tomuto oddělení se podařilo v polovině devadesátých let zachytit nástup výzkumu a vývoje elektrochemických senzorů DNA a udržet si své špičkové postavení v oblasti elektrochemie DNA. Významně k tomu přispěla spolupráce s laboratoří J. Wanga\* v USA, ve které EP v letech 1995-2000 každoročně nejméně 1 měsíc pracoval a učil tamní elektrochemiky jak zacházet s DNA.

\*J. Wang byl nedávno vyznamenán Americkou chemickou společností jako nejcitovanější elektrochemik a 3. nejcitovanější chemik.

## BFÚ patří k vedoucím pracovištím v elektrochemii biomakromolekul

I v přítomné době patří BFÚ k vedoucím pracovištím v elektrochemii nukleových kyselin a bílkovin na světě. Svědčí o tom například nedávná publikace knihy na pozvání vydavatelství Elsevier<sup>2</sup> (Obr.2) i žádost Springer Verlag o napsání další knihy<sup>3</sup>, jejíž text by měl být dokončen v roce 2010. Podobné svědectví vydává i scientometrie u jména EP na WOS: 260 publikací, 8195 citací, index h = 52. Tato čísla snesou srovnání s údaji předních českých vědců. Oddělení Biofyziky makromolekul (Obr.3a), které v roce 1967 založil EP, vede již pátým rokem jeho žák doc. M. Fojta, jehož nadání a motivace je příslibem pro další rozvoj důležité vědecké oblasti. Profesor Paleček nadále intenzivně pracuje s malou skupinou svých mladých spolupracovníků (Obr. 3b). Zdá se, že se jim podaří nový objev v oblasti elektrochemie bílkovin, který by mohl nalézt uplatnění v biomedicíně a proteomice. Nejbližší léta možná ukážou, zda bude stejně významný jako práce v oblasti elektrochemie DNA.



Elsevier 2005 789 stran  
Obr. 2



Oddělení biofyzikální chemie a molekulární onkologie, založené v r. 1967 E. Palečkem.  
Vedoucí doc. Dr. M. Fojta, CSc.  
Obr. 3a



Významná skupina EP zabývající se interakcí elektrochemie a bílkovin  
Obr. 3b

50 let po první vědecké zprávě je elektrochemie nukleových kyselin důležitou interdisciplinární vědeckou oblastí, která se bouřlivě vyvíjí a má velmi dobré výhledy na praktické aplikace v dalších letech. Většina čtenářů asi zná jednoduchá zařízení, nástroje na měření hladiny glukosy v krvi u pacientů, kteří mají cukrovku. Málo lidí však ví, že tato zařízení jsou založena na elektrochemickém principu. Podobným způsobem by mohly v budoucnu fungovat i malé přístroje pro analýzu DNA v ordinacích lékařů. Práce, kterou EP zahájil před 50 lety jako student a cílevědomě v ní pokračoval přes četné překážky 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 jeho praktických aplikacích.

- Kozubek S. (2009) *akademický bulletin* č. 4 (duben) 22-25; Paleček, E. (2009): Fifty years of nucleic acid electrochemistry. *Electroanalysis*, 21, 239-251
- Paleček E., Scheller F. and Wang J. (eds.) (2005): *Electrochemistry of nucleic acids and proteins. Towards electrochemical sensors for genomics and proteomics*. Elsevier, Amsterdam. 789 pp.
- Fojta M. and Paleček E., *Nucleic Acid Electrochemistry Basics and Applications*. Springer Verlag, Berlin (připravováno pro tisk)